

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS

CAMPO TÉCNICO

La presente es una invención que se encuentra en el campo de
5 las composiciones que comprenden cepas bacterianas aisladas
en el tracto digestivo de mamíferos y el uso de tales
composiciones en el tratamiento de enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se considera que el intestino humano fetal es estéril *in*
utero, pero que se expone a una gran variedad de microbios
maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento.
Luego, se produce un periodo dinámico de colonización
microbiana y sucesión, que está influenciada por factores
15 tales como modo del parto, el medio ambiente, la dieta y el
genotipo del huésped, que tienen un impacto en la composición
de la microbiota intestinal, en particular durante los
primeros años de vida. Posteriormente, la microbiota se
estabiliza y se vuelve igual a la de un adulto [1]. La
20 microbiota intestinal humana contiene más de 500-1000
filotipos diferentes que pertenecen esencialmente a dos
grandes divisiones bacterianas, la bacteroidetes y la
Firmicutes [2]. Las relaciones simbióticas exitosas derivadas
de la colonización bacteriana del intestino humano han

producido una amplia variedad de funciones metabólicas
beneficiosas, estructurales, de protección y de otro tipo.
Las actividades metabólicas mejoradas del intestino
colonizado aseguran que componentes de la dieta, de lo
5 contrario no digeribles, se degraden con la subsiguiente
liberación de subproductos que proporciona una fuente
nutriente importante para el huésped. Del mismo modo, la
importancia inmunológica de la microbiota intestinal es bien
reconocida y se ejemplifica en los animales libres de
10 gérmenes que tienen un sistema inmunitario deteriorado, que
puede reconstruirse funcionalmente con la introducción de las
bacterias comensales [3-5].

Cambios drásticos en la composición de la microbiota se han
documentado en los trastornos gastrointestinales, como la
15 enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en
inglés). Por ejemplo, los niveles de bacterias del grupo
Clostridium XIVa se reducen en pacientes con IBD, mientras
que los números de *E. coli* se incrementan, lo que sugiere un
cambio en el equilibrio de simbiosis y patobiosis en el
20 intestino [6-9]. Curiosamente, esta disbiosis microbiana
también se asocia con desequilibrios en las poblaciones de
linfocitos T efectores.

En reconocimiento del posible efecto positivo que ciertas
cepas de bacterias pueden tener en el intestino de los

animales, se han propuesto varias cepas para uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, por ejemplo, [10-13]). Además, ciertas cepas, que incluyen en su mayoría cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se han propuesto para uso en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias que no están directamente vinculadas a los intestinos (ver [14] y [15] para comentarios). Sin embargo, la relación entre diferentes enfermedades y las diferentes cepas bacterianas y los efectos precisos de determinadas cepas de bacterias, en el intestino y a un nivel sistémico, así como también en tipos particulares de enfermedades, no están bien caracterizados. Existe una necesidad en la técnica de nuevos métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Hay también una necesidad de caracterización de los efectos posibles de las bacterias del intestino para que nuevas terapias usando las bacterias del intestino puedan ser desarrolladas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. En particular, los inventores han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento y la prevención de enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o

la vía Th17. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Bacteroides* pueden ser eficaces para la reducción de la respuesta inflamatoria de Th17. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Bacteroides coprocola* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluso la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de ratones de asma, artritis reumatoidea y esclerosis múltiple.

Por lo tanto, en una primera realización, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides*, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por IL-17 y 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, que incluye IL-17, puede aliviar la respuesta inflamatoria de Th17 y puede proporcionar beneficios clínicos en modelos de ratón de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por la IL-17 y la vía Th17.

En realizaciones particulares, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de género *Bacteroides*, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección seleccionada entre el grupo que consiste en: esclerosis múltiple; artritis, tales como la

artritis reumatoidea, osteoartritis, artritis psoriásica, o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad
5 inflamatoria intestinal, como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés); cáncer, como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de
10 ovarios; uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behçet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y el rechazo de aloinjertos. El efecto que se muestra para las cepas bacterianas de género *Bacteroides* en la respuesta inflamatoria de Th17 puede
15 proporcionar beneficios terapéuticos para enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 y de la vía Th17, tales como las enumeradas anteriormente.

En realizaciones preferenciales, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género
20 *Bacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de asma, tal como asma neutrofílica o asma alérgica. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Bacteroides* puede reducir el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones, lo que puede

ayudar a tratar o prevenir el asma. Además, los inventores han probado y demostrado la eficacia de las cepas de *Bacteroides* en modelos de ratón de asma. En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un método de

5 tratamiento o prevención de asma neutrofílica o asma eosinofílica. El efecto que se muestra para las composiciones de la invención en los neutrófilos y eosinófilos significa que pueden ser particularmente eficaces para tratar o prevenir tanto el asma neutrofílica como eosinofílica. De

10 hecho, en ciertas realizaciones, la composición es para uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma, o la composición es para uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o

15 prevención del asma. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para su uso en el tratamiento del asma, y en particular en el tratamiento del asma neutrofílica. *Bacteroides coprocola* ha mostrado

20 tener un efecto particularmente pronunciado sobre los neutrófilos en modelos de asma, y el tratamiento con *Bacteroides coprocola* puede ser particularmente eficaz para el tratamiento del asma neutrofílica. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que

comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides thetaiotaomicron* para uso en el tratamiento del asma, y en particular asma eosinofílica o asma alérgica. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que

5 comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides fragilis* para uso en el tratamiento del asma, y en particular asma eosinofílica o asma alérgica.

En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de género

10 *Bacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la artritis reumatoidea. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Bacteroides* puede proporcionar beneficios clínicos en un modelo de ratón de la artritis reumatoidea y puede reducir la inflamación de

15 las articulaciones. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea. Las composiciones que utilizan *Bacteroides coprocola* pueden ser particularmente

20 eficaces para el tratamiento de la artritis reumatoidea. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides thetaiotaomicron*, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea. En ciertas realizaciones, la

invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides fragilis*, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea.

En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona
5 una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Bacteroides* puede reducir la incidencia y gravedad de la enfermedad en un
10 modelo de ratón con esclerosis múltiple. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que utilizan *Bacteroides*
15 *coprocola* pueden ser particularmente eficaces para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides thetaiotaomicron*, para uso en el tratamiento de la esclerosis
20 múltiple. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides fragilis*, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona

una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides*, para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, tal como el cáncer de mama, de pulmón o de hígado. Las composiciones que comprenden una cepa bacteriana del

5 género *Bacteroides* pueden reducir el crecimiento tumoral en modelos de ratón con cáncer de mama, de pulmón y de hígado. En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un método para reducir el tamaño del tumor o prevenir el crecimiento tumoral en el tratamiento del cáncer. En ciertas

10 realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para uso en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides*

15 *thetaitaomicron*, para uso en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides fragilis*, para uso en el tratamiento del cáncer. En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona

20 una composición que comprende una cepa bacteriana de género *Bacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la uveítis, como la uveítis posterior. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie

Bacteroides coprocola, para uso en el tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides thetaiotaomicron*, para uso en el

5 tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides fragilis*, para uso en el tratamiento de la uveítis.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención

10 son para su uso en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o por la vía Th17. En particular, las composiciones de la invención se pueden usar para reducir la producción de

15 IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, la artritis reumatoidea o la esclerosis múltiple. Preferiblemente, la invención proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para uso en la reducción

20 de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, la artritis reumatoidea o la esclerosis múltiple, o de asma, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, uveítis o cáncer. En ciertas realizaciones, la invención proporciona

composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides thetaiotaomicron*, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o en la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención

5 del asma, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, uveítis o cáncer. En ciertas realizaciones, la invención proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides fragilis*, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de

10 células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, uveítis o cáncer. En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17. El efecto sobre la respuesta inflamatoria Th17 que se muestra

15 para cepas de *Bacteroides* puede ser particularmente beneficioso para tales pacientes.

En realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Bacteroides coprocola*. También se pueden utilizar cepas estrechamente relacionadas,

20 tales como cepas de bacterias que tienen una secuencia de ARNr 16S que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Bacteroides coprocola*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 95

%, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Preferiblemente, la identidad de secuencia es SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene la secuencia ARNr 16S representada por
5 SEQ ID NO: 4.

En otras realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Bacteroides thetaiotaomicron*. También se pueden utilizar cepas estrechamente relacionadas, tales como cepas de bacterias que
10 tienen una secuencia de ARNr 16S que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia ARNr 16S de una cepa bacteriana de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia ARNr 16S que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98
15 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene la secuencia ARNr 16S representada por SEQ ID NO: 5.

En otras formas de realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Bacteroides fragilis*. También se pueden utilizar cepas estrechamente relacionadas, tales como cepas bacterianas que tienen un
20 genoma con identidad de secuencia a CR626927.1.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas

de la invención puede ser eficaz para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Además, la administración oral es conveniente para los pacientes y los profesionales de la medicina y permite su
5 administración para la colonización parcial y/o total del intestino.

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

10 En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica eficaz y conveniente de preparación de composiciones estables que permiten la administración de bacterias a un paciente que lo necesite.

15 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición tal como se describe anteriormente.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición tal como
20 se describe anteriormente.

Además, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por IL-17 o por la vía Th17, que comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides*.

Durante la elaboración de la invención que antecede, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. La cepa *Bacteroides coprocola* de la invención ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de las enfermedades descritas en el presente documento, tales como artritis, asma y esclerosis múltiple. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una célula de la cepa *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408, o un derivado de esta. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales células o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también proporciona una célula de la cepa *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408, o un derivado de esta, para uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Conteo total de células de fluido BAL.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 19: modelo de ratón de artritis reumatoidea - pesos
corporales, días -14 a 0. Los datos se presentan como Media $\pm$
SEM [error estándar de la media] de los pesos corporales
10 iniciales (Día -14). Significación estadística: $\blacktriangle$ $p < 0,05$ y
 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,0001$ en comparación con el grupo tratado con
vehículo.

Figura 20: modelo de ratón de artritis reumatoidea - pesos
corporales, días 0 a 42. Los datos se presentan como
15 porcentajes Media $\pm$ SEM de los pesos corporales iniciales
(Día 0). $\blacktriangle$ $p < 0,05$, $\bullet$ $p < 0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,001$, $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0,0001$
en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 21: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Puntajes
clínicos. Los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM. $\bullet\bullet\bullet\bullet$ P
20 $< 0,0001$ en comparación con el Día 21 en el grupo tratado con
vehículo. $\blacklozenge$, 0 $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con
vehículo en un día dado.

Figura 22: modelo de ratón de artritis reumatoidea -
respuesta proliferativa de esplenocitos a Colágeno II. Conteo

por minuto menos antecedente del medio [estimulado por CII - antecedente del medio] en función de la incorporación de 3H-TdR. Todos los datos se presentan como Media $\pm$ SEM.

Figura 23: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con vehículo. Las líneas representan valores de la mediana del grupo.

Figura 24: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IL-17A en sobrenadantes de cultivo de tejidos de grupo tratado con vehículo. Las líneas representan valores de la mediana del grupo.

Figura 25: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con vehículo. Las líneas representan valores de la mediana del grupo.

Figura 26: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos de grupo tratado con vehículo. Las líneas representan valores de la mediana del grupo.

Figura 27: modelo de ratón de la artritis reumatoidea - Niveles de citoquina en sobrenadantes de cultivo de tejido de grupo tratado con agente bioterapéutico n.º 675 (Grupo 4). Las líneas representan valores de la mediana del grupo.

Figura 28: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del

polvo doméstico - IgE total en suero

Figura 29: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específico de HDM en suero

Figura 30: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en el BALF

Figura 31: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específico de HDM en el BALF

Figura 32: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje de infiltración peribronquial promedio.

Figura 33: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje de infiltración perivascular promedio.

Figura 34: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje inflamatorio promedio (promedio del puntaje de infiltración peribronquial y perivascular)

Figura 35: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje de mucosidad.

Figura 36: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-9 en el tejido pulmonar

Figura 37: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1a en el tejido pulmonar

Figura 38: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IFN γ en el tejido pulmonar

Figura 39: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-17A en el tejido pulmonar

5 **Figura 40:** modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-4 en el tejido pulmonar

Figura 41: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-5 en el tejido pulmonar

Figura 42: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del
10 polvo doméstico - Nivel de IL-1b en el tejido pulmonar

Figura 43: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de RANTES en el tejido pulmonar

Figura 44: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de MIP-1a en el tejido pulmonar

15 **Figura 45:** modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de KC en el tejido pulmonar

Figura 46: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de MIP-2 en el tejido pulmonar

Figura 47: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG1
20 específico de HDM en suero

Figura 48: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG2a específico de HDM en suero

Figura 49: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG1 específico de HDM en el BALF

Figura 50: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG2a específico de HDM en el BALF

Figura 51: modelo de ratón de asma grave neutrofílica -
Análisis histológico - Puntaje de infiltración peribronquial
5 promedio.

Figura 52: modelo de ratón de asma grave neutrofílica -
Análisis histológico - Puntaje promedio de infiltración
perivascular.

Figura 53: modelo de ratón de asma grave neutrofílica -
10 Análisis histológico - Puntaje inflamatorio promedio
(promedio del puntaje de infiltración peribronquial y
perivascular)

Figura 54: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
de TNF α en el tejido pulmonar

15 **Figura 55:** modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
de IL-1 α en el tejido pulmonar

Figura 56: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
de IFN γ en el tejido pulmonar

Figura 57: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
20 de IL-17F en el tejido pulmonar

Figura 58: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
de IL-1 β en el tejido pulmonar

Figura 59: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
de RANTES en el tejido pulmonar

Figura 60: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de MIP-2 en el tejido pulmonar

Figura 61: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de KC en el tejido pulmonar

5 **Figura 62:** modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de IL-17A en el tejido pulmonar

Figura 63: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de MIP-1a en el tejido pulmonar

10 **Figura 64:** modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de IL-33 en el tejido pulmonar

Figura 65: modelo de ratón de artritis reumatoidea - plantilla gráfica de puntaje de histopatología. Imágenes representativas que muestran los puntajes compuestos de articulaciones del tarso del ratón en un estudio sobre la
15 artritis inducida por colágeno.

Figura 66: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Histopatología: puntajes de inflamación. Los datos se presentan como Media $\pm$ SEM. ** P <0,01 en comparación con el grupo tratado con vehículo.

20 **Figura 67:** modelo de ratón de artritis reumatoidea - Histopatología: puntajes de cartílago del grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan como Media $\pm$ SEM.

Figura 68: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Histopatología: puntajes óseos. Los datos se presentan como

Media $\pm$ SEM.

Figura 69: modelo de ratón de artritis reumatoidea -
Histopatología: puntajes totales. Los datos se presentan como
media $\pm$ SEM.

5 **Figura 70:** modelo de ratón de artritis reumatoidea -
Histopatología: cepa n.º 675. Los datos se presentan como
Media $\pm$ SEM.

Figura 71: modelo de ratón de artritis reumatoidea -
Histopatología: imágenes representativas. La identificación
10 del animal (# N.N) y la extremidad (R para derecha, L para
izquierda) se indican entre paréntesis. Imagen superior
izquierda (vehículo): destrucción extensa de las
articulaciones y los huesos con inflamación y fibrosis que se
extiende a los tejidos blandos periarticulares. Imagen
15 inferior (cepa n.º 675): sinovitis y bursitis que se extiende
de manera focal a tejidos periarticulares, leve daño en el
cartílago articular y detritos intraarticulares, estructura
ósea no afectada.

Figura 72: modelo de ratón de la esclerosis múltiple -
20 puntaje clínico.

Figura 73: modelo de ratón de la esclerosis múltiple -
incidencia de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Cepas bacterianas

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

10 Los ejemplos de especies de *Bacteroides* para uso en la invención incluyen *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Bacteroides caccae*. Un ejemplo adicional de una especie de *Bacteroides* para uso en la invención es *Bacteroides fragilis*. *Bacteroides* es un
15 género de bacterias obligatoriamente anaerobias, Gram - negativas. Las especies de *Bacteroides* son bacilos no formadores de endosporas, y pueden ser móviles o no móviles, dependiendo de la especie. Las especies de *Bacteroides* constituyen una parte sustancial de la flora gastrointestinal
20 de mamíferos y son esenciales para el procesamiento de moléculas complejas.

Las células *Bacteroides coprocola* cultivadas en placas de agar de sangre EG son estrictamente anaeróbicas, no formadoras de esporas, no móviles y Gram-negativas. Las

varillas cortas o células con forma de varilla son aproximadamente $0.8\mu\text{m}$ de ancho y de longitud variable, generalmente en el rango de $1\text{--}4\mu\text{m}$. Los ejemplos de cepas de especies *Bacteroides coprocola* se describen en [16]. La cepa de tipo M16^T (= JCM 12979^T = DSM 17136^T) fue aislada de heces de un ser humano sano. Dos cepas adicionales [M11 (= JCM 12980) y M156 (= JCM 12981)] se incluyen en esta especie. Los números de acceso GenBank / EMBL / DDBJ para la secuencia del gen ARNr 16S de estas cepas *Bacteroides coprocola* son AB200223, AB200224 y AB200225 (descritas en este documento como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3).

La bacteria *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408 se analizó en los ejemplos y también se denomina en este documento como la cepa 675. Una secuencia de ARNr 16S para la cepa 675 que fue analizada se proporciona en SEQ ID NO: 4. La cepa 675 ha sido depositada ante la autoridad internacional de depósito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Building Innovation, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 13 de mayo de 2015 como "Bacteroidales 675" y se le asignó el número de acceso NCIMB 42408.

El genoma de la cepa 675 comprende un cromosoma y un plásmido. Una secuencia de cromosoma de la cepa 675 se proporciona en SEQ ID NO: 6. Una secuencia plasmídica de la

cepa 675 se proporciona en SEQ ID NO: 7. Estas secuencias se generaron utilizando la plataforma PacBio RS II.

También se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa analizada en los ejemplos puedan ser
5 eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia ARNr 16S de una
10 cepa bacteriana de *Bacteroides coprocola*. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Preferiblemente, la identidad de secuencia es SEQ ID NO: 4.
15 Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene la secuencia ARNr 16S representada por SEQ ID NO: 4.

Otra cepa bacteriana preferida para uso en la invención es la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* depositada con el número de acceso NCIMB 42341. Esta cepa se depositó ante la autoridad
20 internacional de depósito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) el 3 de diciembre 2014.

Otras cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* preferidas para uso en la invención es la cepa tipo ATCC 29148 = CCUG 10774 = CIP 104206 = DSM 2079 = JCM 5827 = NCTC 10582 = VPI 5482 y la

cepa WAL 2926 = ATCC 29741. Otra cepa *Bacteroides*
thetaiotaomicron preferida para uso en la invención es la
cepa que se describe en EP1448995. El número de acceso para
la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa WAL 2926 de
5 *Bacteroides thetaiotaomicron* es M58763 (descrita en este
documento como SEQ ID NO: 5).

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la
invención tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 95
%, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la
10 secuencia ARNr 16S de una cepa bacteriana de *Bacteroides*
thetaiotaomicron. Preferiblemente, la cepa bacteriana para
uso en la invención tiene una secuencia ARNr 16S que es al
menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica
a SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso
15 en la invención tiene la secuencia ARNr 16S representada por
SEQ ID NO: 5.

Una cepa *Bacteroides fragilis* preferida para uso en la
invención es la cepa tipo ATCC 25285 = CCUG 4856 = CIP 77.16
= DSM 2151 = JCM 11019 = LMG 10263 = NCTC 9343. El número de
20 acceso para la cepa NCTC 9343 completa del genoma *Bacteroides*
fragilis es CR626927.1 (versión: CR626927.1 GI: 60491031).

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la
invención tiene un genoma con identidad de secuencia a
CR626927.1. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana

para uso en la invención tiene un genoma con por lo menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, identidad de secuencia de al menos 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) a CR626927.1 a través de al menos 60 % (por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) de CR626927.1. Por ejemplo, la cepa bacteriana para uso en la invención puede tener un genoma con por lo menos 90 % de identidad de secuencia a CR626927.1 a través de 70 % de CR626927.1, o al menos 90 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 80 % de CR626927.1, o al menos 90 % de identidad de secuencia a CR626927.1 a través de 90 % de CR626927.1, o al menos 90 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 100 % de CR626927.1, o % de identidad de secuencia de al menos 95 % a CR626927.1 a través de 70 % de CR626927.1, o al menos 95 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 80 % de CR626927.1, o al menos 95 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 90 % de CR626927.1, o al menos 95 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 100 % de CR626927.1, o al menos 98 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 70 % de CR626927.1, o al menos 98 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 80 % de CR626927.1, o al menos 98 % de identidad de secuencia con CR626927.1 a través de 90 % de CR626927.1, o al menos 98 % de identidad de

secuencia con CR626927.1 a través de 100 % de CR626927.1.

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

de la SEQ ID NO: 6, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 a través de 70 % de la SEQ ID NO: 6, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 a través de 80 % de la SEQ ID NO: 6, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 a través de 90 % de la SEQ ID NO: 6, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 a través de 100 % de la SEQ ID NO: 6.

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un plásmido con al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 7 a través de al menos 60 % (por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) de SEQ ID NO: 7. Por ejemplo, la cepa bacteriana para uso en la invención puede tener un plásmido con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 70 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 80 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 90 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 100 % de SEQ ID NO: 7, o al menos 95 %

de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 70 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 80 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 90 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 100 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 70 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 80 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 90 % de la SEQ ID NO: 7, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de 100 % de la SEQ ID NO: 7.

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7.

También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso 42408 sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741

sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas, o muy similares.

5 Las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 y que son adecuadas para uso en la invención pueden identificarse mediante la secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para una bacteria depositada con el número de
10 acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741. Por ejemplo, sustancialmente todo el genoma puede ser secuenciado y una cepa biotipo para uso en la invención puede tener al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia a través de al menos 80 % de la
15 totalidad de su genoma (por ejemplo, a través de al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, o a través de todo su genoma). Otras secuencias adecuadas para uso en la identificación de cepas biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas tales como BOX, ERIC, (GTG)₅, o REP o [17]. Cepas biotipo pueden
20 tener secuencias con al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741.

Alternativamente, cepas que son biotipos de una bacteria

depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 y que son adecuadas para uso en la invención pueden ser identificadas mediante el número de acceso de depósito NCIMB 42408 o el número de acceso de depósito NCIMB 42341 o el número de acceso de depósito ATCC 29148 o el número de acceso de depósito ATCC 29741 y análisis de fragmentos de restricción y/o análisis de 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 repetitivo, o análisis del perfil de proteínas, o la secuenciación parcial de ADNr 16S o 23S. En realizaciones preferidas, tales técnicas se pueden utilizar para identificar otras cepas *Bacteroides coprocola* o *Bacteroides* *thetaitaomicron*.

En ciertas realizaciones, cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 y que son adecuadas para uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 cuando se analizaron por análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés), por ejemplo cuando se utiliza la enzima de restricción Sau3AI (para

ejemplos de métodos y orientación véase, por ejemplo, [18]).

Alternativamente, las cepas del biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que una bacteria depositada con el número de
5 acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741.

Otras cepas de *Bacteroides* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, tales como biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741, se pueden
10 identificar usando cualquier método o estrategia apropiada, incluso los ensayos que se describen en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para uso en la invención pueden ser identificadas mediante el cultivo anaeróbico en YCFA y/o la administración de las bacterias para el modelo de ratón de
15 artritis inducida por colágeno de tipo II y, a continuación evaluando los niveles de citoquinas. En particular, las cepas bacterianas con patrones similares de crecimiento, tipo metabólico y/o antígenos de superficie que una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341,
20 ATCC 29148 o ATCC 29741, pueden ser útiles en la invención.

Una cepa de utilidad tendrá actividad moduladora inmunitaria comparable a la NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o cepa ATCC 29741. En particular, una cepa biotipo provocará efectos comparables sobre los múltiples modelos de enfermedad de la

esclerosis, el asma, la artritis y efectos comparables sobre los niveles de citoquinas a los efectos que aparecen en los ejemplos, que se pueden identificar mediante el uso de los protocolos de cultivo y administración descritos en los
5 ejemplos.

Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408. Este es la cepa 675 de ejemplo analizada en los ejemplos y de mostrada eficacia para tratar la enfermedad.

10 Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408, o un derivado de esta. La invención también proporciona una composición que comprende una célula de la cepa *Bacteroides coprocola*

15 depositada con el número de acceso NCIMB 42408, o un derivado de esta. La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408. La invención también proporciona una célula de la cepa *Bacteroides*

20 *coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408, o un derivado del mismo, para uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en la presente divulgación.

Un derivado de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 puede ser

una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada) de la original. Un derivado de una cepa de la invención puede modificarse, por ejemplo a nivel genético, sin ablación de la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la invención es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá actividad moduladora inmunitaria comparable a la cepa original, NCIMB 42408, NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables sobre los múltiples modelos de enfermedad de la esclerosis, el asma, la artritis y efectos comparables sobre los niveles de citoquinas a los efectos que aparecen en los ejemplos, que se pueden identificar mediante el uso de los protocolos de cultivo y administración descritos en los ejemplos. Un derivado de la cepa NCIMB 42408 será generalmente un biotipo de la cepa NCIMB 42408. Un derivado de la cepa NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 será generalmente un biotipo de la cepa NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741.

Las referencias a células de la cepa *Bacteroides coprocola* depositada con el número de acceso NCIMB 42408 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características terapéuticas de eficacia y de seguridad que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42408, y tales células son abarcadas por la invención. Las referencias a

células de la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* depositada con los números de acceso NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 abarcan cualquier célula que tenga las mismas las características terapéuticas de eficacia y de seguridad que
5 las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741, y tales células están abarcadas por la invención.

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

Usos terapéuticos

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

Las células Th17 son un subconjunto de células T colaboradoras que producen, por ejemplo, IL-17A, IL17-F, IL-21 e IL-22. La diferenciación celular Th17 y la expresión IL-17 pueden ser impulsadas por IL-23. Estas citoquinas y otras
5 forman parte importantes de la vía Th17, que es una vía de señalización inflamatoria bien establecida que contribuye y subyace a una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (como se describe en, por ejemplo, [19-24]). Las enfermedades en las que se activa la vía Th17 son las
10 enfermedades mediadas por la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 se pueden mejorar o aliviarse mediante la represión de la vía Th17, que puede ser a través de una reducción en la diferenciación de las células Th17 o una reducción en su actividad o una reducción en el nivel de
15 citoquinas de la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por el aumento de los niveles de citoquinas producidas por las células Th17, como la IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revisado en [25]). Las enfermedades mediadas por la vía Th17 se pueden
20 caracterizar por el aumento de la expresión de genes relacionados con Th-17, tales como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden estar asociadas con mayores niveles de células Th17.

IL-17 es una citoquina proinflamatoria que contribuye a la

patogénesis de varias enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunitarias. IL-17 tal como se usa en la presente puede referirse a cualquier miembro de la familia IL-17, que incluye IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, y la IL-17F.

- 5 Las enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 se caracterizan por la alta expresión de IL-17 y/o la acumulación o presencia de células IL-17-positivas en un tejido afectado por la enfermedad o afección. Del mismo modo, las enfermedades y las afecciones mediadas por IL-17 son las
- 10 enfermedades y afecciones que son exacerbadas por los altos niveles de IL-17 o un aumento de los niveles IL-17, y que se alivian por los bajos niveles IL - 17 o una reducción en los niveles de IL -17. La respuesta inflamatoria de IL-17 puede ser local o sistémica.
- 15 Los ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden ser mediadas por IL-17 o por la vía Th17 incluyen la esclerosis múltiple; artritis, tales como la artritis reumatoidea, la osteoartritis, la artritis psoriásica, o la artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de
- 20 Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria del intestino, como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; enfermedad pulmonar obstructiva

crónica (COPD); cáncer, 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 el

5 rechazo del aloinjerto. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención se usan para tratar o prevenir una o más de estas afecciones o enfermedades. En otras realizaciones preferidas, estas afecciones o enfermedades están mediadas por IL-17 o por la vía Th17.

10 En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en un método para reducir la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o por la vía Th17. En ciertas realizaciones, las

15 composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, en donde dicho tratamiento o prevención se logra mediante la reducción o la prevención de la elevación de la respuesta inflamatoria de Th17. En ciertas

20 realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, en la que el paciente tiene niveles elevados de IL-17 o células Th17 elevadas o exhibe una respuesta inflamatoria de Th17. En ciertas realizaciones,

el paciente puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección crónica inflamatoria o autoinmunitaria, o la composición de la invención puede ser para uso en la prevención de que una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria se convierta en una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección pueden no ser sensibles al tratamiento con inhibidores de TNF- α . Estos usos de la invención pueden aplicarse a cualquier enfermedad o afección específica enumerada en el párrafo anterior.

IL-17 y la vía Th17 se asocian a menudo con enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias crónicas, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones crónicas como se indicaron anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en pacientes con enfermedad crónica. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas.

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o por la vía Th17 y para hacer frente a la respuesta inflamatoria de Th17, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento o prevención de la

enfermedad crónica, tratamiento o prevención de enfermedades en pacientes que no han respondido a otros tratamientos (tales como el tratamiento con inhibidores de $\text{TNF-}\alpha$), y/o tratamiento o prevención del daño de tejidos y síntomas asociados con las células Th17 e IL-17. Por ejemplo, IL-17 es conocida por activar la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo y la IL-17 tiene un efecto inhibidor sobre la producción de la matriz de condrocitos y osteoblastos, así que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación de los niveles de IL-17, en particular, los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación de los niveles de $\text{IFN-}\gamma$, IL- 1β , RANTES, MIP- 1α , IL-8 o IL-6. Tal reducción o prevención de los niveles elevados de estas citoquinas pueden ser útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunitarias, en particular las mediadas por IL-17 o por la vía Th17.

Asma

En realizaciones preferidas, las composiciones de la

invención son para uso en el tratamiento o la prevención del asma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en el reclutamiento de neutrófilos y/o eosinófilos en las vías respiratorias después de la sensibilización y la provocación con extracto de ácaros del polvo doméstico, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención del asma. El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación y la restricción de las vías respiratorias. La inflamación en el asma puede ser mediada por las células Th17 y/o IL-17, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces 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 eosinofílica o asma alérgica. El asma eosinofílica y el asma alérgica se caracterizan por el aumento de la cantidad de eosinófilos en sangre periférica y en las secreciones de las vías respiratorias y se asocia patológicamente con el espesamiento de la zona de la membrana basal y farmacológicamente por la capacidad de respuesta a los corticosteroides [26]. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento de eosinófilos o su activación pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma eosinofílica y el asma alérgica.

En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del asma neutrofílica (o el asma no eosinofílica). La alta cantidad de neutrófilos está asociada con el asma grave que puede ser insensible al tratamiento con corticosteroides. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento de neutrófilos o de su activación pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma neutrofílica.

El asma eosinofílica y el asma neutrofílica no son afecciones mutuamente exclusivas y tratamientos dirigidos a mejorar las respuestas de neutrófilos o bien la de eosinófilos pueden ser útiles para el tratamiento del asma en general.

El aumento de los niveles de IL-17 y la activación de la vía Th17 están asociados con el asma grave, por lo que las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma grave o para el tratamiento del asma grave.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en los métodos de reducción de una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma, o para uso en métodos para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma. Como se señaló anteriormente, los altos niveles de eosinófilos en el asma se asocian patológicamente con el

espesamiento de la membrana basal, por lo que la reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma puede ser capaz de tratar específicamente esta característica de la enfermedad. Además, los neutrófilos elevados, ya sea en combinación con eosinófilos elevados o en su ausencia, se asocian con asma grave y estrechamiento crónico de las vías respiratorias. Por lo tanto, la reducción de la respuesta inflamatoria neutrofílica puede ser particularmente útil para tratar el asma grave.

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

En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación en los niveles de IL-1 β , IFN γ , RANTES, MIP-1 α o IL-8.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en un método para tratar el asma que resulta en una reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica y/o neutrofílica. En ciertas realizaciones, el paciente a ser

tratado tiene, o ha sido previamente identificado con niveles elevados de neutrófilos o eosinófilos, por ejemplo como se identifica a través de muestras de sangre o análisis de esputo.

- 5 Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo del asma en un recién nacido cuando se administra al recién nacido o a una mujer embarazada. Las composiciones pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en niños. Las composiciones de la invención pueden
- 10 ser útiles para tratar o prevenir asma en adultos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para el control o alivio del asma. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el asma que se agrava por alérgenos, tales como
- 15 los ácaros del polvo doméstico.

Tratamiento o prevención del asma pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o la amplitud de factores desencadenantes que son un problema para el

20 paciente.

Artritis

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención de la artritis reumatoidea (AR). Los ejemplos demuestran que las

composiciones de la invención logran una reducción de los signos clínicos de AR en un modelo de ratón, reducen el daño en el cartílago y en los huesos, y reducen la respuesta inflamatoria de IL-17, por lo que pueden ser útiles en el

5 tratamiento o la prevención de AR. AR es un trastorno inflamatorio sistémico que afecta principalmente a las articulaciones. AR está asociada con una respuesta inflamatoria que resulta en la inflamación de las articulaciones, la hiperplasia sinovial y la destrucción de

10 cartílago y hueso. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la AR, por ejemplo debido a que IL-17 inhibe la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos y activa la producción y la función de las metaloproteinasas de la matriz y porque la actividad de la enfermedad AR se

15 correlaciona con niveles de IL-17 y cantidades de células Th-17 [27,28], por lo tanto las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para la prevención o el tratamiento de la AR.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención

20 son para uso en la reducción de los niveles de IL-17 o la prevención de la elevación de los niveles de IL-17 en el tratamiento o la prevención de AR. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación de los niveles de IL-17,

en particular, los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación de los niveles de IFN- γ o de IL-6.

5 En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción de la inflamación de las articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en pacientes con inflamación en las articulaciones o los pacientes
10 identificados en riesgo de tener inflamación de las articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en un método para reducir la inflamación de las articulaciones en la AR.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las
15 composiciones de la invención resulta en una reducción en el daño del cartílago o el daño de los huesos. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención del daño del cartílago o del daño óseo en el tratamiento de la AR. En ciertas
20 realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con AR grave que están en riesgo de daño del cartílago o erosión del hueso.

El aumento de los niveles de IL-17 y la cantidad de células Th17 están asociados con la destrucción del cartílago y la

destrucción ósea en la AR [27,28]. IL-17 es conocida por activar la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo e IL-17 tiene un efecto inhibidor sobre la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de la erosión ósea o el daño del cartílago en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes que presentan erosión ósea o el daño del cartílago o los pacientes identificados con riesgo de erosión ósea o daño del cartílago.

TNF- α también se asocia con la AR, pero TNF- α no está implicada en la patogénesis de las etapas posteriores de la enfermedad. Por el contrario, IL-17 tiene un papel en todas las etapas de la enfermedad crónica [29]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de la AR crónica o la AR de última etapa, tal como es la enfermedad que incluye la destrucción articular y pérdida de cartílago. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para el tratamiento de pacientes que han recibido previamente terapia anti-TNF- α . En ciertas realizaciones, los pacientes a ser tratados no responden o han dejado de responder a la terapia anti-TNF- α . Las composiciones de la invención pueden ser útiles para

modular el sistema inmunitario de un paciente, por lo que en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de AR en un paciente que ha sido identificado en riesgo de desarrollar AR, o que ha sido
5 diagnosticado con AR en etapa temprana. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de la AR.

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para el control o el alivio de la AR. Las composiciones de la
10 invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la inflamación de las articulaciones o la destrucción ósea. Tratamiento o prevención de AR pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o
15 la amplitud de factores desencadenantes que son un problema para el paciente.

Esclerosis múltiple

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de
20 la esclerosis múltiple. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en la incidencia de la enfermedad y gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple (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 un daño a las vainas de mielina de las neuronas, en particular en el cerebro y la columna vertebral. La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, que es progresivamente incapacitante y que evoluciona en episodios. Las células Th17 e IL-17 pueden tener un papel clave en la esclerosis múltiple, por ejemplo, debido a que los niveles de IL-17 se pueden correlacionar con las lesiones de la esclerosis múltiple, IL-17 puede perturbar uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y las células Th17 pueden migrar hacia el sistema nervioso central y causar la pérdida neuronal [30,31]. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción de la incidencia de la enfermedad o la gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción de la incidencia de la enfermedad o gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención evita una disminución de la función motora o da como resultado una función motora mejorada. En ciertas

realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de una disminución de la función motora o para uso en la mejora de la función motora. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención previene el desarrollo de parálisis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

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

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para el control o el alivio de la esclerosis múltiple. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la esclerosis

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

Cáncer

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. IL-17 y la vía Th17 tienen papeles centrales en el desarrollo y progresión del cáncer, y por lo tanto las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir el cáncer.

Aunque las funciones de las células Th17 e IL-17 en el cáncer no se conocen completamente, si se conocen numerosos efectos protumorales de las células Th17 e IL-17. Por ejemplo, las células Th17 e IL-17 pueden promover la angiogénesis, aumentar la proliferación y supervivencia de las células tumorales y activar factores de transcripción promotores de tumores [32-34].

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en el tamaño del tumor o una reducción en el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción de tamaño del tumor o la

reducción del crecimiento tumoral. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para reducir el tamaño del tumor o su crecimiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en pacientes

5 con tumores sólidos. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer. Las células Th17 e IL-17 tienen un papel central en la angiogénesis. En ciertas realizaciones, las composiciones de

10 la invención son para uso en la prevención de la metástasis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para el tratamiento de cáncer de mama, y las células Th17 e

15 IL-17 tienen un papel importante en el cáncer de mama [35]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción del tamaño del tumor, la reducción del crecimiento tumoral, o la reducción de la angiogénesis en el tratamiento de cáncer de mama. En

20 realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de mama. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama de etapa IV.

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

pulmón. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para el tratamiento de cáncer de pulmón, y las células Th17 e IL-17 tienen un papel importante en el cáncer de pulmón [36].

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención

5 son para uso en la reducción de tamaño del tumor, la reducción del crecimiento tumoral, o la reducción de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de pulmón. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de pulmón.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención

10 son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de hígado. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para el tratamiento del cáncer de hígado, y las células Th17 e IL-17 tienen un papel importante en el cáncer de hígado [37]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la

15 invención son para uso en la reducción de tamaño del tumor, la reducción del crecimiento tumoral, o la reducción de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de hígado. En realizaciones preferidas, el cáncer es un hepatoma (carcinoma hepatocelular).

20 En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del carcinoma. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para el tratamiento del carcinoma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso

en el tratamiento o la prevención del cáncer no inmunogénico. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para el tratamiento de cánceres no inmunogénicos.

En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de la leucemia aguda linfoblástica (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células basales, cáncer de conducto biliar, cáncer de vejiga, tumor óseo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco cerebral, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, méduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), tumor de células germinales, glioma infantil de las vías ópticas y del hipotálamo, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma de

células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, leucemias, linfomas, mesotelioma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer faríngeo, adenoma de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, sarcoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides, o cáncer de útero.

Las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces cuando se utilizan en combinación con otros agentes terapéuticos. Los efectos inmunomoduladores de las composiciones de la invención pueden ser eficaces cuando se combinan con agentes anticancerígenos más directos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* y un agente anticancerígeno. En realizaciones preferidas, el agente anticancerígeno es un inhibidor de punto de control inmune, una inmunoterapia específica de anticuerpos, una terapia CAR-T celular, un virus oncolítico, o un fármaco citostático. En 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); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ / MedImmune);
 BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (urelumab, BMS); IMP321 (Prima
 5 Biomed); LAG525 (Novartis); ArgX-110 (Argen-X); PF-05082466
 (Pfizer); CDX-1127 (varlilumab; Celldex Therapeutics); TRX-
 518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce
 Therapeutics); ArgX-115 (Argen-X); NLG-9189 (indoximod,
 NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innata
 10 Immotherapeutics / AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); anti-
 VISTA (JnJ); Epacadostat (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus
 / BMS); CP 870893 (Universidad de Pensilvania); MGA271
 (Macrogenix); Emactuzumab (Roche / Genentech); Galunisertib
 (Eli Lilly); Ulocuplumab (BMS); BKT140 / BL8040 (Biokine
 15 Therapeutics); Bavituximab (Peregrine Pharmaceuticals); 90002
 CC (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx
 Pharmaceuticals); OMI-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals);
 LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Universidad de Mujeres de
 Ewha, Korea); Vemurafenib (Plexxikon); Dabrafenib (Genentech
 20 / 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); Kadcylla (emtansina ado-trastuzumab, Roche /

Genentech); Perjeta (pertuzumab, Roche / Genentech); Adcetris
 (vedotina Brentuximab, Takeda / Milenio); Arzerra
 (ofatumumab, GSK); Vectibix (panitumumab, Amgen); Avastin
 (bevacizumab, Roche / Genentech); Erbitux (cetuximab, BMS /
 5 Merck); Bexxar (tositumomab-I131, GSK); Zevalin (ibritumomab
 tiuxetan, Biogen); Campath (alemtuzumab, Bayer); Mylotarg
 (gemtuzumab ozogamicina, Pfizer); Herceptin (trastuzumab,
 Roche / Genentech); Rituxan (rituximab, Genentech / Biogen);
 volociximab (Abbvie); Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414
 10 (Abbvie); Elotuzumab (Abbvie / BMS); ALX-0141 (Ablynx);
 Ozaralizumab (Ablynx); Actimab-C (Actinium); Actimab-P
 (Actinium); Milatuzumab-Dox (Actinium); EmaB-SN-38
 (Actinium); estafenatox Naptumonmab (Active Biotech); AFM13
 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F
 15 (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);

5 Sibrotuzumab (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BIIB015 (Biogen); Obinutuzumab (Biogen / Genentech); BI-505 (BioInvent); BI-1206 (BioInvent); TB-403 (BioInvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Necitumumab

10 (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); patritumab (Daiichi Sankyo); tigatuzumab (Daiichi Sankyo); nimotuzumab (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORAb-004

15 (Eisai); MORAb-009 (Eisai); MORAb-003 (Eisai); MORAb-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); cixutumumab (Eli Lilly); Flanvotumab

20 (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); Ramucirumab (Eli Lilly); Tabalumab (Eli Lilly); Zanolimumab (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); catumaxomab (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027

(Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745
 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (demcizumab, GSK);
 mapatumumab (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen);
 IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130
 5 (Immunomedics); milatuzumab-dox (Immunomedics); IMMU-115
 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106
 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); Epratuzumab
 (Immunomedics); Clivatuzumab (Immunomedics); IPH41 (Innate
 Immunotherapeutics); Daratumumab (Janssen / Genmab); CNTO-95
 10 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (siltuximab, Janssen); KB004
 (KaloBios); mogamulizumab (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871
 (ecromeximab, Life Science); Sonepcizumab (Lpath);
 Margetuximab (Macrogenics); Enoblituzumab (Macrogenics);
 MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); MK-0646
 15 (dalotuzumab, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen /
 Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys);
 MOR202 (Morphosys); Xmab5574 (Morphosys); BPC-1C
 (ensituximab, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102
 (Novartis); BHQ880 (Novartis / Morphosys); QGE031 (Novartis);
 20 HCD122 (lucatumumab, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355
 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51
 (OncoMed / GSK); OMP-59R5 (OncoMed / GSK); vantictumab
 (OncoMed / Bayer); CMC-544 (inotuzumab ozogamicina, Pfizer);
 PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC

(Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (nesvacumab, Regeneron / Sanofi); REGN421 (enoticumab, Regeneron / Sanofi); RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (parsatuzumab), RG7160 (imgatuzumab), RG7159 (obintuzumab), RG7686, RG3638 (onartuzumab), RG7597 (Roche / Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi), SGN-LIV1A (lintuzumab, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotin, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); MAR-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); TCR NY-ESO (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Cellestis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNAtrix); 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);

5 REOLYSIN (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, ácido folínico, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, Zykadia (Novartis), Tafenlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Gilotrif (Boehringer

10 Ingelheim), Tarceva (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), Veliparib (Abbvie), AZD9291 (AZ), Alectinib (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetespib (Synta Pharma), Tergenpumatucel-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), Tivantinib (ArQule); Cytosan (BMS); Oncovin (Eli Lilly);

15 Adriamicina (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (Debiopharm); Taxotere (Sanofi); Nexavar (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Thermodox (Celsion); Cometriq (Exellxis); Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT

20 (Taiho Pharmaceuticals); y TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

Uveítis

En otras realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis. Las composiciones de la invención pueden lograr

una reducción de la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad en un modelo animal de uveítis y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la uveítis. La uveítis es una inflamación de la úvea y puede

5 resultar en la destrucción del tejido de la retina. Se puede presentar en diferentes formas anatómicas (anterior, intermedia, posterior o difusa) y resultar de causas diferentes, pero relacionadas, incluso trastornos autoinmunitarios sistémicos. IL-17 y la vía Th17 están

10 implicadas centralmente en la uveítis, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para la prevención o tratamiento de la uveítis. Las referencias [38-45] describen niveles elevados de interleucina-17A en el suero en pacientes con uveítis, la

15 asociación específica de variantes genéticas de IL17A con panuveítis, el papel de las citoquinas asociadas a Th17 en la patogénesis de la uveítis autoinmune experimental, el desequilibrio entre las células Th17 y las células T reguladoras durante la uveítis experimental autoinmune

20 monofásica, la regulación por aumento de IL-17A en pacientes con uveítis y activación de las enfermedades de Adamantiades- Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), el tratamiento de la uveítis no infecciosa con secukinumab (anticuerpo anti-IL-17A) y Th17 en la uveítis ocular.

En ciertas realizaciones, la uveítis es la uveítis posterior.

La uveítis posterior se presenta principalmente con la inflamación de la retina y las coroides y las composiciones de la invención pueden ser eficaces para reducir la inflamación de la retina y los daños ocasionados por esta.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción de los daños en la retina. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención de daños en la retina en el tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con uveítis grave que están en riesgo de daños en la retina. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción de la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención de la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción de la infiltración del tejido de la retina por las células inflamatorias. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción de la infiltración del tejido de la retina por las células inflamatorias. En ciertas realizaciones, el tratamiento con

las composiciones de la invención conducen a mantener o mejorar la visión. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el mantenimiento o la mejora de la visión.

- 5 En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis asociada con una enfermedad no infecciosa o autoinmunitaria, como la enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, iridociclitis heterocrómica de Fuchs, granulomatosis de Wegener, uveítis
- 10 relacionada con HLA-B27, artritis idiopática juvenil, sarcoidosis, espondiloartritis, oftalmía simpática, nefritis tubulointersticial y síndrome de uveítis o síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada. IL-17A se ha demostrado estar implicada en, por ejemplo, Behçet y enfermedades de Vogt-Koyanagi-Harada.
- 15 Tratamiento o prevención de la uveítis pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una prevención de la recaída.

Modos de administración

- Preferiblemente, las composiciones de la invención son para
- 20 ser administradas al tracto gastrointestinal con el fin de permitir la administración y/o la colonización parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención. En general, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero se pueden administrar por vía rectal,

intranasal, o por medio de administración bucal o sublingual.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar en forma de espuma, aerosol o gel.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en forma de un aceite de teobroma (mantequilla de cacao), grasa dura sintética (por ejemplo, Suppocire, Witepsol), glicero-gelatina, polietilenglicol, o una composición de jabón de glicerina.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra en el tracto gastrointestinal a través de un tubo, tal como un tubo nasogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (sonda J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG, por sus siglas en inglés), o un puerto, como un puerto en la pared del pecho que proporciona acceso al estómago, yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o se pueden administrar de forma secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para administración diaria. En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento según la invención, se acompaña de la evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede

repetirse si la administración y/o la colonización parcial o total con la cepa de la invención no se logra, de manera que no se observa eficacia, o el tratamiento puede cesarse si la administración y/o la colonización parcial o total es exitosa y se observa su eficacia .

En ciertas realizaciones, la composición de la invención se puede administrar a un animal preñado, por ejemplo un mamífero tal como un ser humano, con el fin de prevenir una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en desarrollo en su hijo en el útero y/o después de su nacimiento.

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

Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido identificado con una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener colonización por *Bacteroides* reducida o ausente, y, en particular de *Bacteroides coprocola*.

Las composiciones de la invención se pueden administrar como

un producto alimenticio, tal como un suplemento nutricional.

Generalmente, las composiciones de la invención son para el tratamiento de los seres humanos, aunque se pueden usar también para tratar animales que incluyen mamíferos monogástricos, tales como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los animales. Si se administra a animales, se puede utilizar administración por sonda oral (gavaje).

10 ***Composiciones***

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

Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de las bacterias es un procedimiento bien establecido y las directrices pertinentes están disponible en, por ejemplo, las referencias [46-48].

Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano vivo y activo.

En realizaciones preferidas, la composición de la invención

está encapsulada para permitir la descarga de la cepa bacteriana en el intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la administración en la ubicación de destino a través de, por ejemplo, la ruptura con
5 estímulos químicos o físicos, tales como la presión, la actividad enzimática, o la desintegración física, que pueden ser provocadas por los cambios en pH. Cualquier método de encapsulación apropiado puede ser utilizado. Las técnicas de encapsulación de ejemplo incluyen atrapamiento dentro de una
10 matriz porosa, unión o adsorción en las superficies del portador sólido, la autoagregación por floculación o con agentes de reticulación, y la contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. Las directrices sobre la encapsulación que pueden ser útiles para preparar
15 composiciones de la invención están disponible en, por ejemplo, las referencias [49] y [50].

La composición se puede administrar por vía oral y puede estar en la forma de un comprimido, tableta, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque los
20 *Bacteroides* son anaerobios. Otros ingredientes (como la vitamina C, por ejemplo) pueden ser incluidos como depuradores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar la administración y/o la colonización parcial o total y la supervivencia *in vivo*. Alternativamente, la composición

probiótica de la invención puede administrarse por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, como leche o un producto lácteo fermentado a base de suero de leche, o como un producto farmacéutico.

- 5 La composición se puede formular como un probiótico.

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

Una dosis diaria adecuada de las bacterias, por ejemplo para
15 un ser humano adulto, puede ser de aproximadamente 1×10^3 hasta aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés); por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 hasta aproximadamente 1×10^{10} CFU; en otro ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 hasta
20 aproximadamente 1×10^{10} CFU.

En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{11} CFU/g, respecto al peso de la composición; por ejemplo, de aproximadamente 1×10^8 a

aproximadamente 1×10^{10} CFU/g. La dosis puede ser, por ejemplo, 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

Típicamente, un probiótico, tal como la composición de la invención, se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico es normalmente un carbohidrato no digerible tal como un oligo- o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no se degrada o se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como la inulina y transgalactooligosacáridos.

En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 % en peso, respecto al peso total de la composición, (por ejemplo de 5 a 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), quitooligosacáridos (o COS), betaglucanos, almidones resistentes y modificados con goma arábica, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarrobo, avena y fibras de cítricos. En un aspecto, los prebióticos son fructooligosacáridos de cadena corta (por simplicidad, se muestran en el presente documento a

continuación como FOSs-c.c); dichos FOSs-c.c. no son carbohidratos digeribles, son obtenidos generalmente mediante la conversión del azúcar de remolacha e incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

5 Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales excipientes adecuados se pueden encontrar en la referencia [51]. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son conocidos en la técnica farmacéutica
10 y se describen, por ejemplo, en la referencia [52]. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del portador,
15 excipiente o diluyente puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y a la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, portador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante/s, lubricante/s, agente/s de suspensión, agente/s
20 de recubrimiento, o agente/s solubilizante/s. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, 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.

5 Conservantes, estabilizantes, colorantes y agentes aromatizantes también se pueden proporcionar en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Antioxidantes y agentes de suspensión
10 pueden ser también utilizados.

Las composiciones de la invención pueden formularse como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la invención, tal como en un suplemento
15 nutricional. Del mismo modo, un producto alimenticio puede ser formulado para mejorar el sabor de la composición de la invención o para hacer la composición más atractiva para el consumo por ser más similar a un alimento común, en lugar de a una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la
20 composición de la invención se formula como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier líquido o producto a base de suero o leche semisólida que tiene un contenido de grasa variable. El producto a base de leche puede ser leche, por ejemplo, leche

de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche descremada, leche entera, leche recombineda de leche en polvo y suero sin ningún tratamiento, o un producto procesado, tales como yogur, leche cuajada, requesón, leche agria, leche entera
5 agria, suero de mantequilla y otros productos lácteos agrios. Otro grupo importante incluye bebidas lácteas, tales como bebidas de suero de leche, leches fermentadas, leches condensadas, leches para niños o bebés; leches saborizadas, helados; alimentos tales como dulces que contienen leche.

10 En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen una sola cepa o especie bacteriana y no contienen otras cepas bacterianas o especies. Dichas composiciones pueden comprender solo cantidades biológicamente irrelevantes o mínimas de otras cepas bacterianas o especies. Tales
15 composiciones pueden ser un cultivo que esté sustancialmente libre de otras especies de organismos.

Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden o no requerir aprobación regulatoria para su comercialización.

20 En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada se reconstituye antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito en este documento.

Las composiciones de la invención pueden comprender

excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana
5 de la 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 se selecciona del grupo que consiste en: asma, asma
10 alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD),
15 cáncer, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behçet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica, y el rechazo de aloinjertos.

20 En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la 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 afección mediada por IL-17 o por la vía Th17. En 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 ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis juvenil idiopática, 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, cáncer de ovarios, uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behçet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica, y el rechazo de aloinjertos.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la cantidad de la cepa bacteriana es de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo, con respecto al peso de la composición.

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

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la

composición farmacéutica anterior, en donde la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en oral, rectal, subcutánea, nasal, bucal y sublingual.

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

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

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la
15 composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste de almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, betalactosa, edulcorante de maíz, goma arábica, tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol,
20 oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de: un conservante, un antioxidante y un

estabilizador.

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

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

10 En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde, cuando la composición se almacena en un recipiente sellado a aproximadamente 4 °C o sobre 25 °C, y el recipiente se coloca en una atmósfera con 50 % de humedad relativa, al menos 80 %
15 de la cepa bacteriana, medida en unidades formadoras de colonias, permanece después de un período de al menos aproximadamente: 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

Métodos de cultivo

20 Las cepas bacterianas para uso en la presente invención pueden ser cultivadas utilizando técnicas estándar de microbiología que se detallan en, por ejemplo, las referencias [53-55].

Las cepas bacterianas de género *Bacteroides* pueden cultivarse

utilizando un método como el que se describe a continuación, que puede proporcionar un buen crecimiento y fiabilidad. Este método es particularmente útil para el cultivo de cepas de la especie *Bacteroides coprocola*.

- 5 Las cepas bacterianas del género *Bacteroides*, y en particular las de la especie *Bacteroides coprocola*, pueden cultivarse mediante el uso de un caldo de cultivo para inocular la placa (o un cultivo líquido más grande), en lugar de la formación de estrías de un caldo congelado como generalmente se utiliza
- 10 (ver, por ejemplo, la referencia [56]). El establecimiento de colonias maduras es confiable y rápido si los caldos congelados de cepas de *Bacteroides* se descongelan y se utilizan como un cultivo líquido.

Un método adecuado para el cultivo de una cepa bacteriana del

15 género *Bacteroides* puede comprender:

- (a) proporcionar un caldo congelado de la cepa bacteriana;
- (b) descongelar el caldo congelado para proporcionar un cultivo líquido;
- (c) añadir el cultivo líquido a un medio sólido o líquido; e
- 20 (d) incubar los medios sólidos o líquidos para proporcionar un cultivo de la cepa bacteriana.

Este método es particularmente útil para el cultivo de cepas bacterianas de *Bacteroides coprocola*.

El caldo congelado puede ser un caldo de glicerol congelado.

El medio sólido o líquido puede ser agar YCFA o medio YCFA.

El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): casitona (1,0 g), extracto de levadura (0,25 g), NaHCO_3 (0,4 g), cisteína (0,1 g), K_2HPO_4 (0,045 g), KH_2PO_4 (0,045 g), NaCl (0,09 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 g), CaCl_2 (0,009 g), 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).

La incubación en la etapa (d) puede llevarse a cabo durante al menos 36 horas, tal como 48 o 72 horas. La incubación en la etapa (d) puede llevarse a cabo en un ambiente anaeróbico, tal como una campana anaeróbica. El cultivo proporcionado en la etapa (d) se puede utilizar para subcultivar un cultivo mayor de la cepa bacteriana. Tal subcultivo permite preparar mayores cantidades de bacterias y pueden ser útiles para proporcionar composiciones de la invención a una escala comercial.

La descongelación en la etapa (b) puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o mediante calentamiento a mano.

La cantidad de material líquido añadido en la etapa (c) puede ser de entre 300 μl y 5 ml, tal como 500 μl . El caldo puede ser de un 20 % de caldo de glicerol.

El método anterior puede ser utilizado para la preparación de una composición farmacéutica o un producto alimenticio, en

- cuyo caso el procedimiento puede comprender etapas adicionales de aislamiento de la cepa bacteriana, liofilización opcional de la cepa bacteriana, y la combinación de la cepa bacteriana con uno o más excipientes o
- 5 portadores farmacéuticamente aceptables, o una o más sustancias alimenticias. Esta composición farmacéutica o producto alimenticio preparado por el método puede utilizarse en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17.
- 10 Un método de ejemplo de cultivo de cepas bacterianas del género *Bacteroides*, y en particular de la especie *Bacteroides coprocola*, puede comprender:
1. 500 µl de 20 % de caldo glicerol es plaqueado en agar YCFA.
 - 15 2. Las placas se dejan en la campana anaeróbica durante 48/72 horas para generar colonias maduras.
 3. Las bacterias se cultivan en volúmenes de 10 ml, ya sea de una sola colonia o de un subcultivo líquido al 1 %.
 4. Las placas con colonias solo se utilizan 2/3 días después
 - 20 de que se logra la morfología de colonia madura.

Cepas bacterianas para uso en composiciones de vacuna

Los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la invención son útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Esto es probable

que sea un resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen en el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones de la invención también pueden ser útiles para la prevención de enfermedades o

5 afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17, cuando se administran como composiciones de vacuna. En algunas de dichas realizaciones, las cepas bacterianas de la invención pueden ser destruidas, inactivadas o atenuadas. En dichas realizaciones, las composiciones pueden comprender un

10 adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración mediante inyección, tal como a través de una inyección subcutánea.

General

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se

15 indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, las referencias [57] y [58-64], etc.

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

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,
5 la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo en la
10 comparación de las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencias puede determinarse utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de ref. [65]. Una alineación preferencial es determinada por el
15 algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se describe en la ref. [66].

20 A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende numerosas etapas pueden comprender pasos adicionales al principio o al final del método, o puede comprender pasos intermedios adicionales. Además, los pasos se pueden combinar, omitir o llevarse a cabo en un orden

alternativo, si es apropiado.

Diversas realizaciones de la invención se describen en el presente documento. Se apreciará que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones destacadas en el presente documento como adecuadas, típicas o preferidas se pueden combinar entre sí (excepto cuando son mutuamente excluyentes).

10 MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo 1 - Eficacia de los inóculos de bacterias en un modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo de la casa

Resumen

15 A los ratones les fueron administradas composiciones que comprendían cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se provocaron con extractos de ácaros del polvo doméstico (HDM, por sus siglas en inglés) para provocar una respuesta inflamatoria alérgica. La respuesta
20 inflamatoria a HDM incluye componentes de eosinófilos y neutrófilos, está mediada por IL-17 y la vía Th17, y es un modelo para el asma. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con composiciones de la invención se compararon con los grupos de

control. Se descubrió que las composiciones de la invención son útiles para aliviar la respuesta inflamatoria, y para reducir el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos, lo que indica que pueden ser también útiles para el tratamiento de

5 afecciones mediadas por IL-17 y Th17, tales como la eosinofilia, neutrofilia y el asma.

Cepa

675: *Bacteroides coprocola*

10 **Diseño del estudio**

Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con el control del vehículo (por vía oral).
3. Tratamiento con inóculo de bacterias terapéuticas de cepa
- 15 675 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (intraperitoneal).
8. Grupo control sin tratar.

Cantidad de ratones por grupo = 5

20

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

Día -14 a día 13: administración diaria de inóculo de bacterias terapéuticas por vía oral (Grupo 2-6).

Día 0, 2, 4, 7, 9, 11: administración de 15 ug de HDM (extracto de ácaro del polvo de casa - número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231 897, Greer Laboratories, Lenoir, Carolina del Norte, EE.UU.) en un volumen de 30 ul de
5 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 su análisis.

10 Cantidad total de ratones = 40.

Criterios de evaluación y análisis

En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal letal con pentabarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por
15 un lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés).

Las células fueron aisladas del fluido de BAL (lavado broncoalveolar) y un se llevó a cabo un conteo celular diferencial (conteo de 200 células/muestras).

Material y métodos

20 **Ratones.** Ratones hembra Balb/c de 7 semanas de edad fueron adquiridos de Charles River Laboratories y se asignaron al azar a jaulas, con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas procedentes de Indulab AG, Gams, Suiza, tipo jaula: "The Sealsafe™" - jaula IVC. Número del producto

1248L.). Las jaulas se marcaron con el número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del experimento. Los ratones se controlaron semanalmente y se aclimataron a las instalaciones durante 7 días antes del inicio del estudio (Día -14 del estudio). Los animales tenían 8 semanas de edad el Día -14 del estudio. El agua potable y los alimentos estaban disponibles ad libitum. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. El cuidado diario de los animales se realizó de acuerdo con el número de licencia de autorización local 2283.1 (emitido y aprobado por: *Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud*). El agua potable y los alimentos estaban disponibles ad libitum y se renovaban una vez por día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Se cumplieron las regulaciones de bienestar animal como lo indican las autoridades oficiales de Suiza, conforme a la ordenanza 455.163 de la FVO (Oficina Federal Veterinaria) para la cría de animales de laboratorio, producción de animales modificados genéticamente y los métodos de experimentación con animales.

El cultivo del inóculo de bacterias. En una estación de trabajo estéril, un criovial de bacterias se descongeló por calentamiento en mano enguantada y ~ 0,7 ml del contenido fueron inyectados en un tubo Hungate (número de cat, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que

contenía 8 ml de YCFA anaeróbico. Habitualmente se prepararon dos tubos por cepa. Luego, los tubos Hungate se incubaron (estática) a 37 °C durante un máximo de 24-26 horas (para la cepa 675).

5 Dado que se descubrió que las OD bacterianas del inóculo de la cepa 675 eran variables, 3 enfoques diferentes de cultivo se realizaron cada día. 2 viales se cultivaron como se ha descrito anteriormente y una tercera muestra se cultivó utilizando una alícuota de 400 ul del cultivo del día
10 anterior para la siembra. En 4 días de tratamiento se utilizó el último enfoque, a causa de un crecimiento pobre del caldo congelado. Debe destacarse que este enfoque dio lugar a un fuerte crecimiento de la cepa bacteriana 675 en todas las ocasiones.

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

Administración del inóculo de bacterias o vehículo de control. 400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o vehículo
20 de control se administraron por día mediante sonda oral.

Sensibilización intranasal. Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con 9,75 mg de XYLASOL y 48,75 mg por kg de ketasol (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y se administraron con 15 ug de HDM (número de catálogo:

XPB70D3A25, número de lote: 231 897, Greer Laboratories, Lenoir, Carolina del Norte, EE.UU.) en un volumen de 30 ul de PBS por vía nasal.

Preparación y administración del compuesto de control

5 **positivo dexametasona.** La sal de 21-fosfato disódico de dexametasona (Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159, número de lote SLBD.1030V) se disolvió en H₂O y se administró a los animales en una dosis de 3 mg/kg en un volumen de 200 ul por vía oral en los días indicados en el protocolo de estudio
10 anterior.

Procedimiento terminal. En el día 14, los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal letal con pentabarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por lavado bronco alveolar (BAL) en
15 500 ul de solución salina.

Medición de infiltrados celulares en BAL. Las células fueron aisladas de los fluidos BAL y se realizaron conteos diferenciales de células en función de criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

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

Resultados y análisis

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

No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones
5 tratados con la bacteria o con el vehículo. Los dos
controles, el tratamiento con vehículo (control negativo) y
el tratamiento con dexametasona (control positivo) se
comportaron como se esperaba, con eosinofilia y neutrofilia
alterada observada después del tratamiento con dexametasona.
10 Los resultados más importantes de este experimento se
muestran en las Figuras 6 y 7, que informan sobre la cantidad
total y el porcentaje de neutrófilos detectados en el lavado
bronquiolar después de la provocación con HDM. La cepa 675
redujo los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos
15 en BAL en relación con el control del vehículo solamente.

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

Resumen

Los ratones fueron administrados con composiciones que
20 comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y
posteriormente se sensibilizaron con las administraciones
subcutáneas de extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) y
se provocaron con una administración intranasal de HDM con el
fin de modelar la respuesta inflamatoria del asma

neutrofílica grave. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se descubrió que las composiciones de la invención son eficaces para aliviar la respuesta inflamatoria, y en particular reducir el reclutamiento de neutrófilos, de una manera comparable con el control positivo que comprende las administraciones de anticuerpos anti-IL-17. Por tanto, los datos indican que las composiciones de la invención pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones mediadas por IL-17 y Th17, tales como neutrofilia y el asma.

Cepa

675: *Bacteroides coprocola*

Diseño del estudio

15 Grupos:

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

3. Tratamiento con inóculo de bacterias terapéuticas de cepa 675 (por vía oral).

20 7. Grupo de control positivo. Tratamiento anti-IL-17 (intraperitoneal).

8. Grupo de control sin tratar.

9: Ratones sanos (línea de referencia).

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

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

Día -14 a día 17: administración diaria de inóculo de bacterias terapéuticas por vía oral (Grupo 2-6).

Día 0: sensibilización con HDM en CFA (vía subcutánea) (Grupo 1-8).

Día 7: sensibilización con HDM en CFA (vía subcutánea) (Grupo 1-8).

Días 13, 15, 17: administración de anticuerpos anti-IL-17 neutralizantes por vía intraperitoneal (Grupo 7).

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 su análisis.

15

Criterios de evaluación y análisis:

En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal de pentabarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado bronco alveolar (BAL). Las células fueron aisladas del fluido BAL y se llevaron a cabo conteos de células diferenciales (conteo de 200 células/muestras).

Material y métodos.

Ratones. Ratones hembra C57BL/6 de 7 semanas de edad fueron

adquiridos de Charles River Laboratories y se asignaron al azar a jaulas, con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas procedentes de Indulab AG, Gams, Suiza, tipo de jaula: "The Sealsafe™ - jaula IVC". Número del producto 1248L.). Las jaulas se marcaron con el número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del experimento. Los ratones se controlaron semanalmente y se aclimataron a las instalaciones durante 7 días antes del inicio del estudio (Día -14 del estudio). Los animales tenían 8 semanas de edad en el día -14 del estudio. El agua potable y los alimentos estaban disponibles ad libitum. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. El cuidado diario de los animales se realizó de acuerdo con el número de licencia de autorización local 2283.1 (emitido y aprobado por: *Service de consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud*). El agua potable y los alimentos estaban disponibles ad libitum y se renovaban una vez por día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Se cumplieron las regulaciones de bienestar animal como se indica por las autoridades oficiales de Suiza, conforme a la ordenanza 455.163 de la OAV (Oficina Federal Veterinaria) en la cría de animales de laboratorio, producción de animales modificados genéticamente y los métodos de experimentación con animales.

El cultivo del inóculo de bacterias. En una estación de

trabajo estéril, un criovial de bacterias se descongeló mediante calentamiento en mano enguantada y ~ 0,7 ml de contenidos fueron inyectados en un tubo Hungate (número de cat, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico. Habitualmente se prepararon dos tubos por cepa. Luego, los tubos Hungate se incubaron (estática) a 37 °C durante un máximo de 24-26 horas (para la cepa 675).

Dado que se descubrió que las OD bacterianas del inóculo de la cepa 675 eran variables, 3 enfoques diferentes de cultivo se realizaron cada día. 2 viales se cultivaron como se ha descrito anteriormente y una tercera muestra se cultivó utilizando una alícuota de 400 ul del cultivo del día anterior para la siembra. En 4 días de tratamiento se utilizó el último enfoque, a causa de un crecimiento pobre del caldo congelado. Debe destacarse que este enfoque dio lugar a un fuerte crecimiento de la cepa bacteriana 675 en todas las ocasiones.

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

Administración de inóculo de bacterias o vehículo de control.

400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o vehículo de control se administraron por día mediante sonda oral.

Sensibilización con HDM. 50 µg de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231 897, Greer Laboratories, Lenoir, Carolina del Norte, EE.UU.) en PBS se emulsionó en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, EE.UU.) y se administró por vía subcutánea en un volumen de 200 µl, dos veces durante dos semanas en flancos opuestos. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con 9,75 mg de XYLASOL y 48,75 mg de cetazol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y se provocaron por vía intranasal con 15 µg de HDM en un volumen de 30 µl de PBS en 4 días consecutivos. El análisis se realizó un día después de la provocación final.

Preparación y administración del compuesto de control positivo anticuerpo IL-17 antirratón. El anticuerpo anti-IL-17 neutralizante se obtuvo de Bio X Cell y se almacenó a 4 °C (Clón 17F3, número de catálogo BE0173, Bio Cell X) y fue administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 12,5 mg/kg en los días indicados en el protocolo de estudio anterior.

Procedimiento terminal. En el día 18 los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal letal con pentabarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por lavado bronco alveolar (BAL) en

500 ul de solución salina.

Medición de infiltrados celulares en BAL. Las células fueron aisladas del fluido BAL y se llevaron a cabo conteos diferenciales de células en función de criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

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

Resultados y análisis

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

No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Como se muestra en las Figuras 15 y 16, la cepa 675 exhibió un gran efecto en la reducción de la cantidad total de neutrófilos en relación con los controles negativos. Además, la cepa 675 redujo la cantidad de eosinófilos en relación con los controles, como se muestra en las Figuras 11 y 12.

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

Materiales y métodos

Cepa

675: *Bacteroides coprocola*

Cultivos bacterianos

5 Los cultivos bacterianos se hicieron crecer hasta la administración en una estación de trabajo anaeróbico (Don Whitley Scientific) según el esquema de crecimiento que se muestra más adelante.

- Lunes / miércoles / viernes: transferir caldo de glicerol a
10 hielo y formar estrías en una placa YCFA de caldo de glicerol. Utilizar la placa de la siguiente manera para un máximo de 3 días.

- Diario PM: recoger una única colonia de cada cepa de cultivos de placas, transferir a tubo Hungate de 8 ml que
15 contiene YCFA durante la noche (ON1)

- AM: subcultura 80 ul (1 %) ON1 en un tubo fresco de 8 ml (DC1). Utilizar el cultivo ON1 para la sonda oral AM.

- PM: usar el cultivo DC1 para sonda oral PM.

La cepa bacteriana n.º 675 se cultivó utilizando caldos de
20 glicerina.

Los caldos de glicerol se almacenaron a -80 ° C. Tres veces por semana, los caldos de glicerol se descongelaron a temperatura ambiente y se formaron estrías en placas YCFA. Una nueva alícuota de glicerol se utilizó en cada ocasión.

Las bacterias se dejaron crecer en una placa dada durante hasta 72 horas.

Las soluciones para administrar a los animales se prepararon dos veces al día con un intervalo de ocho horas entre los
5 tratamientos de la mañana (AM) y los tratamientos de la tarde (PM). Una colonia bacteriana fue recogida de la placa por estrías y se transfirió a un tubo que contenía medios YCFA. La cepa bacteriana n.º 675 se dejó crecer durante 16 horas antes de las administraciones de AM. Las bacterias fueron
10 subcultivadas al 1 % en los medios YCFA para las administraciones PM. Los valores de OD se registraron para cada cepa después de los tratamientos con las preparaciones en la mañana y en la tarde.

Modelo de ratón de artritis inducida por colágeno tipo II

15 Ratones DBA/1 machos adultos fueron asignados al azar a los grupos experimentales y se dejaron aclimatar durante dos semanas. En el día 0, los animales fueron administrados con una inyección subcutánea 100 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de colágeno tipo II (CII) en
20 adyuvante incompleto de Freund con adición de 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. En el Día 21, los animales fueron administrados con una inyección subcutánea de una emulsión de refuerzo que contenía 100 µg de colágeno tipo II en adyuvante incompleto de Freund.

Los tratamientos se dieron de acuerdo con la pauta de administración que se muestra más adelante. Desde el Día -14 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se pesaron tres veces por semana. Desde el Día 21 hasta el final

5 del experimento, los animales se revisaron tres veces a la semana en busca de signos clínicos de artritis, que incluye inflamación de las patas delanteras y posteriores, y las articulaciones radio-carpiana (muñeca) y tibio-tarsiana (tobillo).

10 En el día 45 los ratones fueron sacrificados y se tomaron muestras de sangre terminales para el análisis de citoquinas. En el Día -14, el día 0 y el día 45, se recogieron muestras de heces para el análisis microbiológico, inmediatamente se congelaron de manera instantánea y se almacenaron a -80 °C.

15 El modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón establecido para la artritis reumatoidea [67]. La inmunización con CII causa una patogénesis que incluye varias características patológicas importantes de la artritis reumatoidea, que incluyen la hiperplasia sinovial,

20 la infiltración de células mononucleares y la degradación del cartílago. De manera significativa, el desarrollo de CIA está mediado por células Th17 a través de la secreción de IL-17A [68]. La respuesta inmunitaria subyacente al modelo de artritis se ve reforzada por la utilización del adyuvante de

Freund con adición de *Mycobacterium tuberculosis*.

En el día 21, los bazos se recogieron de tres animales satélites en cada grupo. Las células se cultivaron 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, se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo y en el suero terminal mediante Luminex. La proliferación celular se cuantificó usando un método de incorporación de timidina tritiada.

10 Grupos de tratamiento y dosis

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 era medio con extracto de levadura-Casitona-ácidos grasos (YCFA).

15

20

	Grupo	Dosis	Administración		Inducción de enfermedad
			Vía	Régimen	
1	Vehículo	5 ml/kg	PO	BID: Día -14*- Fin	Día 0: Colágeno/C FA, una vez, SC Día 21: Colágeno /IFA, una vez, SC
4	Agente bioterapéutico n.º 675	5 ml/kg			

PO: sonda oral, SC: inyección subcutánea, BID: dos veces al día, CFA: adyuvante completo de Freund. * Excepto Grupo 4
5 tratado desde el día 0.

Pesos corporales

Desde el Día -14 hasta el final del experimento, los animales se pesaron tres veces por semana. Los datos se representan
10 gráficamente (Media $\pm$ SEM).

Observaciones clínicas no específicas

Desde el día -14 hasta el final del experimento, los animales fueron controlados diariamente para detectar signos clínicos no específicos que incluyen una postura anormal (encorvada),
15 condiciones del pelaje anormal (piloerección) y niveles de actividad anormales (actividad reducida o incrementada).

Observaciones clínicas

Desde el Día 21 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se controlaron tres veces por semana en busca de
20 signos clínicos de artritis, que incluyen inflamación de las patas delanteras y posteriores, y las articulaciones (muñeca) radio-carpiana y tibio-tarsiana (tobillo). Cada extremidad se evalúa utilizando la siguiente escala: (0) normal (1) inflamación sutil, (2) inflamación leve, (3) inflamación

moderada e (4) inflamación grave. Un puntaje clínico se calculó sumando el puntaje de cada extremidad. El puntaje clínico máximo posible para un animal era (16). Se sacrificaron los animales con un puntaje igual a (12) en dos
5 ocasiones consecutivas y animales con un puntaje superior (12) en una sola ocasión. Los datos se representan gráficamente (media $\pm$ SEM).

Análisis de proliferación celular

En el día 21, tres animales satélites por grupo fueron
10 sacrificados y sus bazos fueron disecados. Las células del bazo se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Después de 72 horas, las células se pulsaron durante la noche en presencia de timidina tritiada. La proliferación celular se cuantificó midiendo la
15 incorporación de timidina. Los datos se representan gráficamente (Media $\pm$ SEM). Los sobrenadantes fueron tomados y analizados para detectar la presencia de citoquinas clave.

Análisis de citoquinas

Los sobrenadantes terminales de los cultivos de células de
20 bazo se analizaron con el fin de cuantificar TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 mediante Luminex. Los datos se representan gráficamente (Media $\pm$ SEM).

Análisis microbiológico

En el Día -14, el día 0 y el día 45, se recogieron muestras

fecales de cada animal, inmediatamente fueron congeladas de manera instantánea, y se almacenaron a -80°C . Los ciegos (que incluían el contenido) fueron congelados inmediatamente y se almacenaron a -80°C . Se realizó una prueba de
5 identificación bacteriana diaria mediante la siembra en placas de las bacterias.

Histopatología

Al final del experimento, las patas posteriores se almacenaron en fijador de tejidos. Las muestras se
10 transfirieron a una solución de descalcificación. Las muestras de tejido fueron procesadas, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron calificadas por un anatomopatólogo experimentado, ignorante del diseño experimental, en busca de signos de artritis que
15 incluía inflamación, daño del cartílago articular y daño al hueso metafisario subyacente. Se utilizó un sistema de puntaje detallado (véase más adelante). Los datos se representan gráficamente (Media $\pm$ SEM). Se proporcionaron
datos en bruto y analizados, así como imágenes
20 representativas.

Tabla 1: sistema de puntaje de histopatología

Grado Descripción	
Inflamación	
5	0 Articulación normal.
	1 Hiperplasia sinovial leve con la inflamación dominada por neutrófilos. Cantidades bajas de neutrófilos y macrófagos en el espacio articular.
10	2 Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que implica tanto neutrófilos como macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio articular; pueden haber algunos restos de tejido necrótico.
15	3 Hiperplasia sinovial con inflamación marcada que implica tanto neutrófilos y macrófagos. Pérdida de recubrimiento sinovial. La inflamación puede extenderse desde la sinovial a los tejidos circundantes, incluso el músculo. Numerosos neutrófilos y macrófagos en el espacio articular,
20	junto con restos de tejido necrótico significativos.
Daño del cartílago articular	

5	0	Articulación normal.
	1	El cartílago articular muestra cambios degenerativos leves. Formación temprana de pannus puede estar presente en la periferia.
	2	El cartílago articular muestra cambios degenerativos moderados y pérdida focal. Formación de pannus presente de manera focal.
10	3	Interrupción significativa y pérdida del cartílago articular con amplia formación de pannus.
años en el hueso metafisario subyacente		
15	0	Articulación normal.
	1	No hay cambios en el hueso metafisario subyacente.
	2	Puede haber necrosis focal o fibrosis del hueso metafisario.
20	3	Interrupción o colapso del hueso metafisario. Inflamación extensa, necrosis o fibrosis que se extiende al espacio medular de la metáfisis.

Resultados y análisis

Observaciones clínicas de supervivencia y no específicas

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

Un animal en el grupo 1 fue sacrificado (tratado con vehículo, el animal llegó del proveedor con la pierna rota).
Once animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis: cinco animales en el Grupo 1
10 (tratado con vehículo) y seis animales en el Grupo 4 (tratado con agente bioterapéutico n.º 675).

Cinco animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos no específicos, que incluyen la postura anormal (encorvada), las condiciones del pelaje anormal
15 (piloerección), los niveles de actividad anormales (reducción de la actividad): tres animales del Grupo 1 (tratados con vehículo) y dos animales en el Grupo 4 (tratados con agente bioterapéutico n.º 675).

Pesos corporales

20 Los datos del peso del cuerpo se registraron desde el Día -14 hasta el Día 0 y se expresaron como un porcentaje de los pesos corporales iniciales (Día -14) y se analizaron por ANOVA bidireccional seguido de la postprueba de Dunnett para comparaciones múltiples con Día -14 y a continuación, para

comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 19. Los datos de los animales sacrificados antes del final previsto del experimento fueron excluidos de los análisis.

- 5 En comparación con el día -14, dos administraciones diarias por sonda oral indujeron una pérdida significativa de peso corporal en el grupo tratado con vehículo en el día -9 y el día -7.

Los pesos corporales del Grupo 4 (sin tratar hasta el día 0,
10 luego tratado con el agente bioterapéutico n.º 675) fueron significativamente mayores que en el grupo tratado con vehículo desde el Día -11 hasta el Día -1 ($p < 0,0001$ excepto el día -4 donde $p < 0,05$).

Los pesos corporales medidos entre el día -14 y el día -1 en
15 los grupos tratados con el agente bioterapéutico no difieren de los pesos corporales medidos en el grupo tratado con vehículo en un día determinado.

Los datos de los pesos corporales registrados desde el día 0 hasta el día 28 y expresados como un porcentaje de los pesos
20 corporales iniciales (día 0), se analizaron por ANOVA bidireccional seguido de la postprueba de Dunnett para comparaciones múltiples con el día 0 en el grupo de vehículo, y luego para la comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 20. Los datos

de los animales sacrificados antes del final previsto del experimento y de los animales satélites fueron excluidos de los análisis. Los datos del Día 28, el día 35 y el día 42 fueron analizados por ANOVA unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo.

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

En comparación con el grupo tratado con vehículo, los pesos corporales fueron significativamente mayores en el Grupo 4 (tratado con agente bioterapéutico n.º 675) en el día 3, día 5, día 10 ($p < 0,05$) y el día 26 ($p < 0,001$).

Al analizar los datos por ANOVA unidireccional, los pesos corporales fueron significativamente mayores en el Grupo 4 (tratado con agente bioterapéutico # n.º 675) en comparación con el grupo tratado con vehículo en el día 28 ($p < 0,01$). No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales en el día 35 o el día 42.

Observaciones clínicas

Los datos de puntaje clínico se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la postprueba de Dunnett para comparaciones múltiples entre los días en el grupo tratado

con vehículo y a continuación para comparaciones múltiples entre los grupos experimentales y el grupo tratado con vehículo cada día. Los datos se presentan en la Figura 21. Los datos registrados de los animales sacrificados antes del
5 final del experimento fueron excluidos del análisis. Cuando los animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis, se informó del último puntaje registrado para los siguientes días y se utilizó en el análisis estadístico.

10 Se observó un aumento significativo de los puntajes clínicos en el grupo tratado con vehículo desde el día 28 hasta el día 45 ($p < 0,0001$) en comparación con el día 21.

El agente bioterapéutico n.º 675 no redujo los puntajes clínicos en comparación con el grupo tratado con vehículo.

15 Los animales de este grupo fueron inmunizados en un momento diferente en comparación con otros grupos experimentales, lo que puede explicar los puntajes clínicos más altos observados.

Análisis de proliferación celular

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

Se observaron respuestas proliferativas fuertes a anti-

CD3/CD28 en todos los grupos experimentales, lo que muestra que las células estaban sanas, viables y capaces de responder a las señales de activación.

Para analizar la respuesta proliferativa en presencia de colágeno II (CII), los esplenocitos se cultivaron en presencia de CII a 50 µg/ml. La respuesta proliferativa de los esplenocitos a CII se analizó por ANOVA bidireccional seguido de la postprueba de Sydak para comparaciones múltiples entre los esplenocitos no estimulados y estimulados con CII y ANOVA unidireccional, seguido de postprueba de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada por CII en diferentes grupos experimentales con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 22.

CII induce un aumento muy significativo de la incorporación de ³H-timidina (cpm) en comparación con los esplenocitos no estimulados en el grupo tratado con vehículo ($p < 0,0001$).

La proliferación de esplenocitos para el grupo tratado con el agente bioterapéutico n.º 675 se estableció en un día diferente, por lo tanto, la comparación con el grupo tratado con vehículo no fue preformada, aunque se observó una notable reducción.

Niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de tejidos

Los niveles de cada citoquina se midieron en los

sobrenadantes de cultivos de tejidos derivados de cultivos estimulados anti-CD3/CD28 por análisis de Luminex. Estos mostraron respuestas sólidas para todas las citoquinas medidas (valores medios en el grupo de vehículos fueron los siguientes: IL-4 = 6 406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-10 = 10 987 pg/ml; IL-17A = 11 447 pg/ml; IFN-gamma = 15 581 pg/ml; TNF- α = 76 pg/ml).

Las siguientes secciones resumen los datos obtenidos de los cultivos estimulados por colágeno II. Cuando correspondiera, los análisis estadísticos de las diferencias entre los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de esplenocitos no estimulados y CII- estimulados se realizaron utilizando ANOVA bidireccional seguido de la postprueba de Sidak para comparaciones múltiples, mientras que se utilizó ANOVA unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada por CII en los grupos tratados con el agente bioterapéutico con el grupo tratado con vehículo. No hubo diferencia significativa en los niveles de citoquinas entre los grupos en ambos casos. Esto es probablemente debido al tamaño pequeño de la muestra utilizada (n = 3).

A fin de presentar con mayor precisión la distribución de los datos para las citoquinas con la extensión sustancial de los datos, estos se presentan como diagramas de dispersión.

Las medias del grupo de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con CII fueron <5 pg / ml. Esto no se considera biológicamente significativo y no se incluye aquí. La media del grupo de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con colágeno estaba por debajo del límite de cuantificación.

Niveles de sobrenadante de IFN- γ (Figura 23)

Junto con IL-17, IFN- γ es la principal citoquina que origina enfermedades en el modelo CIA. El gráfico de dispersión en la Figura 23 muestra los niveles de IFN-gamma después de la estimulación CII, con la media de grupo mayor en el grupo tratado con vehículo en comparación con el agente bioterapéutico (véase la Figura 27).

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

Los niveles de IL-17A fueron 50 pg/ml en los cultivos estimulados por CII para el grupo tratado con vehículo. Los niveles de esta citoquina parecían ser menores en el grupo de agente bioterapéutico en comparación con el grupo tratado con vehículo (véase la figura 27).

Niveles de sobrenadante de IL-10 (Figura 25)

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

más altos de IL-10 (que es una citoquina antiinflamatoria) para el grupo tratado con vehículo pueden esperarse debido a que la inflamación y la inducción de citoquinas proinflamatorias podrían estar acompañadas por un mecanismo de retroalimentación antiinflamatorio.

Niveles de sobrenadante de IL-6 (Figura 26)

Las citoquinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α no se producen típicamente en niveles altos en los cultivos anti-CII. Sin embargo, sus niveles pueden ser alterados como resultado de la modulación inmunitaria. Los niveles de IL-6 en cultivos estimulados con CII fueron modestos, alcanzando 10 pg/ml. Aunque mayor que en los cultivos de control de medios de comunicación, estas diferencias eran demasiado pequeñas para proporcionar fundamento para incorporación a los análisis estadísticos.

Sobrenadantes de cultivos de tejidos en el Grupo 4 - agente bioterapéutico n.º 675 (Figura 27)

Los cultivos de esplenocitos de este grupo se establecieron en días diferentes y por lo tanto separados del grupo tratado con vehículo. Aunque las comparaciones directas pueden no ser apropiadas, parece que el tratamiento con agente bioterapéutico n.º 675 fue eficaz en la reducción de IFN- γ , IL-17A y los niveles de IL-6.

Análisis microbiológico

El crecimiento bacteriano se confirmó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm usando un espectrofotómetro. La identidad bacteriana fue confirmada mediante la comparación de imágenes de las placas por estrías con imágenes
5 referenciales.

Siguiendo el método de preparación bacteriana mejorado, altas dosis de cepa bacteriana se administraron sistemáticamente desde el día -2 y día -3 (a excepción de la cepa n.º 675 desde el Día 0), como se indica por los altos valores de la
10 DO medidos.

Las muestras fecales se recogieron y se congelaron en el día -14, día 0 y en la terminación.

Histopatología

Los resultados de la histopatología se muestran en las
15 Figuras 66-71. Tal como se esperaba para este modelo, se observó la variabilidad intraindividual e interindividual en términos de presencia/ausencia de la artritis o la gravedad del cambio presente.

La naturaleza de la patología era como se esperaba para este
20 modelo, con una extensa inflamación crónica activa mixta de la membrana sinovial y la bolsa extendiéndose para afectar los tejidos blandos periarticulares (músculo, tejido adiposo, colágeno dérmico). En las articulaciones afectadas más gravemente hubo degeneración y pérdida del cartílago

articular con restos intraarticulares e inflamación y alteración de la estructura ósea y articulaciones por la fibrosis y la inflamación.

La incidencia de los cambios histopatológicos fue: vehículo -
5 80 % (16/20); agente bioterapéutico n.º 675 - 83 % (20/24).

El agente bioterapéutico n.º 675 fue eficaz para reducir el daño histopatológico que se observa en las articulaciones de las extremidades posteriores y reducir los puntajes de inflamación de las articulaciones, los puntajes de daño del
10 cartílago, los puntajes de daño óseo y los puntajes totales de histopatología (véase la Figura 70), aunque no se pudieron realizar comparaciones estadísticas con el grupo de vehículo.

Resumen

Se observó un aumento de los puntajes clínicos a partir del
15 día 28 después de la primera administración del colágeno tipo II, como se esperaba en este modelo de artritis en los ratones DBA/1. El agente bioterapéutico n.º 675 ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la artritis en este modelo. Los animales tratados con el agente bioterapéutico n.º 675
20 fueron inmunizados en un momento diferente en comparación con el grupo tratado con vehículo, lo que puede explicar los puntajes clínicos más altos observados. Sin embargo, el agente bioterapéutico n.º 675 fue eficaz para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, como se

demuestra en el análisis histopatológico.

Se observaron respuestas de memoria proliferativa a Colágeno II en cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. Las estadísticas no se llevaron a cabo para
5 los cultivos del agente bioterapéutico n.º 675, ya que estos se establecieron en un momento diferente, pero se observó una reducción de la respuesta específica al colágeno relativa al control.

La mayor parte de las citoquinas de linfocitos T analizadas
10 mostraron aumentos detectables entre los estimulados por Colágeno II y los controles promedio en el grupo tratado con vehículo. Estos incrementos no fueron tan evidentes en el grupo tratado con el agente bioterapéutico. Esto apoya ampliamente las respuestas de memoria proliferativa al
15 Colágeno II descritas anteriormente.

Hubo pruebas de supresión del eje Th1 / Th17, que es la respuesta patógena en este modelo y en la AR humana. La correlación de los niveles reducidos de citoquinas con la proliferación reducida sugiere la modulación inmunitaria. No
20 hubo pruebas de que esta modulación resultase de la mejora del nivel de Th2 IL-4 asociado o del aumento de la citoquina inmunomoduladora, IL-10.

**Ejemplo 4 - Un análisis más detallado de los efectos de los
inóculos de bacterias en el modelo de ratón de asma inducida**

por ácaros del polvo de la casa

Los ratones analizados en el ejemplo 1 se sometieron a análisis adicional para caracterizar mejor el efecto de las composiciones de la invención sobre la respuesta inflamatoria del asma alérgica.

Materiales y métodos

Extracción de sangre y preparación de suero en el día 14. Las muestras de sangre de los animales se recogieron mediante punción cardiaca. El suero se aisló a partir de la muestra de sangre por centrifugación durante 5 min a 14 000 g y se almacenó a -20 ° C.

Extracción de órganos en el día 14. Recolección del lóbulo del pulmón izquierdo en formalina para su seguimiento en el análisis histológico. Recolección de los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) y la eliminación del suero para la congelación instantánea y posterior análisis. El fluido BAL restante se congeló rápidamente para posterior análisis.

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y líquido BAL

La producción de anticuerpos IgE total e IgG1 específico de los ácaros de polvo doméstico (HDM) se midió en el BAL y el suero mediante el ensayo ELISA.

Aislamiento de pulmón y el análisis histológico

Lóbulos del pulmón izquierdo se fijaron en formalina seguido

de incrustramiento en parafina, seccionados, y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. El puntaje histológico posterior se realizó de la siguiente manera: cinco campos aleatorios de vista por muestra se puntuaron para la inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y la producción de mucosidad. La infiltración inflamatoria fue marcada con el siguiente sistema de clasificación:

- 0 - Normal
- 1 - infiltrados inflamatorios leves
- 10 2 - infiltrados inflamatorios moderados
- 3 - infiltrados inflamatorios marcados
- 4 - infiltrados inflamatorios graves
- 5 - infiltrados inflamatorios muy graves

En cada campo de visión, las vías respiratorias se midieron en tamaño y se cuantificó/um la cantidad de células de mucosidad.

Medición de mediadores inflamatorios en el tejido pulmonar

Lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de mediadores de la inflamación se congelaron de manera instantánea para la medición posterior de CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL -17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 y CCL5 con un ensayo multiplex disponible en el mercado (Merck-Millipore) para ensayo múltiple. El análisis se realizó de acuerdo con

las instrucciones del fabricante.

Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 28-46.

- 5 En respaldo a los resultados descritos en el ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido pulmonar de los ratones tratados con la cepa 675 mostró una reducción notable y estadísticamente significativa en el puntaje promedio de la inflamación (véanse las Figuras 32 y 34).
- 10 Se analizaron los niveles de anticuerpos en el fluido BAL y en el suero (véanse las Figuras 28-31). No se observó ningún efecto evidente del tratamiento de bacterias en los niveles de anticuerpos séricos. Esto puede reflejar un fallo en el experimento, ya que el alcance de los datos y las barras de
- 15 error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como sería de esperar. Además, los niveles de anticuerpos en el suero de referencia podrían haber ocultado cualquier cambio.
- Del mismo modo, no se observó ningún efecto evidente del
- 20 tratamiento de bacterias en los niveles de citoquinas en el tejido pulmonar (ver Figuras 36-46). Una vez más, esto puede reflejar un fallo en el experimento, ya que el alcance de los datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen

haberse comportado como sería de esperar. También es posible que el mecanismo de acción haya implicado influencias anteriores de respuestas de citoquinas que ya no eran detectables en el día 4 después de la provocación final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar fue separado para los diferentes análisis, y por lo tanto un lóbulo de pulmón no podría haber sido plenamente representativo o comparable con el mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación.

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

Los ratones analizados en el ejemplo 2 se sometieron a un análisis adicional para caracterizar mejor el efecto de las composiciones de la invención en la respuesta de neutrófilos asociada con el asma grave.

Materiales y métodos

Extracción de órganos en el día 18. Recolección del lóbulo del pulmón izquierdo en formalina para posterior análisis histológico. Recolección de los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) y la eliminación del suero para su congelación instantánea y posterior análisis. El fluido

BAL restante se congeló de manera instantánea para posterior análisis.

Medición de mediadores inflamatorios en el tejido pulmonar (posterior análisis).

5 lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de mediadores de la inflamación se congelaron de manera instantánea para la medición subsiguiente de IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa, IL-17F, IL-23 e IL-33 por el ensayo multiplex disponible
10 comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y líquido BAL (posterior análisis).

La producción de anticuerpos IgG2a, IgG1 específico de los ácaros del polvo doméstico (HDM) se
15 midió en el BAL y el suero mediante el ensayo ELISA.

Aislamiento de pulmón y análisis histológico (posterior análisis).

Lóbulos del pulmón izquierdo se fijaron en formalina seguido de incrustamiento en parafina, seccionados y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. El puntaje
20 histológico posterior se realizó de la siguiente manera: cinco campos aleatorios de vista por muestra se puntuaron para la inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y la producción de mucosidad. La infiltración inflamatoria fue marcada con el siguiente

sistema de clasificación:

- 0 - Normal
- 1 - infiltrados inflamatorios leves
- 2 - infiltrados inflamatorios moderados
- 5 3 - infiltrados inflamatorios marcados
- 4 - infiltrados inflamatorios graves
- 5 - infiltrados inflamatorios muy graves

Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras
10 47-64.

El análisis adicional de los niveles de anticuerpos reveló que la eficacia de la cepa bacteriana 675 también se reflejó en la reducción de los niveles de IgG1 específicos de HDM en el líquido de BAL y el suero (véanse las Figuras 47 y 49). No
15 se pueden realizar conclusiones firmes con respecto a un efecto sobre los niveles de IgG2a. En general, los datos del análisis de anticuerpos sugieren una reducción relacionada con una respuesta inflamatoria reducida en general, en oposición a un efecto selectivo sobre el cambio de isotipo de
20 anticuerpo.

El análisis histológico respaldó el conteo diferencial de células del fluido BAL, que muestra un infiltrado celular reducido en los ratones tratados con la cepa 675 (ver Figuras 51-53).

En relación con los niveles de citoquinas, como en el ejemplo 4, el alcance de los datos y las barras de error para cada tratamiento es grande, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaría. También es posible que el mecanismo de acción implique influir en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después de la provocación final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar fue separado para los diferentes análisis, y por lo tanto un lóbulo de pulmón no podría haber sido plenamente representativo o comparable con el mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación. A pesar de esta variabilidad, se demostró un efecto antiinflamatorio evidente en los niveles de citoquinas para la cepa 675, y el control positivo anti-IL-17 Ab se comportó generalmente como se esperaba.

Con las salvedades anteriores, los datos de las Figuras 56, 58, 59, 61 y 63 sugieren que el tratamiento con las cepas bacterianas de la invención puede lograr una reducción en los niveles de IL-1b, IFN, RANTES, MIP-1a y KC (el equivalente murino del IL-8 humano), que puede ser indicativo de un

mecanismo de acción relacionado con influencias sobre la liberación de quimioquinas (y por tanto el reclutamiento de células) por células inmunes innatas o estroma. Estas citoquinas son parte de la vía Th17. Tomando este estos datos
 5 en conjunto, se puede concluir que la cepa 675 fue muy eficaz en la protección de ratones contra la inflamación en este modelo de ratón de asma grave neutrofílica.

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

10 **Resumen**

Los ratones fueron administrados con composiciones que comprendían cepas bacterianas de acuerdo con la invención y fueron posteriormente inmunizados con la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos para inducir la
 15 encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es el modelo experimental utilizado más comúnmente para la esclerosis múltiple humana. Las composiciones de la invención mostraron tener un efecto sorprendente sobre la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad.

20 Cepa

675: bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 42408

Diseño del estudio

Grupos:

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

3. Tratamiento con inóculo de bacterias terapéuticas de cepa 675 (por vía oral).

5 9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (intraperitoneal).

10. Grupo control sin tratar.

Cantidad de ratones por grupo = 10

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

Días -14 a día 27: administración diaria de inóculo de bacterias terapéuticas por vía oral (Grupo 4).

Días 0-28: administración de dexametasona (intraperitoneal)

15 tres veces por semana (Grupo 9)

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 con resultado soluciones 1 mg/ml. 100 µl de la mezcla de péptido-CFAse inyectaron por vía subcutánea en cada pata posterior.

20 Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).

Día 1: administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).

Días 7 y siguientes: medición de la incidencia de la

enfermedad y el peso tres veces por semana.

Resultados finales y análisis

Los ratones se analizaron para la incidencia y gravedad de la enfermedad tres veces por semana. El puntaje se realizó a ciegas. La gravedad de la enfermedad se evaluó mediante un puntaje clínico que varía de 0 a 5, donde 5 indica un ratón muerto (ver sistema de puntaje clínico a continuación).

10 Monitoreo

En los días indicados los ratones se pesaron y se observó el puntaje de la actividad de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad.

Observaciones del puntaje de la actividad de la enfermedad:

15 0 - No hay cambios evidentes en la función motora en comparación con los ratones no inmunizados.

0,5 - La punta de la cola está inmóvil.

1,0 - Cola inmóvil.

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

20 2,0 - Cola inmóvil y debilidad de las patas posteriores.

OR - Hay signos evidentes de inclinación de la cabeza cuando se observa el caminar. El equilibrio es escaso.

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

- OR - Existe una fuerte inclinación de la cabeza que causa

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
5 posteriores.

Además de: el ratón se está moviendo alrededor de la jaula, pero cuando se coloca sobre un lado, no es capaz de enderezarse.

Las patas posteriores están juntas en un lado del cuerpo.

10 4,0 - Cola inmóvil, patas posteriores completamente paralizadas y parálisis parcial de las patas delanteras.

- Ratón se está moviendo mínimamente alrededor de la jaula, pero parece alerta y se alimenta.

4,5 - Parálisis completa de las patas posteriores y parálisis
15 parcial de las patas delanteras, no hay movimiento alrededor de la jaula.

El ratón es sacrificado inmediatamente y se retira de la jaula.

5,0 El ratón es sacrificado debido a la parálisis grave.

20 Cuando un animal tiene puntaje de la actividad de la enfermedad igual o mayor que 1, se considera que tienen un puntaje de incidencia positiva de la enfermedad.

Resultados

Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 72 y

73.

La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo fue exitosa con altos puntajes mostrados por el control del vehículo y el control sin tratar. El efecto del tratamiento con la cepa 675 fue notable y los ratones tratados con la cepa 675 presentaron menor incidencia de la enfermedad y en particular de la gravedad de la enfermedad. De hecho, la reducción de la incidencia de la enfermedad y gravedad de la enfermedad fue comparable a la del grupo de control positivo. Estos datos indican que la cepa 675 puede ser útil para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

Ejemplo 7 - Pruebas de estabilidad

Una composición descrita en este documento que contiene al menos una cepa bacteriana aquí descrita se almacena en un recipiente sellado a 25 °C o 4 °C y el recipiente se coloca en una atmósfera con 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, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la cepa bacteriana se mantendrá como se mide en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

Secuencias

SEQ ID NO: 1 (Gen *Bacteroides coprocola* de ARNr 16S,

secuencia parcial, cepa: M11 - AB200223)

```

1  agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg
   caagtcgagg

      61  ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg
5  cgcacgggtg agtaacacgt

      121  atccaacctt ccgtttactc agggatagcc ttctgaaaga
   aagattaata cctgatagta

      181  tggtgagatt gcatgatggc accattaaag atttattggt
   aaacgatggg gatgcgttcc

10      241  attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctgcga
   tggatagggg ttctgagagg

      301  aaggtcccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc
   tacgggaggc agcagtgagg

      361  aatattggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag
15  cgtgaaggat gaaggtccta

      421  cggtattgtaa acttctttta tacgggaata aagtttccta
   cgtgtaggat tttgtatgta

      481  ccgtatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg
   cggtaatacg gaggatgcga

20      541  gcgttatccg gatttattgg gtttaaaggg agcgcagacg
   ggagattaag tcagttgtga

      601  aagtttgcgg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggt
   ttccttgagt gcagttgagg

      661  caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat

```

	cacgaagaac	cccgattgcg			
	721	aaggcagctt	gctaaactgt	aactgacgtt	catgctcgaa
		agtgtgggta	tcaaacagga		
	781	ttagataccc	tggtagtcca	cacggtaaac	gatggatact
5		cgctgttggc	gatatactgt		
	841	cagcggccaa	gcgaaagcat	taagtatccc	acctggggag
		tacgccggca	acggtgaaac		
	901	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggaggaacat
		gtggtttaat	tcgatgatac		
10	961	gcgaggaacc	ttacccgggc	ttaaattgca	gacgaattac
		gaggaaactt	gtaagccgca		
	1021	aggcgtctgt	gaaggtgctg	catggttgtc	gtcagctcgt
		gccgtgaggt	gtcggcttaa		
	1081	gtgccataac	gagcgcaacc	ctcgtgggtca	gttactaaca
15		ggttaagctg	agggctctgg		
	1141	ccagactgcc	atcgtaagat	gtgaggaagg	tggggatgac
		gtcaaatacag	cacggccctt		
	1201	acgtccgggg	ctacacacgt	gttacaatgg	gaggtacaga
		aggccgctac	ccggcaacgg		
20	1261	gatgccaatc	cccaaacct	ctctcagttc	ggactggagt
		ctgcaacccg	actccacgaa		
	1321	gctggattcg	ctagtaatcg	cgcatacagc	acggcgcggt
		gaatacgttc	ccgggccttg		
	1381	tacacaccgc	ccgtcaagcc	atgaaagccg	ggggtacctg

aagtgcgtaa ccgcaaggag

1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtctaaca
aggtaaccaa g

SEQ ID NO: 2 (Gen *Bacteroides coprocola* para ARNr 16S,
5 secuencia parcial, cepa: M16 - AB200224)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc
ttaacacatg caagtcgagg

61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg
cgcacgggtg agtaacacgt

10 121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga
aagattaata cctgatagta

181 tggtgagatt gcatgatggc accattaaag atttattggt
aaacgatggg gatgcgttcc

241 attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctgcga
15 tggatagggg ttctgagagg

301 aaggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc
tacgggaggc agcagtgagg

361 aatattggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag
cgtgaaggat gaagtccta

20 421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtttccta
cgtgtaggat tttgtatgta

481 ccgtatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg
cggtaatagc gaggatgcga

541 gcgttatccg gatttattgg gtttaaaggg agcgcagacg

	ggagattaag	tcagttgtga			
	601	aagtttgcgg	ctcaaccgta	aaattgcagt	tgatactggg
		ttccttgagt	gcagttgagg		
	661	caggcggaat	tcgtggtgta	gcggtgaaat	gcttagatat
5	cacgaagaac	cccgattgcg			
	721	aaggcagctt	gctaaactgt	aactgacgtt	catgctcgaa
		agtgtgggta	tcaaacagga		
	781	ttagataccc	tggtagtcca	cacggtaaac	gatggatact
		cgctgttggc	gatatactgt		
10	841	cagcggccaa	gcgaaagcat	taagtatccc	acctggggag
		tacgccggca	acggtgaaac		
	901	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggaggaacat
		gtggtttaat	tcgatgatac		
	961	gcgaggaacc	ttacccgggc	ttaaattgca	gacgaattac
15	gaggaaactt	gtaagccgca			
	1021	aggcgtctgt	gaaggtgctg	catggttgct	gtcagctcgt
		gccgtgaggt	gtcggcttaa		
	1081	gtgccataac	gagcgcaacc	ctcgtggtca	gttactaaca
		ggttaagctg	agggctctgg		
20	1141	ccagactgcc	atcgtaagat	gtgaggaagg	tggggatgac
		gtcaaatacag	cacggccctt		
	1201	acgtccgggg	ctacacacgt	gttacaatgg	gaggtacaga
		aggccgctac	ccggcaacgg		
	1261	gatgccaatc	cccaaaacct	ctctcagttc	ggactggagt

ctgcaacccg actccacgaa

1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacacgcc acggcgcggt
gaatacgttc ccgggccttg

1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg

5 aagtgcgtaa ccgcaaggag

1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtctaaca
aggtaaccaa

SEQ ID NO: 3 (Gen *Bacteroides coprocola* para ARNr 16S,
secuencia parcial, cepa: M158 - AB200225)

10 1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc
ttaacacatg caagtcgagg

61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg
cgcacgggtg agtaacacgt

121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga

15 aagattaata cctgatagta

181 tgggtgagatt gcatgatagc accattaaag atttattggt
aaacgatggg gatgcgttcc

241 attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctncga
tggatagggg ttctgagagg

20 301 aaggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc
tacgggaggc agcagtgagg

361 aatattggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag
cgtgaaggat gaaggtccta

421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtatccta

	cgtgtaggat	tttgtatgta			
	481	ccgtatgaat	aagcatcggc	taactccgtg	ccagcagccg
		cggtaatacg	gaggatgcga		
	541	gcgttatccg	gatttattgg	gtttaaaggg	agcgcagacg
5		ggagattaag	tcagttgtga		
	601	aagtttgcg	ctcaaccgta	aaattgcagt	tgatactggt
		ttccttgagt	gcagttgagg		
	661	caggcggaat	tcgtggtgta	gcggtgaaat	gcttagatat
		cacgaagaac	cccgattgcg		
10	721	aaggcagctt	gctaaactgt	aactgacgtt	catgctcgaa
		agtgtgggta	tcaaacagga		
	781	ttagataccc	tggtagtcca	cacggtaaac	gatggatact
		cgctgttggc	gatatactgt		
	841	cagcggccaa	gcgaaagcat	taagtatccc	acctggggag
15		tacgccggca	acggtgaaac		
	901	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggaggaacat
		gtggtttaat	tcgatgatac		
	961	gcgaggaacc	ttacccgggc	ttaaattgca	gacgaattac
		gaggaaactt	gtaagccgca		
20	1021	aggcgtctgt	gaaggtgctg	catggttgct	gtcagctcgt
		gccgtgaggt	gtcggcttaa		
	1081	gtgccataac	gagcgcaacc	ctcgtggtca	gttactaaca
		ggttaagctg	aggactctgg		
	1141	ccagactgcc	atcgtaagat	gtgaggaagg	tggggatgac

gtcaaatacag cacggccctt

1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga
aggcagctac ccggcgacgg

1261 gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt
5 ctgcaaccgc actccacgaa

1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcatacagc acggcgcggt
gaatacgttc ccgggccttg

1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg
aagtgcgtaa ccgcaaggag

10 1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtcgtaac
aaggtaacca a

SEQ ID NO: 4 (secuencia consenso ARNr 16S para cepa 675
Bacteroides coprocola)

GTCTGGCTCAKGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGA

15 ACTTAGCTTGCTAAGTTTGATGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTCC

CGCTTACTCAGGAATAGCCTTTCGAAAGAAAGATTAATGCCTGATGGTATCTTAAGCACAC

ATGTAATTAAGATTAAAGATTTATCGGTAAGCGATGGGGATGCGTTCCATTAGGTAGTAGG

CGGGGTAACGGCCACCTAGCCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACAT

TGGAAGTGAAGACACGGTCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGG

20 GCGCGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGAAGGATGAAGGTCCTATGGATTGTAAACTTCT

TTTATACGGGAATAAAGTGGTCCACGTGTGGGCCTTTGCATGTACCGTATGAATAAGCATC

GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATT

GGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGGGATTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCGGCTCAACCGT

AAAATTGCAGTTGATACTGGTTCCCTTGAGTGCAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTA

GCGGTGAAATGCATAGATATCACGAAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAAGCTGTA
 ACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACA
 CGGTAAACGATGGATACTCGCTGTTGGCGATATACTGTCAGCGGCCAAGCGAAAGCATTAA
 GTATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
 5 ACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTAAA
 TTGCAGACGAATTACTTGGAACAGGTAAGCCGCAAGGCGTCTGTGAAGGTGCTGCATGGT
 TGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTCGTGG
 CCAGTTACTAGCAGGTAACGCTGAGGACTCTGGCCAGACTGCCATCGTAAGATGCGAGGAA
 GGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATG
 10 GGAGGTACAGAAGGCAGCTACCCGGCGACGGGATGCCAATCTCCAAAGCCTCTCTCAGTTC
 GGACTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCA
 CGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCCGGG
 AGTACCTGAAGTGCGTAACCGCAAGGAGCGCCCTAGGGTAAAACCGGTAATTGGGGCTAAG
 TCNTACGGGG

15

SEQ ID NO: 5 (Gen *Bacteroides thetaiotaomicron* para ARN 16S,
 secuencia parcial - M58763)

	1	cttntacaat	gaagagtttg	atcctggctc	aggatnaacg
		ctagctacag gcttaacaca			
20	61	tgcaagtcna	ggggcagcat	ttcagtttgc	ttgcaaactg
		gagatggcga ccggcgcacg			
	121	ggtgagtaac	acgtatccaa	cctgccgata	actcggggat
		agcctttcga aagaaagatt			
	181	aatacccnat	ggtataatca	gaccgcatng	tcttrttatt

	aaagaatttc	ggttatcgat			
	241	ggggatgcgt	tccattaggc	agttggtgag	gtaacggctc
		acnnaacctt	cgatggatag		
	301	gggttctgag	aggaagggtcc	cccacattgg	aactgagaca
5		cgggtccaaac	tcctacggga		
	361	ggcagcagtg	aggaatattg	gtcaatgggc	gcaggcctga
		accagccaag	tagcgtgaag		
	421	gatgactgcc	ctatggggttg	taaacttctt	ttatatggga
		ataaagtttt	ccacgtgtgg		
10	481	aattttgtat	gtaccatatg	aataaggatc	ggctaactcc
		gtgccagcag	ccncgntnat		
	541	acggagnatc	cgagcgttat	ccggatttat	tgggtttaaa
		gggagcgtag	gtggacagtt		
	601	aagtcagttg	tgaaagtttg	cggctcaacc	gtaaaattgc
15		agttgatact	ggctgtcttg		
	661	agtacagtag	aggtgggcg	aattcgtgg	gtagcgggtga
		aatgcttaga	tatcacgaag		
	721	aactccgatt	gcgaaggcag	ctcactggac	tgcaactgac
		actgatgctc	gaaagtgtgg		
20	781	gtatcaaaca	ggattagata	ccctggtagt	ccacacagta
		aacgatgaat	actcgctgtt		
	841	tgcgatatac	agtaagcggc	caagcgaaag	cattaagtat
		tccacctggg	gagtacgccg		
	901	gcaacgggtga	aactcaaagg	aattgacggg	ggccngcaca

```

agcggaggaa catgtggttt
      961  aattcgatga  tacgcgagga  accttaccg  ggcttaaatt
gcatttgaat atattggaaa
      1021  cagtatagcc  gyaaggcaaa  tgtgaagggtg  ctgcatgggt
5  gtggtcagct cgtgccgtga
      1081  ggtgtcggct  taagtgccat  aacgagcgca  acccttatct
ttagttacta acaggtcatg
      1141  ctgaggactc  tagagagact  gccgtcgtaa  gatgtgagga
aggtggggat gacgtcaaatt
10      1201  cagcacngcc  cntacgtccg  gggctacaca  cgtggttaca
tgggggggtac agaaggcagc
      1261  tacctgggtga  caggatgcta  atcccaaaag  cctctctcag
ttcggatcga agtctgcaac
      1321  ccgacttcgt  gaagctggat  tcgctagtaa  tcgcgcatca
15  gccatggcgc ggtgaatacg
      1381  ttcccgggcn  ttgtacacac  cgcccgtcaa  gccatgaaag
ccgggggtac ctgaagtacg
      1441  taaccgcaag  gagcgtccta  gggtaaaact  ggtaattggg  gc

```

20 SEQ ID NO: 6 (secuencia cromosómica de cepa 675) - **ver listado electrónico de secuencias.**

SEQ ID NO: 7 (secuencia plasmídica de cepa 675) - **ver listado electrónico de secuencias**

REFERENCIAS

- 5 [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] Macpherson et ál. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- 10 [5] Mazmanian et ál. (2005) *Cell* 15; 122(1):107-18.
- [6] Frank et ál. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan et ál. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang et ál. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels et ál. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- 15 [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin y Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-20 100.
- [15] Azad et ál. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Kitahara et ál. (2005) *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(Pt 5):2143-7.
- [17] Masco et ál. (2003) *Systematic and Applied Microbiology,*

26:557-563.

- [18] Srůtková et ál. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [19] Ye et ál. (2015) *PLoS One*. 10(1):e0117704.
- 5 [20] Fabro et ál. (2015) *Immunobiology*. 220(1):124-35.
- [21] Yin et ál. (2014) *Immunogenetics*. 66(3):215-8.
- [22] Cheluvappa et ál. (2014) *Clin Exp Immunol*. 175(2):316-22.
- [23] Schieck et ál. (2014) *J Allergy Clin Immunol*. 133(3):888-10 91.
- [24] Balato et ál. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 28(8):1016-24.
- [25] Monteleone et ál. (2011) *BMC Medicine*. 2011, 9:122.
- [26] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256-259
- 15 [27] Miossec y Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov*. 11(10):763-76.
- [28] Yang et ál. (2014) *Trends Pharmacol Sci*. 35(10):493-500.
- [29] Koenders et ál. (2006) *J. Immunol*. 176:6262-6269.
- [30] Amedei et ál. (2012) *Int J Mol Sci*. 13(10):13438-60.
- 20 [31] Shabgah et ál. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol*. 31(4):256-61.
- [32] Numasaki et ál. (2003) *Blood*. 101:2620-2627.
- [33] Zhang et ál. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 374:533-537.

- [34] Karin (2006) *Nature*. 441: 431-436.
- [35] Faghih et ál. (2013). *Iranian Journal of Immunology*. 10(4):193-204.
- [36] Numasaki et ál. (2005) *J. Immunol*. 175: 6177-6189
- 5 [37] Hammerich y Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol*. 7:297-306.
- [38] Zhang (2015) *Inflammation*. Aug 23.
- [39] Sun et ál. (2015) *Cytokine*. 74(1):76-80.
- [40] Mucientes et ál. (2015) *Br J Ophthalmol*. 99(4):566-70.
- 10 [41] Jawad et ál. (2013) *Ocul Immunol Inflamm*. 21(6):434-9.
- [42] Maya et ál. (2014) *J. Ophthalmology*. 310329
- [43] Chi et ál. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology*. 119(5):1218-1224.
- [44] Chi et ál. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual*
- 15 *Science*. 49(7): 3058-3064.
- [45] Luger y Caspi (2008) *Semin. Immunopathol*. 30(2): 134-143.
- [46] Miyamoto-Shinohara et ál. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- 20 [47] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. de Day y McLellan, Humana Press.
- [48] Leslie et ál. (1995) *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 3592-3597.
- [49] Mitropoulou et ál. (2013) *J Nutr Metab*. (2013) 716861.

- [50] Kailasapathy et ál. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [51] Handbook of Pharmaceutical Excipients, Segunda edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller
- 5 [52] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edición 1985)
- [53] *Handbook of Microbiological Media*, cuarta edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [54] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*
 10 (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [55] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [56] "Creating Bacterial Glycerol Stocks for Long-term
 Storage of Plasmids" Addgene -
[https://www.addgene.org/plasmid-protocols/create-glycerol-](https://www.addgene.org/plasmid-protocols/create-glycerol-stock/)
 15 [stock/](https://www.addgene.org/plasmid-protocols/create-glycerol-stock/)
- [57] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. Vigésima edición, ISBN: 0683306472.
- [58] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et ál., eds., 1998, Academic Press).
- 20 [59] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [60] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

- [61] Sambrook et ál. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [62] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [63] Ausubel et ál. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, Quinta edición (Current Protocols).
- [64] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, Segunda edición (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [65] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et ál., eds., 1987) Supplement 30
- [66] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [67] Brand et ál. (2007) *Nature Protocols.* 2(5):1269-1275
- [68] Jiao et ál. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases.* 184(4):1085-93.