DOMENIUL TEHNIC

[0001 Această invenție se află în domeniul compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene izolate din tractul digestiv al mamiferelor și utilizarea unor astfel de compoziții în tratamentul bolilor.

BAZELE INVENȚIEI

Se crede că intestinul uman este steril *in utero,* dar acesta este expus la o mare diversitate de microbi materni și din mediu imediat după naștere. După aceea, are loc o perioadă dinamică de colonizare și succesiune microbiană, care este influențată de factori precum modul de administrare, mediul, dieta și genotipul gazdă, care au un impact asupra compoziției microbiotei intestinale, în particular în timpul vieții timpurii. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine asemănătoare celei a adulților [1]. Microbiota intestinului uman conține mai mult de 500–1000 de filotipuri diferite aparținând în esență a două diviziuni bacteriene majore, Bacteroidete și Firmicute [2]. Relațiile simbiotice de succes care decurg din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat o mare varietate de funcții metabolice, structurale, protectoare și alte funcții benefice. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură degradarea componentelor dietetice indigestibile, cu eliberarea de produse secundare care furnizează o sursă importantă de nutrimente pentru gazdă. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine recunoscută și este exemplificată la animalele fără germeni care au un sistem imunitar afectat, care este reconstituit funcțional în urma introducerii bacteriilor comensale [3–5].

Modificările dramatice ale compoziției microbiotei au fost documentate în afecțiuni gastro-intestinale, cum ar fi boala intestinală inflamatorie (IBD). De exemplu, nivelurile de bacterii din clusterul *Clostridium* XIVa sunt reduse la pacienții cu IBD în timp ce numerele de *E coli* sunt crescute, ceea ce sugerează o schimbare a echilibrului de simbionți și patobionți în intestin [6–9]. Interesant este faptul că această disbioză microbiană este asociată și cu dezechilibre în populațiile de celule T efectoare.

În recunoașterea efectului pozitiv potențial pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animal, diverse tulpini au fost propuse pentru utilizarea în tratamentul diferitelor boli (vezi, de exemplu, [10–13]). De asemenea, anumite tulpini, inclusiv mai ales tulpini de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor boli inflamatorii și autoimune care nu sunt legate direct de intestine (*vezi* [14] și [15] pentru discuții). Cu toate acestea, relația dintre diferitele boli și diferitele tulpini bacteriene și efectele precise ale tulpinilor bacteriene particulare asupra intestinului și la nivel sistemic și asupra oricăror tipuri de boli sunt slab caracterizate.

WO 2013/050792 și US 2015/071957 descriu utilizarea *Roseburia hominis* și, respectiv, a proteinei flagelină a acesteia, în terapie.

Duncan și colab. (2002); *Int J System Evol Microbiol*; 52, 5: 1615–1620 descriu izolarea *Roseburia intestinalis* din materiile fecale umane.

Duncan și colab. (2006); *Int J System Evol Microbiol*; 56, 10: 2437–2441 descriu izolarea *Roseburia hominis* și *inulinivorans* din materiile fecale umane.

Există o necesitate în domeniu pentru noi metode de tratare a bolilor inflamatorii și autoimune. Există, de asemenea, o necesitate pentru ca efectele potențiale ale bacteriilor

intestinale să fie caracterizate astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii care utilizează bacterii intestinale.

REZUMATUL INVENȚIEI

Invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Roseburia hominis,* pentru utilizarea într-o metodă de tratare sau de prevenire a astmului.

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune. În particular, inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor și a afecțiunilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. În particular, inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene din genul *Bacteroides* poate fi eficace pentru reducerea răspunsului inflamator Th17. Așa cum s-a descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Bacteroides coprocola* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv cea a răspunsului inflamator Th17, în modelele de astm, artrită reumatoidă și scleroză multiplă la șoarece.

Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini bacteriene din acest gen poate reduce nivelurile de citokine care fac parte din calea Th17, inclusiv IL-17, poate atenua răspunsul inflamator Th17 și poate oferi beneficii clinice la modelele de boli inflamatorii și autoimune la șoareci mediate de către IL-17 și calea Th17.

În aplicații particulare, dezvăluirea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Roseburia,* pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din: scleroză multiplă; artrită, cum ar fi artrita reumatoidă, artroza, artrita psoriazică sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondiloartrită; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boală inflamatorie intestinală, cum ar fi boala Crohn sau colita ulceroasă; boală celiacă; astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; boală pulmonară obstructivă cronică (COPD); cancer, cum ar fi cancerul mamar, cancerul de colon, cancerul pulmonar sau cancerul ovarian; uveită; sclerită; vasculită; boală Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și rejet de alogrefă. Efectul prezentat pentru tulpinile bacteriene din genul *Roseburia* asupra răspunsului inflamator Th17 poate oferi beneficii terapeutice pentru boli și afecțiuni mediate de către IL-17 și calea Th17, cum ar fi cele enumerate mai sus.

După cum s-a menționat mai sus, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Roseburia hominis,* pentru utilizarea într-o metodă de tratare sau de prevenire a astmului, cum ar fi astmul neutrofil sau astmul alergic. Inventatorii au identificat acest tratament cu tulpini de *Roseburia* poate reduce recrutarea de neutrofile și eozinofile în plămâni, ceea ce poate ajuta la tratarea sau prevenirea astmului.

Mai mult, inventatorii au testat și au demonstrat eficacitatea tulpinillor de *Roseburia* în astm la șoareci. În anumite aplicații, compoziția este utilizată într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului neutrofil sau a astmului eozinofil. Efectul prezentat de către compozițiile invenției asupra neutrofilelor și eozinofilelor înseamnă că acestea pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea sau prevenirea astmului neutrofil și a astmului eozinofil. Într-adevăr, în anumite aplicații, compoziția este utilizată într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator neutrofil în tratamentul sau prevenirea astmului, sau compoziția se utilizează într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator eozinofil în tratamentul sau prevenirea astmului. În aplicații preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină

bacteriană din specia *Roseburia hominis* pentru utilizarea în tratamentul astmului, în special al astmului eozinofilic sau alergic. S-a demonstrat că *Roseburia hominis* are un efect deosebit de pronunțat asupra eozinofilelor în modelele de astm și tratamentul cu *Roseburia hominis* poate fi deosebit de eficient pentru tratarea astmului eozinofilic sau alergic.

În alte aplicații preferate, dezvăluirea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Roseburia,* pentru utilizarea într-o metodă de tratare sau de prevenire a artritei reumatoide. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Roseburia* poate oferi beneficii clinice într-un model de artrită reumatoidă la șoareci și poate reduce umflarea articulațiilor. În aplicații preferate, dezvăluirea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Roseburia hominis,* pentru utilizarea în tratamentul artritei reumatoide. Compozițiile folosind *Roseburia hominis* pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea artritei reumatoide.

În aplicațiile preferate, dezvăluirea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Roseburia,* pentru utilizarea într-o metodă de tratare sau prevenire a sclerozei multiple. Inventatorii au identificat că acest tratament cu tulpini de *Roseburia* poate reduce incidența bolii și severitatea bolii la un model cu scleroză multiplă la șoareci. În aplicațiile preferate, dezvăluirea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Roseburia hominis,* pentru utilizarea în tratamentul sclerozei multiple. Compozițiile folosind *Roseburia hominis* pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea sclerozei multiple.

În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau a unei condiții mediate de către IL-17 sau calea Th17. În particular, compozițiile dezvăluite aici pot fi utilizate în reducerea producției de IL-17 sau în reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, artritei reumatoide sau sclerozei multiple. De preferință, dezvăluirea furnizează compoziții care cuprind o tulpină bacteriană din specia *Roseburia hominis,* pentru utilizarea în reducerea producției de IL-17 sau reducerea diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, artritei reumatoide sau sclerozei multiple.

În anumite aplicații, compoziția este destinată utilizării la un pacient cu niveluri ridicate de IL-17 sau de celule Th17. Efectul prezentat de către tulpinile de *Roseburia* asupra răspunsului inflamator Th17 poate fi deosebit de benefic pentru astfel de pacienți.

Tulpina bacteriană din compoziție este de *Roseburia hominis.* Se pot utiliza și tulpini strâns înrudite, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARN 16s a unei tulpini bacteriene de *Roseburia hominis.* De preferință, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1, 2 sau 3. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 3. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența de ARNr 16s reprezentată de SEQ ID NO: 3.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției este destinată administrării orale. Administrarea orală a tulpinilor conform invenție poate fi eficientă pentru tratarea bolilor și a afecțiunilor mediate de calea IL-17 sau Th17. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă pentru prepararea compozițiilor stabile care permit eliberarea bacteriilor.

În anumite aplicații, invenția furnizează un produs alimentar care cuprinde compoziția descrisă mai sus.

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

În dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este deosebit de utilă pentru terapie. Tulpina de *Roseburia hominis* conform invenției se dovedește a fi eficientă pentru tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi artrita, astmul și scleroza multiplă. Prin urmare, într-un alt aspect, invenția furnizează o celulă din tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383. Invenția furnizează de asemenea compoziții care cuprind astfel de celule sau culturi biologic pure ale unor astfel de celule. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383 pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Numărul total de celule în lichidul BAL.

Figura 2: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Numărul total de eozinofile în BALF.

Figura 3: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Proporția de eozinofile în BALF.

Figura 4: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Numărul total de macrofage în BALF.

Figura 5: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Proporția de macrofage în BALF.

Figura 6: Model de șoarece pentru astmul indus de acarieni – Numărul total de neutrofile în BALF.

Figura 7: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Proporția de neutrofile în BALF.

Figura 8: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Numărul total de limfocite în BALF.

Figura 9: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Proporția de limfocite în BALF.

Figura 10: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de celule în lichidul BAL.

Figura 11: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de eozinofile în BALF.

Figura 12: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de eozinofile în BALF.

Figura 13: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de macrofage în BALF.

Figura 14: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de macrofage în BALF.

Figura 15: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de neutrofile în BALF.

Figura 16: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de neutrofile în BALF.

Figura 17: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de limfocite în BALF.

Figura 18: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de limfocite în BALF.

Figura 19: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Masă corporală, zile între –14 și 0. Datele sunt prezentate ca procente medii ± ESM din masa inițială (ziua –14).

Figura 20: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Mase corporale, zilele 0 până la 42. Datele sunt prezentate ca procente medii ± ESM din masa inițială (ziua 0).

Figura 21: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Scoruri clinice. Datele sunt prezentate ca medie ± ESM. **** $p < 0,0001$ în comparație cu ziua 21 din grupul tratat cu vehicul.

Figura 22: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Răspuns proliferativ al splenocitelor la colagenul II. Numerele au avut fundalul de mediu scăzut [stimulat cu CII–fundal mediu] pe minut, pe baza încorporăr ^{3}H–TdR. Toate datele sunt prezentate ca medie ± ESM. *** $p < 0,001$ comparativ cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 23: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IFNγ în supernatanții culturii de țesuturi. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

Figura 24: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IL-17A în supernatanții culturii de țesuturi. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

Figura 25: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IL-10 în supernatanții culturii de țesuturi. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

Figura 26: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IL-6 în supernatanții culturii de țesuturi. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

Figura 27: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – IgE totală în ser.

Figura 28: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – IgG1 serică specifică HDM.

Figura 29: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – IgE totală în BALF.

Figura 30: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – IgG1 specifică HDM în BALF.

Figura 31: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Analiză histologică – Scorul mediu de infiltrare peribronhiolară.

Figura 32: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Analiză histologică – Scorul mediu de infiltrare perivasculară.

Figura 33: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Analiză histologică – Scorul inflamator mediu (Media scorului infiltrării peribronhiolare, și a scorului infiltrăriii perivasculare).

Figura 34: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Analiză histologică – Scorul mucusului.

Figura 35: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul IL-9 în țesutul pulmonar.

Figura 36: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar.

Figura 37: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul IFNγ în țesutul pulmonar

Figura 38: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar

Figura 39: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul IL-4 în țesutul pulmonar

Figura 40: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul IL-5 în țesutul pulmonar

Figura 41: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci– Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar

Figura 42: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci– Nivelul RANTES în țesutul pulmonar

Figura 43: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci– Nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar

Figura 44: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul KC în țesutul pulmonar

Figura 45: Model de astm indus de acarienii din praful domestic la șoareci – Nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar

Figura 46: Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG1 serică specifică HDM.

Figura 47: Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG2a serică specifică HDM.

Figura 48: Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG1 specifică HDM în BALF.

Figura 49: Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG2a specifică HDM în BALF.

Figura 50: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Analiză histologică – Scor mediu de infiltrare peribronhiolară.

Figura 51: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Analiză histologică – Scorul mediu de infiltrare perivasculară.

Figura 52: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Analiză histologică – Scor inflamator mediu (Media scorului infiltrării peribronhiolare, și a scorului infiltrăriii perivasculare).

Figura 53: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul TNFα în țesutul pulmonar.

Figura 54: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar.

Figura 55: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IFNγ în țesutul pulmonar.

Figura 56: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-17F în țesutul pulmonar.

Figura 57: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar.

Figura 58: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul RANTES în țesutul pulmonar.

Figura 59: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul MIP–2 în țesutul pulmonar.

Figura 60: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul KC în țesutul pulmonar.

Figura 61: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar.

Figura 62: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar.

Figura 63: Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-33 în țesutul pulmonar.

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

Figura 65: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scorurile inflamării. Datele sunt prezentate ca medie ± ESM.

Figura 66: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scorurile cartilajului. Datele sunt prezentate ca medie ± ESM.

Figura 67: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scorurile oaselor. Datele sunt prezentate ca medie ± ESM.

Figura 68: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scoruri totale. Datele sunt prezentate ca medie ± ESM.

Figura 69: Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: imagini reprezentative. ID-ul animalului (# n.n) și membrul (R pentru dreapta, L pentru stânga) sunt indicate între paranteze. Imaginea stângă (vehicul): distrugerea articulară și

osoasă extinsă cu inflamație și fibroză care se extinde până la țesuturile moi peri-articulare.

Figura 70: Model de scleroză multiplă la șoareci – scorul clinic.

Figura 71: Model de scleroză multiplă la șoareci – incidența bolii.

DESCRIEREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană din specia *Roseburia hominis.* Exemplele demonstrează că bacteriile din această specie sunt utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor mediate de către IL-17 sau calea Th17.

Exemple de specii *Roseburia* pentru utilizarea dezvăluită aici includ *Roseburia hominis, Roseburia cecicola, Roseburia faecis, Roseburia intestinalis,* și *Roseburia inulinivorans.* Bacteriile *Roseburia* sunt celule ușor curbate în formă de tijă, care sunt strict anaerobe și indigene pentru intestinul mamiferului. Ele sunt din grupul filogenetic XIVa din fillumul Firmicutes. Bacteriile produc butirat și sunt activ motile prin multiple flagele prezente de-a lungul laturii concave și într-un grup la un capăt [16]. *Roseburia hominis și Roseburia intestinalis* sunt exemple descrise recent.

Un exemplu de *Roseburia hominis* este tulpina depusă în condițiile Tratatului de la Budapesta la Colecțiile naționale de bacterii industriale, alimentare și marine (NCIMB) la NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Marea Britanie, AB21 9YA, la 21 octombrie 2004 de Institutul de cercetare Rowett sub numărul de acces NCIMB 14029^T *Roseburia hominis* A2-183^T (DSM = 16839^T). Alte exemple de tulpini *Roseburia hominis* sunt descrise în [17]. Numerele de acces GenBank/EMBL/DDBJ pentru secvența genei ARNr 16S a tulpinilor de *Roseburia hominis* sunt AY804148 și AJ270482 (dezvăluite aici ca SEQ ID NO: 1 și SEQ ID NO: 2).

Un exemplu de *Roseburia intestinală* este tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 13810 *Roseburia intestinalis* L1-82^T (DSM = 14610^T). Un alt exemplu este tulpina de *Roseburia intestinalis* descrisă în [17]. Referința [17] descrie de asemenea tulpini exemplare de *Roseburia faecis* și *Roseburia inulinivorans*.

Bacteriile *Roseburia hominis* depuse sub numărul de acces NCIMB 42383 au fost testate în exemple și sunt, de asemenea, menționate aici ca tulpina 433. O secvență ARNr 16s pentru tulpina 433 care a fost testată este furnizată în SEQ ID NO: 3. Tulpina 433 a fost depus la autoritatea depozitară internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) în data de 12 martie 2015 ca „*Roseburia hominis* 433“ și a primit numărul de acces NCIMB 42383. GT Biologics Ltd. și-a schimbat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited.

O secvență genomică pentru tulpina 433 este furnizată în SEQ ID NO: 4 în lista de secvențe publicată în WO 2016/203221. Această secvență a fost generată folosind platforma PacBio RS II.

Tulpinile bacteriene strâns înrudite cu tulpina testată în exemple sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea bolilor și a afecțiunilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. În anumite aplicații, tulpina bacteriană dezvăluită aici are o

secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr 16s a unei tulpini bacteriene de *Roseburia intestinalis.* De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o secvență de 16 ARNr care este cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1, 2 sau 3. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 3. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența de ARNr 16s reprezentată de SEQ ID NO: 3.

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces 42383 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea bolilor și a condițiilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. Un biotip este o tulpină strâns înrudită, care are aceleași caracteristici fiziologice și biochimice sau caracteristici foarte similare.

Tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42383 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin secvențializarea altor secvențe de nucleotide pentru bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42383. De exemplu, substanțial întregul genom poate fi secvențializat și o tulpină de biotip dezvăluită aici poate avea cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență pe cel puțin 80% din întregul său genom (de exemplu, pe cel puțin 85%, 90 %, 95% sau 99% sau pe întregul său genom). Alte secvențe adecvate pentru utilizare în identificarea tulpinilor de biotip pot include hsp60 sau secvențe repetitive, cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)s, sau REP sau [18]. Tulpinile de biotip pot avea secvențe cu identitate de secvență de cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu secvența corespunzătoare a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42383.

În anumite cazuri, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un genom cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221. În cazurile preferate, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un genom cu o identitate de secvență de cel puțin 90% (de exemplu, o identitate de secvență de cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pentru cel puțin 60% (de exemplu, cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221. De exemplu, tulpina bacteriană pentru utilizare în cadrul invenției poate avea un genom cu cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 70% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 80% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 90% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID SEQ: 4 pe 100% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 70% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 80% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 90% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 100% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 70% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 80% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 90% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221 pe 100% din SEQ ID NO: 4 din WO 2016/203221.

Alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42383 și care sunt adecvate pentru utilizare conform invenției pot fi identificate

utilizând numărul de accesare NCIMB 42383 și analiza fragmentului de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismul pe lungimea fragmentului cu amplificarea fluorescenței (FAFLP) și amprentarea PCR a elementului ADN repetitiv (rep), sau profilarea proteinei, sau secvențializarea parțială a ADNr 16s sau 23s. În aplicații preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini de *Roseburia hominis*.

În anumite aplicații, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42383 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpini care furnizează același model ca și bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42383 atunci când sunt analizate prin analiza de restricție a ADN-ului ribozomal amplificat (ARDRA), de exemplu atunci când se folosește enzima de restricție Sau3AI (pentru metode exemplare și ghidare *vezi*, de exemplu, [19]). Alternativ, tulpinile de biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași modele de fermentație a carbohidraților ca și bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42383.

Alte tulpinil de *Roseburia* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, cum ar fi biotipurile bacteriilor depuse sub numărul de acces NCIMB 42383, pot fi identificate folosind orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv testele descrise în exemple. De exemplu, tulpinile utilizate în invenție pot fi identificate prin cultivarea în YCFA anaerobă și/sau administrarea bacteriilor la modelul de artrită indusă de colagenul de tip II la șoareci și apoi evaluarea nivelurilor de citokine. În particular, tulpinile bacteriene care au modele de creștere, tip metabolic și/sau antigeni de suprafață similari cu bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42383 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea o activitate de modulare imunitară comparabilă cu cea a tulpinii NCIMB 42383. În special, o tulpină de biotip va produce efecte comparabile asupra modelelor de boală astm, artrită și scleroză multiplă și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate folosind protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple.

O tulpină preferată în special a invenției este tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383. Acesta este exemplul 433 de tulpină testată în exemple și dovedit a fi eficient pentru tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, din tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383. Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție care cuprinde o celulă din tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383. Invenția furnizează, de asemenea, o cultură biologic pură a tulpinii de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383 pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

Un derivat al tulpinii depuse sub numărul de acces NCIMB 42383 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat al unei tulpini conform dezvăluirii poate fi modificat, de exemplu la nivel genetic, fără a-i reduce activitatea biologică. În particular, o tulpină derivată a dezvăluirii este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea o activitate de modulare imunitară comparabilă cu cea a tulpinii de NCIMB 42383 inițiale. În special, o tulpină derivată va produce efecte comparabile asupra modelelor de astm, artrită și boala sclerozei multiple și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate folosind protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple. Un derivat al tulpinii de NCIMB 42383 va fi, în general, un biotip al tulpinii de NCIMB 42383.

Referințe la celulele din tulpina de *Roseburia hominis* depusă sub numărul de acces NCIMB 42383 cuprinde orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpinile depuse sub numărul de acces NCIMB 42383, și astfel de celule sunt cuprinse în invenție.

În aplicații preferate, tulpinile bacteriene din compozițiile invenției sunt viabile și capabile să colonizeze parțial sau total intestinul.

Utilizări terapeutice

După cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene conform invenției sunt eficiente pentru reducerea răspunsului inflamator Th17. În particular, tratamentul cu compoziții conform invenției obține o reducere a nivelurilor de IL-17A și a altor citokine ale căii Th17 și îmbunătățiri clinice ale modelelor animale ale condițiilor mediate de către IL-17 și calea Th17. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune și, în particular, a bolilor sau a condițiilor mediate de către IL-17. În particular, compozițiile conform invenției pot fi utile pentru reducerea sau prevenirea dezvoltării răspunsului inflamator IL-17.

Celulele Th17 sunt un subset de celule T helper care produc, de exemplu, IL-17A, IL17-F, IL-21 și IL-22. Diferențierea celulelor Th17 și expresia IL-17 pot fi determinate de către IL-23. Aceste citokine și altele formează părți importante ale căii Th17, care este o cale de semnalizare inflamatorie bine stabilită, care contribuie și stă la baza unui număr de boli inflamatorii și autoimune (așa cum este descris, de exemplu, în [19–24]). Bolile în care calea Th17 este activată sunt boli mediate de către calea Th17. Bolile mediate de către calea Th17 pot fi ameliorate sau ușurate prin reprimarea căii Th17, care se poate obține printr-o reducere a diferențierii celulelor Th17 sau o reducere a activității acestora sau o reducere a nivelului de citokine ale căii Th17. Bolile mediate de calea Th17 pot fi caracterizate de niveluri crescute de citokine produse de celulele Th17, cum ar fi IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (discutate în [25]). Bolile mediate de calea Th17 pot fi caracterizate prin exprimarea crescută a genelor asociate Th-17, cum ar fi Stat3 sau IL-23R. Bolile mediate de către calea Th17 pot fi asociate cu niveluri crescute de celule Th17.

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

Exemplele de boli și afecțiuni care pot fi mediate de către IL-17 sau calea Th17 includ scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriatică sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielita optică (boala lui Devic); spondilita anchilozantă; spondiloartrita; psoriazisul; lupusul eritematos sistemic; boala inflamatorie intestinală, cum ar fi boala Crohn sau colita ulceroasă; boala celiacă; astmul, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; boală pulmonară obstructivă cronică (COPD); uveita; sclerita; vasculita; boala Behcet; ateroscleroza; dermatita atopică; emfizemul; parodontita; rinita alergică; și rejetul de alogrefă. În aplicații preferate, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru

tratarea sau prevenirea uneia sau mai multora dintre aceste condiții sau boli. În aplicații preferate, aceste condiții sau boli sunt mediate de către IL-17 sau calea Th17.

În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de către IL-17 sau calea Th17. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea unei boli inflamatorii sau autoimune, în care respectivul tratament sau prevenire se realizează prin reducerea sau prevenirea creșterii răspunsului inflamator Th17. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea unui pacient cu o boală inflamatorie sau autoimună, în care pacientul are niveluri IL-17 crescute sau celule Th17 ridicate sau prezintă un răspuns inflamator Th17. În anumite aplicații, pacientul poate să fi fost diagnosticat cu o boală sau condiție inflamatorie sau autoimună cronică, sau compoziția conform invenției poate fi utilizată în prevenirea unei boli inflamatorii sau autoimune sau a unei condiții care se dezvoltă într-o boală sau condiție inflamatorie sau autoimună cronică. În anumite aplicații, boala sau starea poate să nu răspundă la tratamentul cu inhibitori de TNF-α. Aceste utilizări ale invenției pot fi aplicate oricăreia dintre bolile sau condițiile specifice enumerate în paragraful precedent.

IL-17 și calea Th17 sunt adesea asociate cu boli inflamatorii și autoimune cronice, astfel încât compozițiile conform invenției pot fi utile în particular pentru tratarea sau prevenirea bolilor sau afecțiunilor cronice, așa cum sunt enumerate mai sus. În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate la pacienții prezentând o boală cronică. În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în prevenirea dezvoltării bolii cronice.

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

În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IL-17, în particular a nivelurilor de IL-17A. În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției prevede o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IFN-γ sau IL-6. O astfel de reducere sau prevenire a nivelurilor crescute ale acestor citokine poate fi utilă pentru tratarea sau prevenirea bolilor și condițiilor inflamatorii și autoimune, în particular a celor mediate de către IL-17 sau calea Th17.

Astmul

Compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea astmului. Exemplele demonstrează că compozițiile conform invenției obțin o reducere a recrutării de neutrofile și/sau eozinofile în căile respiratorii în urma sensibilizării și provocării cu extract de acarieni din praful domestic și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea astmului. Astmul este o boală cronică caracterizată prin inflamația și restricționarea căilor respiratorii. Inflamația în astm poate fi mediată de către IL-17 și/sau celulele Th17, astfel

încât compozițiile conform invenției pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea astmului. Inflamația în astm poate fi mediată de eozinofile și/sau neutrofile.

În anumite aplicații, astmul este astm eozinofil sau alergic. Astmul eozinofil și alergic se caracterizează printr-un număr crescut de eozinofile în sângele periferic și în secrețiile căilor respiratorii și este asociat patologic cu îngroșarea zonei membranei bazale și farmacologic prin responsivitatea la corticosteroizi [27]. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea eozinofilelor pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului eozinofil și alergic.

În alte aplicații suplimentare, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea astmului neutrofil (sau a astmului ne-eozinofil). Numărul mare de neutrofile este asociat cu astmul sever care poate fi insensibil la tratamentul cu corticosteroizi. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea neutrofilelor pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului neutrofil.

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

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

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

În anumite aplicații, compozițiile reduc infiltrarea peribronhiolară în astmul alergic sau sunt utilizate în reducerea infiltrării peribronhiolare în tratamentul astmului alergic. În anumite aplicații, compozițiile reduc infiltrarea peribronhiolară și/sau perivasculară în astmul neutrofil sau sunt utilizate în reducerea infiltrării peribronhiolare și/sau perivasculare în tratamentul astmului alergic neutrofil.

În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IFNγ.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării într-o metodă de tratare a astmului care duce la reducerea răspunsului inflamator eozinofil și/sau neutrofil. În anumite aplicații, pacientul care urmează să fie tratat are, sau a fost identificat anterior ca având valori crescute de neutrofile sau eozinofile, de exemplu, identificate prin prelevarea de sânge sau analiza sputei.

Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării astmului la un nou-născut, atunci când sunt administrate nou-născutului sau unei femei însărcinate. Compozițiile pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării astmului la copii. Compozițiile conform

invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului cu debut la adulți. Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru combaterea sau ameliorarea astmului. Compozițiile conform invenției pot fi utile în particular pentru reducerea simptomelor asociate astmului, care este agravat de alergeni, cum ar fi acarienii din praful domestic.

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

Artrita

În aplicațiile preferate, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea artritei reumatoide (RA). Exemplele demonstrează că compozițiile dezvăluite aici obțin o reducere a semnelor clinice ale RA într-un model de șoarece, reduc leziunile cartilajelor și pe cele osoase și reduc răspunsul inflamator IL-17, deci pot fi utile în tratamentul sau prevenirea RA. RA este o tulburare inflamatorie sistemică care afectează în primul rând articulațiile. RA este asociată cu un răspuns inflamator care duce la umflarea articulațiilor, hiperplazie sinovială și distrugerea cartilajului și a oaselor. IL-17 și celulele Th17 pot avea un rol cheie în RA, de exemplu, deoarece IL-17 inhibă producția de matrice în condrocite și osteoblaste și activează producția și funcția metaloproteinazelor matrice și pentru că activitatea bolii RA este corelată cu nivelurile IL-17 și numărul de celule Th-17 [28, 29], astfel încât compozițiile conform invenției pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea RA.

În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate pentru scăderea nivelurilor de IL-17 sau pentru prevenirea creșterii nivelurilor de IL-17 în tratamentul sau prevenirea RA. În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții dezvăluite aici asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IL-17, în particular a nivelurilor IL-17A. În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții dezvăluite aici oferă o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IFN-γ sau IL-6.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile dezvăluite aici are ca rezultat o reducere a umflării articulațiilor. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate la pacienții cu articulații umflate sau la pacienții identificați cu riscul de a avea articulații umflate. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate într-o metodă de reducere a umflarii articulațiilor în RA.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile dezvăluite aici are ca rezultat o reducere a deteriorării cartilajelor sau a oaselor. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea deteriorării cartilajului sau a celei osoase în tratamentul RA. În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacientului cu RA severă care prezintă risc de deteriorare a cartilajului sau osoasă.

Nivelurile crescute de IL-17 și numărul crescut de celule Th17 sunt asociate cu distrugerea cartilajelor și a oaselor în RA [28, 29]. IL-17 este cunoscută că activează distrugerea matricei în cartilaj și țesutul osos, și IL-17 are un efect inhibitor asupra producției matricei în condrocite și osteoblaste. Prin urmare, în anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate pentru prevenirea eroziunii osoase sau deteriorarea cartilajului în tratamentul RA. În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacienților care prezintă eroziune osoasă sau leziuni ale cartilajelor sau pacienților identificați cu risc de eroziune osoasă sau deteriorare a cartilajelor.

TNF-α este, de asemenea, asociat cu RA, dar TNF-α nu este implicat în patogeneza etapelor târzii ale bolii. În schimb, IL-17 are un rol în toate etapele bolii cronice [30]. Prin urmare, în anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate în tratarea RA cronică sau RA în stadiu târziu, cum ar fi boala care include distrugerea articulară și pierderea cartilajului. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt destinate tratării pacienților care au primit anterior o terapie anti-TNF-α. În anumite aplicații, pacienții care urmează a fi tratați nu răspund sau nu mai răspund la terapia anti-TNF-α.

Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile pentru modularea sistemului imunitar al unui pacient, astfel încât în anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate pentru prevenirea RA la un pacient care a fost identificat cu risc de RA, sau care a fost diagnosticat cu o etapă timpurie a RA. Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării RA.

Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile pentru gestionarea sau atenuarea RA. Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile în particular pentru reducerea simptomelor asociate cu umflarea articulației sau distrugerea oaselor. Tratamentul sau prevenirea RA se pot referi, de exemplu, la o ameliorare a gravității simptomelor sau la o reducere a frecvenței de exacerbări sau a gamei de declanșatori care reprezintă o problemă pentru pacient.

Scleroza multiplă

În aplicațiile preferate, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate în tratarea sau prevenirea sclerozei multiple. Exemplele demonstrează că compozițiile dezvăluite aici obțin o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii la un model de scleroză multiplă la șoareci (modelul EAE) și, astfel, pot fi utile în tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple. Scleroza multiplă este o tulburare inflamatorie asociată cu deteriorarea tecilor de mielină ale neuronilor, în particular la nivelul creierului și coloanei vertebrale. Scleroza multiplă este o boală cronică, care incapacitează progresiv și care evoluează în episoade. IL-17 și celulele Th17 pot avea un rol cheie în scleroza multiplă, de exemplu, deoarece nivelurile de IL-17 pot fi corelate cu leziunile sclerozei multiple, IL-17 poate perturba joncțiunile strânse ale celulelor endoteliale ale barierei hematoencefalice, iar celulele Th17 pot migra în sistemul nervos central și cauzează pierderi neuronale [31, 32]. Prin urmare, compozițiile dezvăluite aici pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea sclerozei multiple.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile dezvăluite aici are ca rezultat o reducere a incidenței bolii sau a gravității bolii. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici împiedică o scădere a funcției motoare sau duce la îmbunătățirea a funcției motoare. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate pentru reducerea incidenței bolii sau a gravității bolii. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile dezvăluite aici previne o scădere a funcției motoare sau duce la îmbunătățirea funcției motoare. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt destinate utilizării pentru prevenirea declinului funcției motoare sau pentru utilizarea în îmbunătățirea funcției motoare. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile dezvăluite aici împiedică dezvoltarea paraliziei. În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate pentru prevenirea paraliziei în tratamentul sclerozei multiple.

Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile pentru modularea sistemului imunitar al unui pacient, astfel încât, în anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt destinate utilizării pentru prevenirea sclerozei multiple la un pacient care a fost identificat ca prezentând risc de scleroză multiplă sau care a fost diagnosticat cu scleroză multiplă de stadiu timpuriu sau

scleroză multiplă „recurentă-remisivă“. Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării sclerozei. Într-adevăr, exemplele arată că administrarea compozițiilor descrise aici împiedică dezvoltarea bolii la mulți șoareci.

Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile pentru gestionarea sau ameliorarea sclerozei multiple. Compozițiile dezvăluite aici pot fi utile în particular pentru reducerea simptomelor asociate cu scleroza multiplă. Tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple se poate referi, de exemplu, la o atenuare a gravității simptomelor sau la o reducere a frecvenței de exacerbări sau a gamei de declanșatori care reprezintă o problemă pentru pacient.

Moduri de administrare

De preferință, compozițiile dezvăluite aici trebuie administrate pe tractul gastrointestinal pentru a permite livrarea către intestin și/sau colonizarea parțială sau totală a acestuia cu tulpina bacteriană conform invenției. În general, compozițiile dezvăluite aici sunt administrate oral, dar pot fi administrate pe cale rectală, intranazală sau pe căi bucale sau sublinguale.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției pot fi administrate sub formă de spumă, sub forma unui spray sau unui gel.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției pot fi administrate sub formă de supozitoare, cum ar fi un supozitor rectal, de exemplu sub forma unui ulei de teobroma (unt de cacao), a unei grăsimi sintetice dure (de exemplu suppocire, witepsol), glicero–gelatină, polietilenglicol sau compoziție de glicerină de săpun.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției este administrată tractului gastrointestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nazogastric, un tub orogastric, un tub gastric, un tub jejunostomic (tub J), o gastrostomie endoscopică percutanată (PEG) sau un port, cum ar fi un port de perete toracic care oferă acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate o singură dată sau pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției trebuie administrate zilnic.

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

În anumite aplicații, compoziția conform invenției poate fi administrată la un animal însărcinat, de exemplu un mamifer, cum ar fi un om, pentru a preveni o boală inflamatorie sau autoimună la copilul ei *in utero* și/sau după ce s-a născut.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate la un pacient care a fost diagnosticat cu o boală sau afecțiune mediată de către IL-17 sau calea Th17, sau care a fost identificat ca fiind expus riscului unei boli sau a unei afecțiuni mediate de către IL-17 sau calea Th17. Compozițiile pot fi, de asemenea, administrate ca o măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea de boli sau afecțiuni mediate de către IL-17 sau calea Th17 la un pacient sănătos.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate unui pacient care a fost identificat ca având o microbiotă intestinală anormală. De exemplu, pacientul poate avea o colonizare redusă sau absentă cu *Bacteroides,* și în particular cu *Bacteroides coprocola.*

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

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

Compoziţii

În general, compoziția conform invenției cuprinde bacterii. În aplicațiile preferate ale invenției, compoziția este pusă în formulă în formă liofilizată. De exemplu, compoziția conform invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină dură, cuprinzând o tulpină bacteriană conform invenției.

De preferință, compoziția conform invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine stabilită și sunt disponibile îndrumări relevante, de exemplu, în referințele [33–35].

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

În aplicațiile preferate, compoziția conform invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinii bacteriene către intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la livrarea la locația țintă, de exemplu, prin ruperea cu stimuli chimici sau fizici, cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificări ale pH-ului. Poate fi folosită orice metodă adecvată de încapsulare. Exemple de tehnici de încapsulare includ capturarea într-o matrice poroasă, atașarea sau adsorbția pe suprafețe purtătoare solide, auto-agregarea prin floculare sau cu agenți de reticulare și izolarea mecanică în spatele unei membrane microporoase sau a unei microcapsule. Indicații privind încapsularea care pot fi utile pentru prepararea compozițiilor conform invenției sunt disponibile, de exemplu, în referințele [36] și [37].

Compoziția poate fi administrată pe cale orală și poate fi sub formă de tabletă, capsulă sau pulbere. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece *Roseburia* sunt anaerobe. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse cu rol de colectori de oxigen și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți livrarea și/sau coloni-zarea parțială sau totală și supraviețuirea *in vivo.* Alternativ, compoziția probiotică a invenției poate fi administrată pe cale orală ca produs alimentar sau nutrițional, cum ar fi lactat fermentat pe bază de lapte sau zer sau ca produs farmaceutic.

Compoziția poate fi pusă în formulă ca un probiotic.

O compoziție conform invenției include o cantitate eficace terapeutic dintr-o tulpină bacteriană conform invenției. O cantitate eficace terapeutic dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficace terapeutic dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a avea ca efect livrarea către intestinul pacientului și/sau colonizarea parțială sau totală a acestuia.

O doză zilnică adecvată de bacterii, de exemplu pentru un om adult, poate fi de la circa 1×10^3 până la circa 1×10^{11} unități care formează colonii (CFU); de exemplu, de la circa 1×10^7 până la circa 1×10^{10} CFU; într-un alt exemplu de la circa 1×10^6 până la circa 1×10^{10} CFU.

În anumite aplicații, compoziția conține tulpina bacteriană într-o cantitate de la circa 1×10^6 până la circa 1×10^{11} CFU/g, în raport cu masa compoziției; de exemplu, de la circa 1×10^8 până la circa 1×10^{10} CFU/g. Doza poate fi, de exemplu, de 1 g, 3 g, 5 g și 10 g.

În mod tipic, un probiotic, cum ar fi compoziția conform invenției, este combinat opțional cu cel puțin un compus prebiotic adecvat. Un compus prebiotic este de obicei un carbohidrat nedigerabil, cum ar fi un oligo- sau polizaharid sau un alcool din zahăr, care nu

este degradat sau absorbit în tractul digestiv superior. Prebioticele cunoscute includ produse comerciale, cum ar fi inulina și transgalacto-oligozaharidele.

În anumite aplicații, compoziția probiotică conform prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la circa 1 până la circa 30% din masă, în raport cu masa totală a compoziției (de exemplu, de la 5 până la 20% din masă). Carbohidrații pot fi selectați din grupul format din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu catenă scurtă, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, amidonuri modificate cu gumă arabică și rezistente, polidextroză, D–tagatoză, fibre de salcâm, carob, ovăz și fibre de citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate, prezentate mai jos ca FOSs–c.c); respectivele FOSc-s nu sunt carbohidrați digerabili, în general sunt obținute prin transformarea zahărului din sfeclă și includ o moleculă de zaharoză la care se leagă trei molecule de glucoză.

Compozițiile conform invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemple de astfel de excipienți potriviți pot fi găsiți în referința [38]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referința [39]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și altele asemenea. Exemplele de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi selectată în ceea ce privește calea de administrare prevăzută și practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de purtător, excipient sau diluant orice liant sau lianți, lubrifiant (lubrifianți), agent (agenții) de suspendare, agent (agenți) de acoperire, agent (agenți) de solubilizare adecvați. Exemple de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale precum glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu flux liber, beta–lactoză, îndulcitori de porumb, gumă naturală și sintetică, cum ar fi acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetil celuloză și polietilenglicol. Exemple de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și altele asemenea. În compoziția farmaceutică pot fi furnizați conservanți, stabilizanți, coloranți și chiar aromatizanți. Exemple de conservanți includ benzoatul de sodiu, acidul sorbic și esterii acidului p–hidroxibenzoic. Pot fi de asemenea utilizați antioxidanți și agenți de punere în suspensie.

Compozițiile conform invenției pot fi puse în formulă ca un produs alimentar. De exemplu, un produs alimentar poate oferi beneficii nutritive în plus față de efectul terapeutic al invenției, cum ar fi într-un supliment nutrițional. În mod similar, un produs alimentar poate fi pus în formulă pentru a îmbunătăți gustul compoziției conform invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă pentru a fi consumată prin a fi mai asemănătoare cu un produs alimentar obișnuit, mai degrabă decât cu o compo ziție farmaceutică. În anumite aplicații, compoziția conform invenției este pusă în formulă ca un produs pe bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte“ înseamnă orice produs lichid sau semisolid sau pe bază de lapte sau zer având un conținut diferit de grăsimi. Produsul pe bază de lapte poate fi, de exemplu, lapte de vacă, lapte de capră, lapte de oaie, lapte degresat, lapte integral, lapte recombinat din lapte praf și zer, fără nicio prelucrare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurt, lapte bătut, caș, lapte acru, lapte integral acru, unt din lapte și alte produse din lapte acru. Un alt grup important include băuturi din lapte, precum băuturi din zer, lapte fermentat, lapte condensat, lapte pentru sugari sau pentru bebeluși; lapte aromatizat, înghețată; alimente care conțin lapte, cum ar fi dulciurile.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției conțin o tulpină sau specie bacteriană unică și nu conțin alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot cuprinde numai cantități *de minimis* sau cantități irelevante biologic ale altor tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial lipsită de alte specii de organisme.

Compozițiile pentru utilizare în conformitate cu invenția pot avea sau nu nevoie de aprobare de comercializare.

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

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

În anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană conform invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare atunci când este administrată unui subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este selectată din grupul constând din astm, astm alergic, astm neutrofil, osteoartrită, artrită psoriatică, artrită idiopatică juvenilă, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală celiacă, boală pulmonară obstructivă cronică (COPD), cancer, cancer mamar, cancer de colon, cancer pulmonar, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boală Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, parodontită, rinită alergică și rejet de alogrefă.

În anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană conform invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata sau a preveni o boală sau o condiție mediată de către IL-17 sau calea Th17. În aplicații preferate, boala sau condiția respectivă este selectată din grupul constând din artrită reumatoidă, scleroză multiplă, psoriazis, boală inflamatorie intestinală, boală Crohn, colită ulceroasă, boală celiacă, astm, astm alergic, astm neutrofil, osteoartrită, artrită psoriatică, artrită idiopatică juvenilă, neuromielită optica (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală pulmonara obstructivă cronică (COPD), cancer, cancer mamar, cancer de colon, cancer pulmonar, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, emfizem, parodontită, rinită alergică și rejet de alogrefă.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de circa 1×10^3 până la circa 1×10^{11} unități formatoare de colonii pe gram în raport cu masa compoziției.

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

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

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un purtător selectat din grupul constând din lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol și sorbitol.

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

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu curgere liberă, beta–lactoză, îndulcitor din porumb, salcâm, tragacantă, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, polietilenglicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând în plus cel puțin unul dintre un agent de conservare, un antioxidant și un stabilizator.

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

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care respectiva tulpină bacteriană este liofilizată.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care atunci când compoziția este depozitată într-un container etanș la temperatura de aproximativ 4°C sau aproximativ 25°C și recipientul este plasat într-o atmosferă cu umiditate relativă de 50%, cel puțin 80% din tulpina bacteriană măsurată în unități formatoare de colonii, rămâne după o perioadă de cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.

Metode de cultivare

Tulpinile bacteriene utilizate în prezenta invenție pot fi cultivate folosind tehnici de microbiologie standard așa cum sunt detaliate, de exemplu, în referințele [40–42].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultivare poate fi mediu YCFA agar sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (la 100 ml, valori aproximative): casitonă (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g), $NaHCO_3$ (0,4 g), cisteină (0,1 g), K_2HPO_4 (0,045 g), KH_2PO_4 (0,045 g), NaCl (0,09 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0,09 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,009 g), $CaCl_2$ (0,009 g), rezazurină (0,1 mg), hemină (1 mg), biotină (1 μg), cobalamină (1 μg), acid p–aminobenzoic (3 μg), acid folic (5 μg) și piridoxamină (15 μg).

Tulpini bacteriene pentru utilizare în compozițiile de vaccin

Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene descrise aici sunt utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor sau stărilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. Aceasta este probabil o consecință a efectului pe care tulpinile bacteriene conform invenției îl au asupra sistemului imunitar al gazdei. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi, de asemenea, utile pentru prevenirea bolilor sau stărilor mediate de către IL-17 sau calea Th17, atunci când sunt administrate ca compoziții de vaccin. În anumite astfel de aplicații, tulpinile bacteriene conform invenției pot fi omorâte, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de aplicații, compozițiile pot cuprinde un adjuvant al vaccinului. În anumite aplicații, compozițiile sunt pentru administrare prin injecție, cum ar fi prin injectare subcutanată.

Generalități

Practica prezentei invenții va folosi, dacă nu se indică altfel, metode convenționle de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în cadrul competențelor în domeniu. Asemenea tehnici sunt explicate pe deplin în literatură. *Vezi*, de exemplu, referințele [43] și [44–50], *etc.*

Termenul „cuprinzând“ cuprinde „incluzând“ precum și „constând“, de exemplu o compoziție „cuprinzând“ X poate consta exclusiv din X sau poate include ceva suplimentar, de exemplu X + Y.

Termenul „circa“ în raport cu o valoare numerică *x* este opțional și înseamnă, de exemplu, *x*±10%.

Cuvântul „substanțial“ nu exclude „complet“, de exemplu, o compoziție care este „substanțial liberă“ de Y poate fi complet liberă de Y. Atunci când este necesar, termenul „substanțial“ poate fi omis din definiția invenției.

Referințele la o identitate procentuală de secvență între două secvențe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, procentele de nucleotide sunt același în compararea celor două secvențe. Această aliniere și procentul de omologie sau identitatea de secvență pot fi determinate utilizând programe cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [51]. O aliniere preferată este determinată de algoritmul de căutare a omologiilor Smith-Waterman, utilizând o căutare a golurilor afine cu o penalizare de deschidere a golului de 12 și o penalizare de extindere a distanței de 2, matricea BLOSUM 62. Algoritmul de căutare a omologiilor Smith-Waterman este dezvăluit în ref. [52].

Dacă nu se specifică altfel în mod specific, un procedeu sau o metodă care cuprinde numeroase etape poate cuprinde etape suplimentare la începutul sau la sfârșitul metodei sau poate cuprinde etape suplimentare intercalate. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau executate într-o ordine alternativă, dacă este cazul.

Sunt descrise aici diferite aplicații ale invenției. Se va avea în vedere că caracteristicile specificate în fiecare aplicație pot fi combinate cu alte caracteristici specificate, pentru a furniza alte aplicații. În particular, aplicațiile evidențiate aici ca fiind potrivite, tipice sau preferate pot fi combinate între ele (cu excepția cazului în care acestea se exclud reciproc).

EXEMPLE

Exemplul 1 – Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un model de astm indus de acarieni induși de praf de casă la șoareci

Rezumat

Șoarecii au fost administrați cu compoziții care conțin tulpini bacteriene conform invenției și au fost ulterior provocați cu extract de acarieni de praf domestic (HDM) pentru a provoca un răspuns inflamator alergic. Răspunsul inflamator la HDM include componente eozinofile și neutrofile, este mediat de către IL-17 și calea Th17 și este un model pentru astm. Mărimea și caracteristicile răspunsului inflamator expus de șoareci tratați cu compoziții conform invenției au fost comparate cu grupurile de control. S-a descoperit că compozițiile conform invenției atenuează răspunsul inflamator și reduc recrutarea eozinofilelor și neutrofilelor, indicând că acestea pot fi utile pentru tratarea afecțiunilor mediate de către IL-17 și Th17, cum ar fi eozinofilia, neutrofilia și astmul.

Tulpină

433: *Roseburia hominis*

Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratament cu martor vehicul (pe cale orală).
2. Tratamentul cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 433 (pe cale orală).
7. Grup martor pozitiv. Tratament cu dexametazonă (i.p.).
8. Grup martor netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 5

Ziua –14 până în ziua 13: administrarea zilnică a martorului vehicul pe cale orală (grupul 1).
Ziua –14 până în ziua 13: administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupurile 2–6).
Ziua 0, 2, 4, 7, 9, 11: administrarea a 15 µg de HDM (extract de acarieni din praf domestic – Număr de catalog: XPB70D3A25, Lot nr.: 231897, Greer Laboratories, Lenoir,) într-un volum de 30 µl PBS nazal (grupurile 1–8).
Ziua 0, 2, 4, 7, 9, 11 administrarea dexametazonei (i.p., 3 mg/kg, Sigma-Aldrich, număr de catalog D1159) (grupul 7).
Ziua 14 Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.
Numărul total de șoareci = 40.

Obiective și analize

În ziua 14, animalele au fost sacrificate prin injecție letală intraperitoneală cu pentabarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de un lavaj bronhoalveolar (BAL).

Celulele au fost izolate din lichidul BAL (de lavaj bronhoalveolar) și au fost numărate celulelor diferențiate (200 de celule/eșantion).

Material și metode

Șoareci. Șoarecii BALB/c femele în vârstă de șapte săptămâni au fost achiziționați de la Charles River Laboratories și alocați în mod aleatoriu în cuști, câte 5 șoareci per cușcă în total (cuști ventilate provenite de la Indulab AG, Gams, Switzerland Cage, tip: „The SealsafeTM – cage IVC“. Număr produs: 1248L). Cuștile au fost marcate cu numărul studiului, numărul grupului și data de începere a experimentului. Șoarecii au fost monitorizați săptămânal și au fost aclimatizați în laborator timp de 7 zile înainte de începerea studiului (Ziua Studiului – 14). Animalele au avut vârsta de 8 săptămâni în Ziua Studiului – 14. Apa potabilă și hrana au fost disponibile *ad libitum*. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Îngrijirea zilnică a animalelor a fost efectuată în conformitate cu autorizația locală numărul 2283.1 (eliberată și aprobată de: Service de consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Apă potabilă și hrană au fost disponibile *ad libitum* și s-au reîmprospătate o dată pe zi. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Regulamentele privind bunăstarea animalelor au

fost respectate așa cum au fost date de către autoritățile oficiale ale Elveției în baza Ordonanței 455.163 a FVO (Federal Veterinary Office) privind creșterea animalelor de laborator, producția de animale modificate genetic și metodele de experimentare pe animale.

Cultivarea inoculului de bacterii. Într-o stație de lucru sterilă, un crio-flacon de bacterii a fost dezghețat prin încălzire cu mâna înmănușată și circa 0,7 ml de conținut au fost injectați într-un tub Hungate (Cat Number, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), conținând 8 ml YCFA anaerob. Uzual au fost preparate două tuburi pe tulpină. Tuburile Hungate au fost apoi incubate (static) la temperatura de 37°C timp de până la 24–26 de ore (tulpina 433).

Cultivarea martorului vehicul. Un tub Hungate, care conține 8 ml de YCFA anaerob, a fost incubat (static) la temperatura de 37°C timp de 16 ore.

Administrarea inoculului de bacterii sau martorului vehicul. 400 µl de inocul de bacterii de cultură sau de martor vehicul au fost administrate pe zi prin gavaj oral.

Sensibilizarea intranazală. Șoarecii au fost anesteziați prin injectare i.p. cu 9,75 mg xilazol și 48,75 mg ketazol per kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Elveția) și dozați cu 15 µg de HDM (număr de catalog: XPB70D3A25, Lot nr.: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) într-un volum de 30 µl PBS nazal.

Prepararea și administrarea compusului martor pozitiv dexametazonă. Sarea disodică de 21–fosfat de dexametazonă (Sigma-Aldrich, nr. de catalog D1159, Lot nr SLBD.1030V) a fost dizolvată în H_2O și administrată animalelor într-o doză de 3 mg/kg într-un volum de 200 µl oral, în zilele indicate în protocolul de studiu de mai sus.

Procedura de terminare. În ziua 14, animalele au fost sacrificate prin injectare i.p. cu pentabarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavajul bronhoalveolar (BAL) cu 500 µl de soluție salină.

Măsurarea infiltrațiilor celulare în BAL. Celulele au fost izolate din fluidul BAL și au fost numărate celulele diferențiate pe baza criteriilor standard morfologice și citochimice.

Grafice și analize statistice. Toate graficele au fost generate cu Graphpad Prism Version 6 și a fost aplicat un test ANOVA uni-direcțional. Rezultatele analizei statistice au fost furnizate cu tabelele de date individuale. Clasele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei (ESM).

Rezultate și analize

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 1–9.

Nu a fost observată nici o morbiditate sau mortalitate la șoarecii tratați cu bacteria sau vehiculul. Cei doi martori, tratamentul cu vehicul (martorul negativ) și tratamentul cu dexametazonă (martorul pozitiv) s-au comportat așa cum era de așteptat, cu eozinofilia și neutrofilia afectate după tratamentul cu dexametazonă.

Tuplina 433 a fost eficace în ameliorarea magnitudinii răspunsului infiamator alergic. După cum se arată în Figurile 2 și 3, administrarea tulpiniii 433 a redus eozinofilele totale și proporția de eozinofile în BAL, ceea ce indică o eozinofilie redusă. În plus, administrareatulpinii 433 a condus la o reducere semnificativă statistic a neutrofilelor totale

și a proporției de neutrofile din BAL față de martorul tratat numai cu vehicul, așa cum se arată în Figurile 6 și 7.

Exemplul 2 – Eficacitatea inoculior bacterieni într-un model de astm neutrofil sever la șoareci

Rezumat

Șoarecilor li s-au administrat compozițiile care conțin tulpini bacteriene conform invenției și au fost ulterior sensibilizați prin administrarea subcutanată a extractului de acarieni din praful domestic (HDM) și au fost provocați cu o administrare intranazală de HDM pentru a modela răspunsul inflamator al astmului neutrofil sever. Mărimea și caracteristicile răspunsului inflamator prezentat de către șoarecii tratați cu compozițiile conform invenției au fost comparate cu grupurile martor. S-a constatat că compozițiile conform invenției ameliorează răspunsul inflamator și, în special, reduc recrutarea neutrofilelor, într-o manieră comparabilă cu martorul pozitiv care cuprinde administrarea de anticorpi anti-IL-17. De aceea, datele indică faptul că compozițiile din invenție pot fi utile pentru tratarea condițiilor mediate de către IL-17 și Th17, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Tulpină

433: *Roseburia hominis*

Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratamentul cu controlul vehiculului (oral).
2. Tratamentul cu inocul de bacterii terapeutice tulpina 433 (oral).
7. Grup martor pozitiv. Tratament cu anti-IL-17 (i.p.).
8. Grup martor netratat.
9: Șoareci sănătoși (linie de referință).

Numărul șoarecilor pe grup (grupul 1– 8) = 5

Ziua –14 până în ziua 17: administrarea zilnică a martorului vehicul pe cale orală (grupul 1).
Ziua –14 până în ziua 17: Administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupurile 2–6).
Ziua 0: Sensibilizarea cu HDM în CFA (s.c.) (grupurile 1–8).
Ziua 7: Sensibilizarea cu HDM în CFA (s.c.) (grupurile 1–8).
Zilele 13, 15, 17: Administrarea i.p. a anticorpului de neutralizare anti-IL-17 (grupul 7).
Ziua 14, 15, 16, 17: Provocarea cu HDM în 30 µl PBS nazal (grupul 1–8).
Ziua 18: Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Obiective și analize:

În ziua 14, animalele au fost sacrificate prin injecție intraperitoneală letală cu pentabarbitol (Streuli PharmaAG, Uznach, Cat: 1170139A) imediat urmată de un lavaj

bronhoalveolar (BAL). Celulele au fost izolate din fluidul BAL și s-au numărat celulele diferențiate (200 de celule/eșantion).

Materiale și metode

Șoareci. Șoarecii femele C57BL/6 în vârstă de șapte săptămâni au fost achiziționați de la Charles River Laboratories și au fost alocați aleatoriu în cuști, câte 5 șoareci per cușcă în total (cuști ventilate provenite de la Indulab AG, Gams, Switzerland Cage, tip: „The SealsafeTM – cage IVC“. Număr produs: 1248L). Cuștile au fost marcate cu numărul studiului, numărul grupului și data de începere a experimentului. Șoarecii au fost monitorizați săptămânal și au fost aclimatizați în laborator timp de 7 zile înainte de începerea studiului (Ziua Studiului – 14). Animalele au avut vârsta de 8 săptămâni în Ziua Studiului – 14. Apa potabilă și alimentele au fost disponibile *ad libitum* și înlocuite zilnic. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Îngrijirea zilnică a animalelor a fost efectuată în conformitate cu autorizația locală numărul 2283.1 (eliberată și aprobată de: Service de consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Apă potabilă și hrană au fost disponibile *ad libitum* și s-au reîmprospătate o dată pe zi. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Regulamentele privind bunăstarea animalelor au fost respectate așa cum au fost date de către autoritățile oficiale ale Elveției în baza Ordonanței 455.163 a FVO (Federal Veterinary Office) privind creșterea animalelor de laborator, producția de animale modificate genetic și metodele de experimentare pe animale.

Cultivarea inoculului de bacterii. Într-o stație de lucru sterilă, un crio-flacon de bacterii a fost dezghețat prin încălzire cu mâna înmănușată și 0,7 ml de conținut au fost injectați într-un tub Hungate (Cat Number, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), conținând 8 ml YCFA anaerob. Uzual au fost preparate două tuburi pe tulpină. Tuburile Hungate au fost apoi incubate (static) la temperatura de 37°C timp de până la 24–26 de ore (pentru tulpina 433).

Cultivarea martorului vehicul. Un tub Hungate, care conține 8 ml de YCFA anaerob, a fost incubat (static) la temperatura de 37°C timp de 16 ore.

Administrarea inoculului de bacterii sau vehiculului martor. 400 µl de inocul de bacterii de cultură sau de vehicul martor au fost administrate pe zi prin gavaj oral.

Sensibilizare la HDM. 50 µg de HDM (număr de catalog: XPB70D3A25, număr lot: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) în PBS au fost emulsionate într-un volum egal de adjuvant Freund complet (CFA Chondrex Inc. Washington, SUA) și administrate subcutanat într-un volum de 200 µl, de două ori în două săptămâni pe flancurile opuse. La o săptămână după cea de-a doua imunizare, șoarecii au fost anesteziați prin injectare i.p. cu 9,75 mg xilazol și 48,75 mg ketazol per kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Elveția) și apoi s-au administrat provocări intranazale de 15 µg de HDM într-un volum de 30 µl PBS timp de 4 zile consecutiv. Analiza a fost efectuată la o zi după provocarea finală.

Prepararea și administrarea compusului martor pozitiv — anticorpul anti-IL-17 de șoarece. Anticorpul neutralizant anti-IL-17 a fost obținut de la BioX Cell și a fost păstrat la temperatura de 4°C (clona 17F3, Cat # BE0173, BioX Cell) și administrat i.p. la o doză de 12,5 mg/kg în zilele indicate în protocolul de studiu de mai sus.

Procedura de terminare. În ziua 18, animalele au fost sacrificate prin injectare i.p. cu pentabarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavajul bronhoalveolar (BAL) în 500 µl de soluție salină.

Măsurarea infiltrațiilor celulare în BAL. Celulele au fost izolate din fluidul BAL și au fost numărate celulele diferențiate pe baza criteriilor morfologice și citochimice standard.

Grafice și analize statistice. Toate graficele au fost generate cu Graphpad Prism Version 6 și a fost aplicat un test ANOVA uni-direcțional. Rezultatele analizei statistice au fost furnizate cu tabelele de date individuale. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei (ESM).

Rezultate și analize

Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figurile 10–18.

Nu s-au observat morbidiate sau mortalitate la șorecii tratați cu bacteria saou cu vehiculul. Așa cum s-a arătat în Figurile 11, 12, 15 și 16, anumiți șoareci tratați cu tulpina 433 au prezentat o eozinofilie și o neutrofilie reduse.

Exemplul 3 – Eficacitatea inoculului bacterian pentru tratarea artritei la un model al artritei induse de colagenul de tip II la șoareci

Materiale și metode

Tulpină

433: *Roseburia hominis*

Culturi bacteriene

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

Tulpina bacteriană #433 a fost cultivată folosind stocuri în glicerol. Stocurile în glicerol au fost stocate la temperatura de –80°C. De trei ori pe săptămâpnă, stocurile în glicerol au fost a fost decongelate la temperatura camerei și plasate pe plăc YCFA. O parte nouă de glicerol a fost utilizată de fiecare dată. Bacteriile au fost lăsate să crească timp de până la 72 de ore pentru o placă dată.

Soluțiile care trebuie administrate animalelor au fost preparate de două ori pe zi, cu un interval de opt ore pentru tratamentele de dimineața (AM) și după-amiaza (PM). O colonie bacteriană a fost culeasă de pe placă și transferată într-un tub care conține mediu YCFA. Tulpina bacteriană #433 a fost lăsată să crească timp de 24 de ore înainte de administrarea AM. Bacteriile au fost subcultivate la 1% în mediu YCFA pentru administrarea PM. Valorile OD au fost înregistrate pentru fiecare tulpină după preparatele de tratament de dimineață și de după-amiază.

Modelul artritei induse de colagenul de tip II la șoareci

Șoareci masculi DBA/1 adulți au fost repartizați aleatoriu în grupuri experimentale și au fost lăsați să se aclimatizeze timp de două săptămâni. În ziua 0, animalelor li s-au administrat prin injectare subcutanată 100 microlitri dintr-o emulsie conținând 100 micrograme de colagen de tip II (CII) în adjuvant Freund incomplet suplimentat cu 4 mg/ml

Mycobacterium tuberculosis H37Ra. În ziua 21, animalelor li s-a administrat prin injectare subcutanată o emulsie de rapel conținând 100 µg de colagen de tip II în adjuvant Freund incomplet.

Tratamentele au fost date în conformitate cu schema de administrare de mai jos. Din ziua –14 până la sfârșitul experimentului în ziua 45, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Din ziua 21 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost evaluate de trei ori pe săptămână pentru semnele clinice de artrită care includ umflarea labelor posterioare și a celor din față, articulațiilor radio-carpale (încheieturi) și articulațiilor tibio-tarsale (glezne).

În ziua 45, șoarecii au fost sacrificați și au fost prelevate probe de sânge terminale pentru analiza citokinelor.

În Ziua –14, Ziua 0 și Ziua 45, probe de fecale au fost colectate pentru analiză microbiologică, înghețate imediat și stocate la temperatura de –80°C.

Modelul de artrită indusă de colagen (CIA) la șoareci este un model bine stabilit de șoarece pentru artrita reumatoidă [53]. Imunizarea cu CII provoacă o patogeneză care include câteva caracteristici patologice importante ale artritei reumatoide, incluzând hiperplazia sinovială, infiltrarea celulelor mononucleare și degradarea cartilajelor. În mod semnificativ, dezvoltarea CIA este mediată de către celulele Th17 prin secreția de IL-17A [54]. Răspunsul imunitar care stă la baza modelului de artrită este sporit prin utilizarea adjuvantului Freund suplimentat cu *Mycobacterium tuberculosis.*

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

Grupuri de tratament și doze

Toate grupurile au fost n = 15 (n = 12 pentru grupul principal de studiu și n = 3 pentru grupurile satelit).

Vehiculul utilizat pentru bioterapeutice a fost mediu cu extract de drojdie-casitonă-acizi grași (YCFA).

	Grup	Doză	Administrare		Iducerea bolii
			Cale	Regim	
1	Vehicul	5 ml/kg	PO	BID: Ziua –14–Sfârșit	Ziua 0: colagen/CFA, o dată, SC
6	Bioterapeutic #433	5 ml/kg			Ziua 21: colagen/IFA, o dată, SC
PO: gavaj oral, SC: injecție subcutanată, BID: de două ori pe zi, CFA: adjuvant complet Freund					

Mase corporale

Din ziua –14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Datele au fost reprezentate grafic ca (Medie ± ESM).

Observații clinice nespecifice

Începând cu ziua –14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost verificate zilnic pentru semne clinice nespecifice pentru a include postură anormală (cocoșată), stare anormală a pielii (piloerecție) și niveluri de activitate anormală (activitate redusă sau crescută).

Observații clinice

Din ziua 21 până la sfârșitul experimentului în ziua 45, animalele au fost evaluate de trei ori pe săptămână pentru semnele clinice de artrită care includ umflarea labelor din spate și din față, articulațiilor radio-carpale (încheieturile labelor din față) și articulațiilor tibio-tarsale (glezne). Fiecare membru a fost evaluat utilizând următoarea scală: (0) normal, (1) umflare ușoară, (2) umflare blândă, (3) umflare moderată și (4) umflare severă. Un scor clinic a fost calculat prin adunarea scorurilor corespunzătoare fiecărui membru. Scorul clinic maxim posibil pentru un animal a fost (16). Animalele cu un scor egal cu (12) în două ocazii consecutive și animalele cu un scor mai mare decât (12) în orice moment au fost sacrificate. Datele au fost notate ca (Medie ± ESM).

Analiza proliferării celulelor

În ziua 21, au fost sacrificate trei animale satelit pe grup și splinele au fost disecate. Celulele splenice au fost cultivate timp de 72 de ore în prezența sau în absența colagenului de tip II. După 72 de ore, celulele au fost pulsate peste noapte în prezența timidinei tritiate. Proliferarea celulelor a fost cuantificată prin măsurarea încorporării timidinei. Datele au fost notate ca (Medie ± ESM). Supernatanții au fost preluați și testați pentru prezența citokinelor-cheie.

Analiza citokinelor

Supernatanții din culturile de celule splenice au fost testați pentru a cuantifica TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-4, IL-10 și IL-17 de către Luminex. Datele au fost reprezentate grafic ca (Medie ± SEM).

Analiza microbiologică

În ziua –14, ziua 0 și ziua 45, probe de fecale au fost colectate de la fiecare animal, înghețate imediat și stocate la temperatura de –80°C. Cacumurile (inclusiv conținuturile) au fost înghețate imediat și depozitate la temperatura de –80°C. Un test de identificare bacteriană a fost efectuat zilnic prin placarea bacteriilor.

Histopatologie

La sfârșitul experimentului, labele posterioare au fost stocate în fixativ pentru țesut. Eșantioanele au fost transferate în soluție de decalcificare. Eșantioanele de țesut au fost prelucrate, secționate și colorate cu hematoxilină și eozină. Secțiunile au fost evaluate de un histopatolog calificat, orbit față de designul experimental, pentru semnele de artrită, care includ inflamația, afectarea cartilajului articular și deteriorarea osului metafizar subiacent. A fost utilizat un sistem detaliat de evaluare (*vezi* mai jos). Datele au fost reprezentate grafic ca (Medie ± ESM). Au fost furnizate date brute și analizate, precum și imagini reprezentative.

Tabelul 1: Sistemul de evaluare histopatologică

Grad	Descriere
Inflamaţie	
0	Articulație normal
1	Hiperplazie sinovială simplă cu inflamație dominată de neutrofile. Număr scăzut de neutrofile și macrofage în spațiul comun.
2	Hiperplazie sinovială cu inflamație moderată până la marcată, implicând atât neutrofile, cât și macrofage. Neutrofile și macrofage în spațiul articulațiilor; pot exista unele resturi de țesut necrotic.
3	Hiperplazia sinovială cu inflamație marcată implicând atât neutrofile, cât și macrofage. Pierderea mucoasei sinoviocitare. Inflamația se poate extinde de la sinoviu la țesutul înconjurător incluzând mușchiul. Numeroase neutrofile și macrofage în spațiul articular, împreună cu reziduuri semnificative de țesut necrotic.
Articulația leziunilor cartilajului	
0	Articulație normală
1	Articulația cartilajului prezintă doar schimbări degenerative ușoare. Formarea timpurie a pannusului poate fi prezentă periferic.
2	Articulația cartilajului prezintă modificări degenerative moderate și pierderi focale. Formarea pannusului este prezentă focal.
3	Distrugerea semnificativă și pierderea cartilajului articular cu formarea extinsă a pannusului.
Deteriorarea osului metafizar subiacente	
0	Articulație normală
1	Nu există nicio modificare a osului metafizar subiacent.
2	Poate exista necroză focală sau fibroză a osului metafizar.
3	Perturbarea sau distrugerea osului metafizar. Inflamația extinsă, necroză sau fibroză care se extinde până la spațiul medular al metafizei.

Rezultate și analize

Supraviețuire și observații clinice nespecifice

Unele animale au fost sacrificate înainte de sfârșitul programat al studiului, datorită severității semnelor clinice de artrită sau datorită severității observațiilor clinice nespecifice.

Două animale au fost sacrificate sau au fost găsite moarte în timpul perioadei de pre-tratament (Ziua –14 până în Ziua 0): un animal din grupul 1 (tratat cu vehicul, animalul a sosit de la furnizor cu un picior rupt și a fost sacrificat) și un animal din grupul 6 (tratat cu agentul bioterapeutic #433).

Zece animale au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice de artrită: cinci animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) și cinci animale din grupul 6 (tratate cu agentul bioterapeutic #433).

Patru animale au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice nespecifice, incluzând postura anormală (cocoșată), starea anormală a pielii (piloerecție), nivelurile anormale ale activității (activitate redusă): trei animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) și un animal din grupul 6 (tratat cu agentul bioterapeutic #433).

Mase corporale

Datele privind masa corporală înregistrate din Ziua –14 până în Ziua 0 și exprimate ca procent din greutățile corporale inițiale (Ziua –14) au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu Ziua –14, apoi pentru comparație multiplă cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în Figura 19. Datele obținute de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul planificat al experimentului au fost excluse din analize.

În comparație cu Ziua –14, administrarea de două ori pe zi prin gavaj oral a determinat o pierdere semnificativă de masă corporală în grupul tratat cu vehicul în Ziua –9 și Ziua –7.

Masele corporale înregistrate din Ziua 0 până în Ziua 28 și exprimate ca procent din masele corporale inițiale (Ziua 0) au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu Ziua 0 în grupul tratat cu vehicul apoi pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în Figura 20. Datele provenite de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul planificat al experimentului și de la animalele satelit au fost excluse din analize. Datele din Ziua 28, Ziua 35 și Ziua 42 au fost analizate în continuare prin ANOVA unidirecțională, urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul.

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

Observații clinice

Datele scorului clinic au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple între zile în grupul tratat cu vehicul, apoi pentru comparații multiple între grupurile experimentale și grupul tratat cu vehicul în fiecare zi. Datele sunt prezentate în Figura 21. Datele înregistrate de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul experimentului au fost excluse din analiză. Atunci când animalele au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice de artrită, ultimul scor înregistrat a fost raportat și utilizat în analizele statistice pentru următoarele zile.

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

Agentul bioterapeutic #433 a undis o reducere a scorurilor clinice în comparație cu grupul tratat cu vehicul din Ziua 28 până în Ziua 45, chiar dacă diferența nu a fost semnificativă.

Analiza proliferării celulare

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

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

Pentru a testa răspunsul proliferativ în prezența colagenului II (CII), splenocitele au fost cultivate în prezența CII la 50 µg/ml. Răspunsul proliferativ al splenocitelor la CII a fost analizat prin ANOVA bidirecțională, urmată de post-testul lui Sydak pentru comparații multiple între splenocitele nestimulate și cele stimulate cu CII și ANOVA unidirecțională urmată de post-testul lui Dunnett pentru compararea răspunsului stimulat cu CII în diferite grupuri experimentale cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în Figura 22.

CII a indus o creștere semnificativă a încorporarării de H^3–timidină (cpm) în comparație cu splenocitele nestimulate în grupul tratat cu vehicul ($p < 0,0001$).

Grupul tratat cu agentul bioterapeutic #433 a prezentat niveluri semnificativ mai reduse de splenocite induse de către CII în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Nivelurile de citokine din supernatanții de cultură tisulară

Nivelurile fiecărei citokine au fost măsurate în supernatanții de cultură tisulară derivați din culturi stimulate anti-CD3/CD28 prin analiză luminex. Acestea au prezentat răspunsuri robuste pentru toate citokinele măsurate (nivelurile medii în grupul tratat cu vehicul au fost după cum urmează: IL-4 = 6,406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-10 = 10,987 pg/ml; IL-17A = 11,447 pg/ml; IFN-γ = 15,581 pg/ml; TNF-α = 76 pg/ml).

Secțiunile următoare rezumă datele obținute din culturile stimulate de către colagenul II. Dacă este cazul, s-au efectuat analize statistice ale diferențelor dintre nivelurile de citokine din supernatanții splenocitelor nestimulate și stimulate cu CII folosind ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Sidak pentru comparații multiple, și ANOVA unidirecțională, urmată de post-testul Dunnett pentru compararea răspunsului stimulat cu CII în grupurile tratate cu agenți bioterapeutici cu grupul tratat cu vehicul. Nu a existat o diferență semnificativă în nivelurile de citokine între grupuri în ambele cazuri. Acest lucru se datorează probabil dimensiunii mici a eșantionului utilizat ($n = 3$).

Pentru a prezenta cu mai multă precizie distribuția datelor pentru citokine cu o răspândire substanțială a datelor, acestea sunt prezentate ca grafice împrăștiate.

Mediile grupurilor tratate cu IL-4 în supernatanții de cultură tisulară după stimularea cu CII au fost < 5 pg/ml. Acestea nu sunt considerate semnificative din punct de vedere biologic și nu sunt incluse aici. Mediile grupurilor tratate cu TNF-α în supernatanții de cultură tisulară după stimularea cu colagen au fost sub limita de cuantizare.

Nivelurile în supernatanți ale IFN-γ (Figura 23)

Împreună cu IL-17, IFN-γ este citokina majoră care conduce boala în modelul CIA. Graficul împrăștiat din Figura 23 demonstrează nivelurile de IFN-γ după stimularea cu CII, media grupului fiind mai mare pentru grupul tratat cu vehicul în compa-rație cu cel tratat cu agentul bioterapeutic.

Nivelurile în supernatanți ale IL-17A (Figura 24)

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

Nivelurile în supernatanți ale IL-10 (Figura 25)

Nivelurile de IL-10 în grupul tratat cu vehicul au fost de 13 pg/ml, și de 2,1 pg/ml pentru culturile stimulate cu CII, respectiv pentru culturile cu mediu martor. Niveluri mai ridicate de IL-10 (care este o citokină antiinflamatoare) pentru grupul tratat cu vehicul pot fi de așteptat deoarece inflamația și inducția citokinelor pro-inflamatorii pot fi însoțite de un mecanism de reacție antiinflamatorie.

Nivelurile în supernatanți ale IL-6 (Figura 26)

Citokinele inflamatorii, cum ar fi IL-6 și TNF-α, nu sunt produse tipic la niveluri ridicate în culturile anti-CII. Cu toate acestea, nivelurile lor pot fi modificate ca urmare a modulației imunitare. Nivelurile de IL-6 în culturile stimulate cu CII au fost modeste, atingând 10 pg/ml. Deși au fost mai mari decât în culturile în mediu de control, aceste diferențe au fost prea mici pentru a oferi motive pentru efectuarea analizei statistice.

Analiza microbiologică

Creșterea bacteriană a fost confirmată prin măsurarea densității optice la 600 nm utilizând un spectrofotometru. Identitatea bacteriană a fost confirmată prin compararea imaginilor de pe placă cu imaginile de referință.

În urma metodei de preparare îmbunătățită a bacteriilor, s-au administrat în mod consistent doze mari de tulpină bacteriană din Ziua –2 și Ziua –3, după cum se indică prin valorile ridicate ale OD măsurate.

Eșantioanele de fecale au fost colectate și înghețate rapid în Ziua –14, Ziua 0 și la terminare.

Histopatologie

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

Natura patologiei a fost așa cum era de așteptat pentru acest model, cu inflamația cronică extinsă mixtă a sinovium-ului și a burselor care se extinde pentru a implica țesuturile moi peri-articulare (mușchi, țesut adipos, colagen dermic). În articulațiile cele mai sever afectate a existat degenerarea și pierderea cartilajului articular cu resturi intraarticulare și inflamația și întreruperea structurii articulare și osoase prin fibroză și inflamație.

Incidența modificărilor histopatologice a fost: vehicul – 80% (16/20); agent bioterapeutic #433 – 55% (12/22). Tratamentul cu agent bioterapeutic #433 a redus incidența scorurilor histopatologice în articulațiile membrelor posterioare ale șoarecilor în comparație cu grupul tratat cu vehicul (*vezi* Figurile 65–66). Scorurile histopatologice au fost

analizate prin ANOVA uni-direcțională pentru datele neparametrice (testul Kruskal-Wallis), urmat de post-testul Dunn pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul, deși reducerea obținută de către agentul biotrapeutic #433 nu a fost semnificativă statistic în acestă analiză, agentul biotrapeutic #433 a indus o reducere a scorurilor de inflamare a articulațiilor observată în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul. Agentul biotrapeutic #433 a indus o reducere a scorurilor de deteriorare a cartilajului observată în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul. Agentul biotrapeutic #433 a indus o reducere a scorurilor de deteriorare a oaselor observată în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul. Agentul biotrapeutic #433 a indus o reducere a scorurilor histopatologice totale în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Rezumat

Scorurile clinice crescute au fost observate în Ziua 28 după prima administrare de colagen de tip II, așa cum se aștepta în acest model al artritei la șoareci DBA/1. Agentul bioterapeutic #433 s-a dovedit a fi eficace în tratarea artritei în acest model. Agentul bioterapeutic #433 a fost eficace pentru reducerea severității scorurilor clinice și pentru reducerea bolii patologice la nivelul articulațiilor, așa cum s-a demonstrat în analiza histopatologică.

Au fost observate răspunsuri de memorie proliferativă la colagenul II în culturile de splenocite din toate grupurile experimentale. Răspunsul specific colagenului a fost semnificativ redus după tratamentul cu agent bioterapeutic #433 (grupul 5).

Cele mai multe dintre citokinele testate ale celulelor T au prezentat creșteri detectabile între grupul stimuilat cu colagen II și martorri tratați cu mediu din grupul tratat cu vehicul. Aceste creșteri nu au fost atât de evidente în grupul tratat cu agenți bioterapeutici. Aceasta susține în linii mari răspunsurile de memorie proliferativă la colagenul II descris mai sus.

Au existat dovezi de suprimare a axei Th1/Th17, care este răspunsul patogen în acest model și în RA umană. Corelarea nivelurilor reduse de citokine cu proliferarea redusă este sugestivă pentru modularea imunitară. Nu a existat nici o dovadă că această modulare a rezultat fie din niveluri crescute ale IL-4 asociate cu Th2, fie cu creșteri ale citokinei modulatoare imunitar, IL-10.

Exemplul 4 – Analiza ulterioară a efectului inocularii bacteriene în modelul astmului indus de acarienii din praful domestic la șoareci

Șoarecii testați în Exemplul 1 au fost supuși analizei ulterioare pentru a caracteriza mai departe efectul compozițiilor conform invenției asupra răspunsului inflamator în astmul alergic.

Materiale și metode

Prelevarea sângelui și prepararea serului în ziua 14. Probele de sânge de la animale au fost colectate prin puncție cardiacă. Serul a fost izolat din proba de sânge prin centrifugare timp de 5 minute la 14000 g și depozitat la temperatura de –20°C.

Prelevarea organelor în ziua 14. Colectarea lobului pulmonar stâng în formalină pentru analiza histologică ulterioară. Colectarea lobilor pulmonari drepți (toți lobii rămași) și îndepărtarea serului pentru înghețarea instantanee și analiza ulterioară. Fluidul BAL rămas a fost înghețat pentru analiza ulterioară.

Măsurarea nivelurilor de anticorpi în ser și în fluidul BAL

Producția totală de anticorpi IgE și IgG1 specifici acarienilor de praf domestic (HDM) a fost măsurată în BAL și ser prin analiza ELISA.

Izolarea plămânilor și analiza histologică

Lobii pulmonari stângi au fost fixați în formalină, urmată de încorporarea în parafină, secționarea și colorarea cu hematoxilină și eozină și PAS. Evaluarea histologică ulterioară a fost efectuată în orb după cum urmează: cinci câmpuri de vedere aleatorii pentru fiecare probă au fost evaluate pentru inflamație (infiltrație peribronhială și infiltrație perivasculară) și producția de mucus. Infiltrarea inflamatorie a fost înregistrată cu următorul sistem de evaluare:

0 – normal
1 – infiltrate inflamatorii ușoare
2 – infiltrate inflamatorii moderate
3 – infiltrate inflamatorii marcate
4 – infiltrate inflamatorii severe
5 – infiltrate inflamatorii foarte severe

În fiecare câmp vizual, căile respiratorii au fost măsurate în dimensiune, și a fost cuantificat numărul celulelor în mucus/µm.

Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar

Lobii pulmonari drepți (toți lobii rămași) izolați pentru cuantificarea mediatorilor inflamatori au fost congelați instantaneu pentru măsurarea ulterioară a CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 și CCL5 prin analiză multiplex disponibilă comercial (Merck-Millipore). Analiza a fost efectuată în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Rezultate și analize

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 27–45.

În sprijinul descoperirilor descrise în Exemplul 1, analiza infiltratelor celulare din țesutul pulmonar al șoarecilor tratați cu tulpina 433 a arătat o reducere notabilă și semnificativă din punct de vedere statistic a scorului mediu de inflamație (*vezi* Figurile 31 și 33).

Au fost analizate nivelurile anticorpilor în lichidul BAL și ser (*vezi* Figurile 27–30). Nu a fost observat niciun efect clar al tratamentului bacterian asupra nivelurilor serice ale anticorpilor. Acest lucru poate reflecta un eșec în experiment, deoarece răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar martorii pozitivi și negativi nu par să se fi comportat așa cum ar fi de așteptat. De asemenea, nivelurile de anticorpi serice de referință ar fi putut masca orice modificare.

În mod similar, nu a fost observat niciun efect clar al tratamentului bacterian asupra nivelurilor de citokine în țesutul pulmonar (*vezi* Figurile 35–45). Din nou, acest lucru poate reflecta un eșec în experiment, deoarece răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar martorii pozitivi și negativi nu par să se fi comportat așa cum ar fi de așteptat. Este, de asemenea, posibil ca mecanismul de acțiune implicat să influențeze reacțiile anterioare ale citokinelor care nu au mai putut fi detectate în ziua 4 după provocarea finală cu HDM a căilor respiratorii. O atenție specială trebuie acordată interpretării datelor referitoare la citokine în studiul curent, datorită variabilității nivelurilor detectate. Această variabilitate poate fi explicată în parte prin faptul că țesutul pulmonar a fost separat pentru diferitele analize și, astfel, un lob de plămâni s-ar putea să nu fi fost pe deplin reprezentativ sau comparabil cu același lob din alți șoareci datorită distribuției neuniforme a inflamației.

Exemplul 5 – Analiza ulterioară a efectului inoculării bacteriene în modelul astmului neutrofil sever la șoareci

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

Materiale și metode

Prelevarea organelor în ziua 18. Colectarea lobului pulmonar stâng în formalină pentru analiza histologică ulterioară. Colectarea lobilor pulmonari drepți (toți lobii rămași) și îndepărtarea serului pentru înghețarea instantanee și analiza ulterioară. Fluidul BAL rămas a fost înghețat rapid pentru analiza ulterioară.

Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar (analiză ulterioară). Lobii pulmonari drepți (toți lobii rămași) izolați pentru cuantificarea mediatorilor inflamatori au fost înghețați instantaneu pentru măsurarea ulterioară a IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa , IL-17F, IL-23 și IL-33 prin analiză multiplex disponibilă comercial (Merck-Millipore). Analiza a fost efectuată în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Măsurarea nivelurilor de anticorpi în ser și fluidul BAL (analiză ulterioară). Producția de anticorpi IgG1 și IgG2a specifici acarienilor de praf domestic (HDM) a fost măsurată în BAL și ser prin analiză ELISA.

Izolarea plămânilor și analiza histologică (analiză ulterioară). Lobii pulmonari stângi au fost fixați în formalină, urmată de încorporarea în parafină, secționarea și colorarea cu hematoxilină și eozină și PAS. Evaluarea histologică ulterioară a fost efectuată în orb după cum urmează: Cinci câmpuri de vedere aleatorii pentru fiecare eșantion au fost evaluate pentru inflamație (infiltrație peribronhială și infiltrație perivasculară) și producție de mucus. Infiltrarea inflamatorie a fost evaluată cu următorul sistem de evaluare:

0 – normal
1 – infiltrate inflamatorii ușoare
2 – infiltrate inflamatorii moderate
3 – infiltrate inflamatorii marcate
4 – infiltrate inflamatorii severe
5 – infiltrate inflamatorii foarte severe

Rezultate și analize

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 46–63.

Analiza ulterioară a nivelurilor de anticorpi a arătat că eficacitatea tulpinii bacteriene 433 a fost, de asemenea, reflectată în nivelurile reduse ale IgG1 specifice HDM în fluidul BAL și ser (*vezi* Figurile 46 și 48). Nu pot fi trase concluzii ferme privind efectul asupra nivelurilor de IgG2a. În general, datele din analiza anticorpului sugerează o reducere legată de un răspuns inflamator global redus, spre deosebire de un efect selectiv asupra comutării izotipului de anticorp.

În ceea ce privește nivelurile de citokine, ca și în cazul Exemplului 4, răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar martorii pozitivi și negativi nu par să se fi comportat așa cum ar fi fost de așteptat în mod necesar. Este, de asemenea, posibil ca mecanismul de acțiune să influențeze răspunsurile anterioare ale citokinelor care nu mai pot fi detectate în ziua 4 după provocarea finală cu HDM a căilor respiratorii. O atenție specială trebuie acordată interpretării datelor referitoare la citokine în studiul curent, datorită variabilității nivelurilor detectate. Această variabilitate poate fi explicată în parte prin faptul că țesutul pulmonar a fost separat pentru analizele diferite și, astfel, un lob de plămâni s-ar putea să nu fi fost pe deplin reprezentativ sau comparabil cu același lob din alți șoareci datorită distribuției neuniforme a inflamației. În ciuda acestei variabilități, s-a demonstrat un efect antiinflamator clar asupra nivelurilor citokinelor pentru tulpina 433, iar martorul pozitiv anticorp anti-IL-17 s-a comportat în general așa cum era de așteptat.

Cu dezavantajele de mai sus, datele din Figura 55 sugerează că tratamentul cu tulpinile bacteriene conform invenției și în special tulpina 433 poate realiza o reducere a nivelurilor de IFNγ, care poate indica un mecanism de acțiune legat de influențele asupra eliberării de chemokine (și astfel de recrutare a celulelor) de către celulele imunitare stromale sau înnăscute. IFNγ este implicat în calea Th17. Luând împreună acest set de date, se poate trage concluzia clară că tulpina 433 a fost eficace pentru protejarea șoarecilor împotriva inflamației la acest model al astmului neutrofil sever la șoareci.

Exemplul 6 – Eficacitatea inoculării bacteriene într-un model al sclerozei multiple la șoareci

Rezumat

Șoarecilor li s-au administrat compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției și șoarecii au fost ulterior imunizați cu glicoproteină oligendendrocitară de mielină pentru a induce encefalomielita autoimună experimentală (EAE). EAE este modelul experimental cel mai frecvent utilizat pentru scleroza multiplă la om. S-a constatat că compozițiile conform invenției au un efect izbitor asupra incidenței bolii și asupra severității bolii.

Tulpină

433: bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 43283

Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratamentul cu martor vehicul (pe cale orală).
5. Tratament cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 433 (pe cale orală).
9. Grup martor pozitiv. Tratament cu dexametazonă (i.p.).
10. Grup martor netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 10

Ziua –14 până în ziua 27: administrarea zilnică a martorului vehicul pe cale orală (grupul 1).
Ziua –14 până în ziua 27: administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupul 5).
Zile 0–28: administrarea dexametazonei (i.p.) de trei ori pe săptămână (grupul 9).
Ziua 0: MOG35–55 (glicoproteină oligendendocitară de mielină – 2 mg/ml) și CFA (2 mg/ml MTB) au fost amestecate 1:1 rezultând soluții de 1 mg/ml. 100 µl din amestecul de peptidă-CFA au fost injectați subcutanat în fiecare picior posterior. Administrarea toxinei pertussis s-a făcut intraperitoneal (300 ng).
Ziua 1: administrarea intraperitoneală a toxinei pertussis (300 ng).
Ziua 7 – în continuare: măsurarea incidenței bolii și a greutății de trei ori pe săptămână.

Obiective și analize

Șoarecii au fost analizați pentru incidența bolii și severitatea bolii de trei ori pe săptămână. Evaluarea a fost efectuată în orb. Gravitatea bolii a fost evaluată utilizând un scor clinic cuprins între 0 și 5, cu 5 indicând un șoarece mort (*vezi* sistemul de evaluare clinic de mai jos).

Monitorizare

În zilele indicate, șoarecii au fost cântăriți și observați pentru evaluarea activității bolii și incidenței bolii.

Observații privind evaluarea activității bolii:

0 – Nu au apărut modificări evidente ale funcției motorii în comparație cu șoarecii neimunizați.
0,5 – Vârful cozii este moale.
1,0 – Coada moale.
1,5 – Coadă moale și inhibare a picioarelor din spate.
2,0 – Coada moale și slăbiciunea picioarelor din spate;
SAU – Există semne evidente de înclinare a capului când se observă mersul pe jos. Echilibrul este slab.
2,5 – Coada moale și târârea picioarelor din spate;
SAU – Există o înclinare puternică a capului care cauzează căderea ocazională a șoarecelui.
3,0 – Coada moale și paralizia completă a picioarelor din spate.
3,5 – Coada moale și paralizia completă a picioarelor din spate.
În plus: șoarecele se deplasează în jurul cuștii, dar atunci când este plasat pe partea sa, nu este în măsură să se orienteze.
Picioarele din spate sunt împreună pe o parte a corpului.
4,0 – Coada moale, paralizie completă a piciorelor din spate și paralizia parțială a picioarelor din față.
– Șoarecele se mișcă minim în jurul cuștii, dar pare alert și se hrănește.
4,5 – Paralizia completă a picioarelor din spate și parțială a celor din față, fără mișcare în jurul cuștii.
Șoarecele este imediat eutanasiat și scos din cușcă.
5,0 – Șoarecele este eutanasiat din cauza unei paralizii severe.

Când un animal are un scor de activitate al bolii egal sau mai mare de 1, se consideră că are un scor pozitiv referitor la incidența bolii.

Rezultate

Rezultatele studiului sunt prezentate în Figurile 70 și 71.

Inducerea bolii în grupurile martor negative a avut succes, cu scoruri ridicate demonstrate de martorul vehicul și de martorul netratat. Efectul tratamentului cu tulpina 433 a fost izbitor și șoarecii tratați cu tulpina 433 au prezentat o incidență a bolii și o severitate a bolii reduse semnificativ. Într-adevăr, reducerea incidenței bolii și a severității bolii a fost comparabilă cu grupul martor pozitiv. Aceste date indică faptul că tulpina 433 poate fi utilă pentru tratarea sau prevenirea sclerozei multiple.

Exemplul 7 – Testarea stabilității

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

Secvenţe

SEQ ID NO: 1 (*Roseburia hominis* tulpina A2–181 gena ARN ribozomal 16S, secvență parțială – AY804148)

```
   1 taaaggttga tcctggctca ggatgaacgc tggaggcgtg cttaacacat gcaagtcgaa
  61 cgaagcactt taattgattt cttcggaatg aagtttttgt gactgagtgg cggacgggtg
 121 agtaacgcgt gggtaacctc gctcatacag ggggataaca gttggaaacg actgctaata
 181 ccgcataagc gcacaggatt gcatgatcca gtgtgaaaaa ctccggtggt atgagatgga
 241 cccgcgtctg attagccagt tggcggggta acggcccacc aaagcgacga tcagtagccg
 301 acctgagagg gtgaccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc
 361 agcagtgggt aatattgcac aatgggggaa accctgatgc agcgacgccg agtgagcgaa
 421 gaagtatttc ggtatgtaaa gctctatcag caggaagaag aatgacggta cctgactaaa
 481 aagcaccggc taaatacgtg ccagcagccg cggtaatacg tatggtgcaa gcgttatccg
 541 gatttactgg gtgtaaaggg agcgcaggcg gtacggcaag tctgatgtga aatcccgggg
 601 ctcaaccccg gtactgcatt ggaaactgtc ggactagggt gtctgagggg taagtggaat
 661 tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt
 721 actggacgat tactgacgct gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc
 781 tggtagtcca cgccgtaaac gatgaatact aggtgtcggg gagcattgct cttcggtgcc
 841 gcagcaaacg caataagtat tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga aactcaaagg
 901 aattgacggg gacccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga
 961 accttaccaa gtcttgacat cccactgaca aagtatgtaa tgtactttct cttcggagca
1021 gtggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc
1081 cgcaacgagc gcaaccccta ttcttagtag ccagcggttt ggccgggcac tctagggaga
1141 ctgccaggga taacctggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac
1201 ttgggctaca cacgtgctac aatggcgtaa acaaagggaa gcaatcccgc gagggggagc
1261 aaatctcaaa aataacgtct cagttcggac tgtagtctgc aactcgacta cacgaagctg
1321 gaatcgctag taatcgcgaa tcagaatgtc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtacac
1381 accgcccgtc acaccatggg agttggtaat gcccgaagtc agtgacccaa ccgcaaggag
1441 ggagctgccg aagcaggact gataactggg gtgaagtcgt aacaagt
```

SEQ ID NO: 2 (*Roseburia hominis* Gena A2–183 ARNr 16s, tip tulpină A2–183T – AJ270482)

```
   1 gatcctggct caggatgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgaagcac
  61 tttaattgat ttcttcggaa tgaagttttt gtgactgagt ggcggacggg tgagtaacgc
 121 gtgggtaacc tgcctcatac agggggataa cagttggaaa cgactgctaa taccgcataa
 181 gcgcacagga ttgcatgatc cagtgtgaaa aactccggtg gtatgagatg gacccgcgtc
 241 tgattagcca gttggcgggg taacggccca ccaaagcgac gatcagtagc cgacctgaga
 301 gggtgaccgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtgg
 361 ggaatattgc acaatggggg aaaccctgat gcagcgacgc cgcgtgagcg aagaagtatt
 421 tcggtatgta aagctctatc agcagggaag aagaatgcgg tacctgacta agaagcaccg
 481 gctaaatacg tgccagcagc cgcggtaata cgtatggtgc aagcgttatc cggatttact
 541 gggtgtaaag ggagcgcagg cggtacggca agtctgatgt gaaatcccgg ggctcaaccc
 601 cggtactgca ttggaaactg tcggactaga gtgtcggagg ggtaagtgga attcctagtg
 661 tagcggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg cgaaggcggc ttactggacg
 721 attactgacg ctgaggctcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc
 781 cacgccgtaa acgatgaata ctaggtgtcg gggagcattg ctcttcggtg ccgcagcaaa
 841 cgcaataagt attccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg
 901 gggacccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc
 961 aagtcttgac atcccactga cagagtatgt aatgtacttt ctcttcggag cagtggtgac
1021 aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
1081 gcgcaacccc tattcttagt agccagcggt tcggccgggc actctaggga gactgccagg
1141 gataacctgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acttgggcta
1201 cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcaatccc gcgagggggga gcaaatctca
1261 aaaataacgt ctcagttcgg actgtagtct gcaactcgac tacacgaagc tggaatcgct
1321 agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac acaccgcccg
1381 tcacaccatg ggagttggta atgcccgaag tcagtgaccc aaccgcaagg agggagctgc
1441 cgaaggcagg actgataact ggggtgaagt cgtaacaagg gtacg
```

SEQ ID NO: 3 (secvență consens ARNr 16s pentru *Roseburia hominis* tulpina 433)

AAGAGTTTGGGHCAGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCACTTTAATTGA
TTTCTTCGGAATGAAGTTTTTGTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGG
ATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGGATTGCATGATCCAGTGTGAAAAACTCCGGTGGTA
TGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCCAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAGA
ATGACGGTACCTGACTAAGAAGCACCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATC
CGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTACGGCAAGTCTGATGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGTACT
GCATTGGAAACTGTCGGACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTA
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGAGCATTGCTCTTCGGTGCCGCAGCA
AACGCAATAAGTATNCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
GGTGGAGCNTGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCCACTGACAGAGTATGTAA
TGTACTTTCTCTTCGGAGCAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTCTTAGTAGCCAGCGGTTTGGCCGGGCACTCTAGGGAGACTGCCAGGGATAAC
CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAA
CAAAGGGAAGCAATCCCGCGAGGGGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGTAGTCTGCAACTCGAC
TACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGGGAGTTGGTAATGCCCGAAGTCAGTGACCCAACCGCAAGGAGGGAGCTGCCGAAGGCAGGACTG
ATAACTGGGGTGAAGTCTACRSAGGGTAGCCGTRMMC

SECV ID NR: 4 (secvența genomului tulpina 433) – vezi lista electronică a secvențelor din WO 2016/203221.

REFERINȚE

[1] Spor și colab. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9 (4): 279–90.
[2] Eckburg și colab. (2005) *Science*. 10; 308 (5728): 1635–8.
[3] Macpherson și colab. (2001) *Microbes Infect.* 3 (12): 1021–1035
[4] Macpherson și colab. (2002) *Cell Mol Life Sci*. 59 (12): 2088–96.
[5] Mazmanian și colab. (2005) *Cell* 15; 122 (1): 107–18.
[6] Frank și colab. (2007) *PNAS* 104 (34): 13780–5.
[7] Scanlan și colab. (2006) *J Clin Microbiol*. 44 (11): 3980–8.
[8] Kang și colab. (2010) *Inflamm Bowel Dis*. 16 (12): 2034–42.
[9] Machiels și colab. (2013) *Gut*. 63 (8): 1275–1283.
[10] WO 2013/050792
[11] WO 03/046580
[12] WO 2013/008039
[13] WO 2014/167338
[14] Goldin și Gorbach (2008) *Clin Infect Dis*. 46 Suppl 2: S96–100.
[15] Azad și colab. (2013) *BMJ*. 347: f6471.
[16] Stanton și Savage (1983) *Appl Environ Microbiol*. 45 (5): 1677–1684
[17] Duncan și colab. (2006) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 56: 2437–2441
[18] Masco și colab. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 557–563.
[19] Srůtková și colab. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87 (1): 10–6.
[20] Ye et al. (2015) *PLoS One*. 10 (1): e0117704.

[21] Fabro și colab. (2015) *Immunobiology*. 220 (1): 124–35.
[22] Yin și colab. (2014) *Imumnogenetics*. 66 (3): 215–8.
[23] Cheluvappa și colab. (2014) *Clin Exp Immunol*. 175 (2): 316–22.
[24] Schieck și colab. (2014) *J Allergy Clin Immunol*. 133 (3): 888–91.
[25] Balato și colab. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 28 (8): 1016–1024.
[26] Monteleone și colab. (2011) *BMC Medicine*. 2011, 9:122.
[27] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256–259
[28] Miossec și Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov*. 11 (10): 763–76.
[29] Yang și colab. (2014) *Trendis Pharmacol Sci.* 35 (10): 493–500.
[30] Koenders și colab. (2006) *J. Immunol.* 176: 6262 – 6269.
[31] Amedei și colab. (2012) *Int J Mol Sci.* 13 (10): 13438–60.
[32] Shabgah și colab. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol*. 31 (4): 256–61.
[33] Miyamoto–Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol*., 54, 9–24.
[34] „Cryopreservation and Freeze-Drying Procols“, editată de către Day și McLellan, Humana Press.
[35] Leslie și colab. (1995) *Apl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
[36] Mitropoulou și colab. (2013*) J Nutr Metab*. (2013) 716861.
[37] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol*. 3 (2): 39–48.
[38] „Handbook of Pharmaceutical Excipients“, ediția a doua, (1994), editată de către A Wade și PJ Weller
[39] „Remington's Pharmaceutical Sciences“, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro editor, 1985)
[40] „Handbook of Microbiological Media“, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
[41] „Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry“ (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
[42] Strobel (2009) *Methods Mol Biol*. 581: 247–61.
[43] Gennaro (2000) „Remington: The Science and Practice of Pharmacy“, ediția a XX-a, ISBN: 0683306472
[44] „Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course“, (Ream și colab., editori, 1998, Academic Press).
[45] „Methods in Enzymology“ (S. Colowick și N. Kaplan, editori, Academic Press, Inc.)
[46] „Handbook of Experimental Immunology“, Vol. I–IV (D. M. Weir și C. C. Blackwell, editori, 1986, Blackwell Scientific Publications)
[47] Sambrook și colab. (2001) „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, ediția a III-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
[48] „Handbook of Surface and Colloidal Chemistry“ (Birdi, K.S. editor, CRC Press, 1997)
[49] Ausubel și colab. (editori) (2002) „Short protocols in molecular biology“, ediția a V-a (Protocoale curente).
[50] „PCR (Introduction to Biotechniques Series)“, ediția a doua, (Newton & Graham editori, 1997, Springer Verlag).
[51] „Current Protocols in Molecular Biology“ (F. M. Ausubel și colab., editori, 1987) Supliment 30.
[52] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math*. 2: 482–489.
[53] Brand și colab. (2007) *Nature Protocols*, 2 (5): 1269–1275
[54] Jiao și colab. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184 (4): 1085–93.

LISTA DE SECVENȚIE

<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED

<120> Compoziții care conțin tulpini bacteriene

<130> P065780WO

<150> GB 1510468.0
<151> 2015-06-15

<150> GB 1606807.4
<151> 2016-04-19

<160> 3

<170> SeqWin2010, versiunea 1.0

<210> 1
<211> 1487
<212> ADN
<213> Roseburia hominis

<400> 1

```
taaaggttga tcctggctca ggatgaacgc tggaggcgtg cttaacacat gcaagtcgaa   60
cgaagcactt taattgattt cttcggaatg aagtttttgt gactgagtgg cggacgggtg  120
agtaacgcgt gggtaacctc gctcatacag ggggataaca gttggaaacg actgctaata  180
ccgcataagc gcacaggatt gcatgatcca gtgtgaaaaa ctccggtggt atgagatgga  240
cccgcgtctg attagccagt tggcggggta acggcccacc aaagcgacga tcagtagccg  300
acctgagagg gtgaccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc  360
agcagtgggt aatattgcac aatgggggaa accctgatgc agcgacgccg agtgagcgaa  420
gaagtatttc ggtatgtaaa gctctatcag caggaagaag aatgacggta cctgactaaa  480
aagcaccggc taaatacgtg ccagcagccg cggtaatacg tatggtgcaa gcgttatccg  540
gatttactgg gtgtaaaggg agcgcaggcg gtacggcaag tctgatgtga aatcccgggg  600
ctcaaccccg gtactgcatt ggaaactgtc ggactagggt gtctgagggg taagtggaat  660
tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt  720
actggacgat tactgacgct gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc  780
tggtagtcca cgccgtaaac gatgaatact aggtgtcggg gagcattgct cttcggtgcc  840
gcagcaaacg caataagtat tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga aactcaaagg  900
aattgacggg gacccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga  960
accttaccaa gtcttgacat cccactgaca aagtatgtaa tgtactttct cttcggagca 1020
gtggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc 1080
cgcaacgagc gcaacccccta ttcttagtag ccagcggttt ggccgggcac tctagggaga 1140
ctgccaggga taacctggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac 1200
ttgggctaca cacgtgctac aatggcgtaa acaaagggaa gcaatcccgc gagggggagc 1260
aaatctcaaa aataacgtct cagttcggac tgtagtctgc aactcgacta cacgaagctg 1320
gaatcgctag taatcgcgaa tcagaatgtc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtacac 1380
accgcccgtc acaccatggg agttggtaat gcccgaagtc agtgacccaa ccgcaaggag 1440
ggagctgccg aagcaggact gataactggg gtgaagtcgt aacaagt               1487
```

<210> 2
<211> 1485
<212> ADN
<213> Roseburia hominis

<400> 2

gatcctggct caggatgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgaagcac 60
tttaattgat ttcttcggaa tgaagttttt gtgactgagt ggcggacggg tgagtaacgc 120
gtgggtaacc tgcctcatac agggggataa cagttggaaa cgactgctaa taccgcataa 180
gcgcacagga ttgcatgatc cagtgtgaaa aactccggtg gtatgagatg gacccgcgtc 240
tgattagcca gttggcgggg taacggccca ccaaagcgac gatcagtagc cgacctgaga 300
gggtgaccgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtgg 360
ggaatattgc acaatggggg aaaccctgat gcagcgacgc cgcgtgagcg aagaagtatt 420
tcggtatgta aagctctatc agcagggaag aagaatgcgg tacctgacta agaagcaccg 480
gctaaatacg tgccagcagc cgcggtaata cgtatggtgc aagcgttatc cggatttact 540
gggtgtaaag ggagcgcagg cggtacggca agtctgatgt gaaatcccgg ggctcaaccc 600
cggtactgca ttggaaactg tcggactaga gtgtcggagg ggtaagtgga attcctagtg 660
tagcggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg cgaaggcggc ttactggacg 720
attactgacg ctgaggctcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc 780
cacgccgtaa acgatgaata ctaggtgtcg gggagcattg ctcttcggtg ccgcagcaaa 840
cgcaataagt attccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg 900
gggacccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960
aagtcttgac atcccactga cagagtatgt aatgtacttt ctcttcggag cagtggtgac 1020
aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga 1080
gcgcaacccc tattcttagt agccagcggt tcggccgggc actctaggga gactgccagg 1140
gataacctgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acttgggcta 1200
cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcaatccc gcgagggggga gcaaatctca 1260
aaaataacgt ctcagttcgg actgtagtct gcaactcgac tacacgaagc tggaatcgct 1320
agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac acaccgcccg 1380
tcacaccatg ggagttggta atgcccgaag tcagtgaccc aaccgcaagg agggagctgc 1440
cgaaggcagg actgataact ggggtgaagt cgtaacaagg gtacg 1485

<210> 3
<211> 1500
<212> ADN
<213> Roseburia hominis
<400> 3

aagagtttgg ghcaggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cttaacacat gcaagtcgaa 60
cgaagcactt taattgattt cttcggaatg aagtttttgt gactgagtgg cggacgggtg 120
agtaacgcgt gggtaacctg cctcatacag ggggataaca gttggaaacg actgctaata 180
ccgcataagc gcacaggatt gcatgatcca gtgtgaaaaa ctccggtggt atgagatgga 240
cccgcgtctg attagccagt tggcggggta acggcccacc aaagcgacga tcagtagccg 300
acctgagagg gtgaccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc 360
agcagtgggg aatattgcac aatgggggaa accctgatgc agcgacgccg cgtgagcgaa 420
gaagtatttc ggtatgtaaa gctctatcag cagggaagaa gaatgacggt acctgactaa 480
gaagcaccgg ctaaatacgt gccagcagcc gcggtaatac gtatggtgca agcgttatcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gagcgcaggc ggtacggcaa gtctgatgtg aaatcccggg 600
gctcaacccc ggtactgcat tggaaactgt cggactagag tgtcggaggg gtaagtggaa 660
ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggct 720
tactggacga ttactgacgc tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgtcgg ggagcattgc tcttcggtgc 840
cgcagcaaac gcaataagta tnccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg aaactcaaag 900
gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcntgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca agtcttgaca tcccactgac agagtatgta atgtactttc tcttcggagc 1020
agtggtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc 1080
ccgcaacgag cgcaacccct attcttagta gccagcggtt tggccgggca ctctagggag 1140
actgccaggg ataacctgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga 1200
cttgggctac acacgtgcta caatggcgta aacaaaggga agcaatcccg cgagggggag 1260
caaatctcaa aaataacgtc tcagttcgga ctgtagtctg caactcgact acacgaagct 1320
ggaatcgcta gtaatcgcga atcagaatgt cgcggtgaat acgttcccgg gtcttgtaca 1380
caccgcccgt cacaccatgg gagttggtaa tgcccgaagt cagtgaccca accgcaagga 1440
gggagctgcc gaaggcagga ctgataactg gggtgaagtc tacrsagggt agccgtrmmc 1500