

SIB EX5409R

P065781SM:CJM/TSP/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° **16731640.5**, pubblicazione n° **3240554**

a nome di **4D Pharma Research Limited**,

di **Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZS, Regno Unito**

* * * * *

"BLAUTIA STERCORIS E WEXLERAE PER USO NEL TRATTAMENTO DI MALATTIE
INFIAMMATORIE ED AUTOIMMUNI"

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO

La presente invenzione è nel campo di composizioni comprendenti ceppi batterici isolati dal tratto digestivo dei mammiferi e l'uso di tali composizioni nel trattamento della malattia.

FONDAMENTO DELL'INVENZIONE

Si ritiene che l'intestino umano sia sterile durante la gestazione, ma esso è esposto ad una grande varietà di microbi materni e ambientali immediatamente dopo la nascita. Successivamente, si verifica un periodo dinamico di colonizzazione e successione microbica, che è influenzato da fattori come la modalità di parto, ambiente, dieta e genotipo dell'ospite, che incidono tutti sulla composizione del microbiota intestinale, in particolare durante i primi anni di vita. Successivamente, il microbiota si stabilizza e diventa simile a quello degli adulti [1]. Il microbiota intestinale umano contiene più di 500-1000 filotipi diversi appartenenti essenzialmente a due principali divisioni batteriche, i Bacteroidetes e i Firmicutes [2]. Le relazioni simbiotiche efficaci derivanti dalla colonizzazione batterica dell'intestino umano hanno prodotto un'ampia varietà di funzioni metaboliche, strutturali, protettive e altre funzioni benefiche. Le attività metaboliche potenziate dell'intestino colonizzato assicurano che i componenti nutrizionali altrimenti indigeribili vengano degradati con il rilascio di sottoprodotti che forniscono un'importante fonte di nutrienti per l'ospite. Analogamente, l'importanza immunologica del microbiota intestinale è ampiamente riconosciuta ed è illustrata in animali privi di germi che hanno un sistema immunitario compromesso che è ricostituito a livello funzionale in seguito all'introduzione di batteri commensali [3-5].

Variazioni drastiche nella composizione del microbiota sono state documentate in disturbi gastrointestinali come la malattia infiammatoria intestinale (IBD). Ad esempio, i livelli di batteri di *Clostridium* agglomerato XIVa sono ridotti nei pazienti con IBD mentre i numeri di *E. coli* sono aumentati, suggerendo uno spostamento nell'equilibrio di simbionti e patobionti all'interno dell'intestino [6-9]. In maniera interessante, questa disbiosi microbica è inoltre associata a squilibri nelle popolazioni di cellule T effettrici.

Come riconoscimento del potenziale effetto positivo che alcuni ceppi batterici possono avere sull'intestino animale, vari ceppi sono stati proposti per uso nel trattamento di varie malattie (si vedano, ad esempio, [10-13]). Inoltre, alcuni ceppi, inclusi principalmente ceppi di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sono stati proposti per uso nel trattare varie malattie infiammatorie e autoimmuni che non sono direttamente collegate all'intestino (si vedano [14] e [15] per studi). Tuttavia, la relazione tra diverse malattie e diversi ceppi batterici, e gli esatti effetti di particolari ceppi batterici sull'intestino e a livello sistemico e su qualsiasi particolare tipo di malattia, sono scarsamente caratterizzati.

Vi è una necessità nella tecnica di nuovi metodi per trattare malattie infiammatorie e autoimmuni. Vi è inoltre una necessità di caratterizzare i potenziali effetti dei batteri intestinali in modo da poter sviluppare nuove terapie usando i batteri intestinali.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è definita dalle rivendicazioni. Gli inventori hanno sviluppato nuove terapie per trattare e prevenire malattie infiammatorie e autoimmuni. In particolare, gli inventori hanno sviluppato nuove terapie per trattare e prevenire malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. In particolare, gli inventori hanno identificato che ceppi batterici dal genere *Blautia* possono essere efficaci per ridurre la risposta infiammatoria di Th17. Come descritta negli esempi, la somministrazione orale di composizioni comprendenti *Blautia stercoris* può ridurre la gravità della risposta infiammatoria, inclusa la risposta infiammatoria di Th17, in modelli di topo di asma, artrite reumatoide e sclerosi multipla. Inoltre, come descritta negli esempi, la somministrazione orale di composizioni comprendenti *Blautia wexlerae* può ridurre la gravità della risposta infiammatoria, inclusa la risposta infiammatoria di Th17, in modelli di topo di uveite. Pertanto, gli inventori hanno identificato due diversi ceppi da specie diverse nel genere *Blautia* può essere efficace per trattare malattie infiammatorie e autoimmuni. Pertanto, in una prima realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*, per uso in un metodo per trattare o prevenire una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17. Gli inventori hanno identificato che il trattamento con ceppi batterici da questo genere può ridurre i livelli di citochine che fanno parte della via di Th17, inclusa IL-17, può alleviare la risposta

infiammatoria di Th17 e può fornire benefici clinici nei modelli di topo di malattie infiammatorie e autoimmuni mediate da IL-17 e dalla via di Th17.

In realizzazioni particolari, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*, per uso in un metodo per trattare o prevenire una malattia o condizione scelta dal gruppo costituito da: sclerosi multipla; artrite, come l'artrite reumatoide, osteoartrite, artrite psoriasica, o artrite idiopatica giovanile; neuromielite ottica (malattia di Devic); spondilite anchilosante; spondiloartrite; psoriasi; lupus eritematoso sistemico; malattia infiammatoria intestinale, come morbo di Crohn o colite ulcerosa; celiachia; asma, come asma allergica o asma neutrofila; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); uveite; sclerite; vasculite; malattia di Behçet; aterosclerosi; dermatite atopica; enfisema; parodontite; rinite allergica; e rigetto di allotrapianto. L'effetto mostrato per i ceppi batterici dal genere *Blautia* sulla risposta infiammatoria di Th17 può fornire benefici terapeutici per malattie e condizioni mediate da IL-17 e dalla via di Th17, come quelle sopra elencate.

In realizzazioni preferite, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*, per uso in un metodo per trattare o prevenire l'asma, come asma neutrofila o asma allergica. Gli inventori hanno identificato che il trattamento con ceppi di *Blautia* può ridurre il reclutamento di neutrofili ed eosinofili nei polmoni, che può aiutare a trattare o prevenire l'asma. Inoltre, gli inventori hanno provato e dimostrato l'efficacia di ceppi di *Blautia* nei modelli di topo di asma. In alcune realizzazioni, la composizione è per uso in un metodo per trattare o prevenire l'asma neutrofila o asma eosinofila. L'effetto mostrato per le composizioni dell'invenzione su neutrofili ed eosinofili indica che essi possono essere particolarmente efficaci per trattare o prevenire l'asma neutrofila e asma eosinofila. In effetti, in alcune realizzazioni, la composizione è per uso in un metodo per ridurre una risposta infiammatoria neutrofila nel trattamento o prevenzione dell'asma, oppure la composizione è per uso in un metodo per ridurre una risposta infiammatoria eosinofila nel trattamento o prevenzione dell'asma. In realizzazioni preferite, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris* per uso nel trattamento dell'asma, in particolare asma eosinofila o allergica. Inoltre, è mostrato che *Blautia stercoris* ha un effetto particolarmente pronunciato sui neutrofili nei

modelli di asma e il trattamento con *Blautia stercoris* può essere particolarmente efficace nel trattamento dell'asma neutrofila. In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia wexlerae* per uso nel trattamento dell'asma, e in particolare asma eosinofila o allergica.

In realizzazioni preferite aggiuntive, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*, per uso in un metodo per trattare o prevenire l'artrite reumatoide. Gli inventori hanno identificato che il trattamento con ceppi di *Blautia* può fornire benefici clinici in un modello di topo di artrite reumatoide e può ridurre il gonfiore articolare. In realizzazioni preferite, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris*, per uso nel trattamento dell'artrite reumatoide. Composizioni che usano *Blautia stercoris* possono essere particolarmente efficaci per trattare l'artrite reumatoide. In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia wexlerae*, per uso nel trattamento dell'artrite reumatoide.

In realizzazioni preferite aggiuntive, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*, per uso in un metodo per trattare o prevenire la sclerosi multipla. Gli inventori hanno identificato che il trattamento con ceppi di *Blautia* può ridurre l'incidenza e gravità della malattia in un modello di topo di sclerosi multipla. In realizzazioni preferite, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris*, per uso nel trattamento della sclerosi multipla. Composizioni che usano *Blautia stercoris* possono essere particolarmente efficaci per trattare la sclerosi multipla. In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia wexlerae*, per uso nel trattamento della sclerosi multipla.

In realizzazioni preferite aggiuntive, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*, per uso in un metodo per trattare o prevenire l'uveite, come l'uveite posteriore. Gli inventori hanno identificato che il trattamento con ceppi di *Blautia* può ridurre l'incidenza e gravità della malattia in un modello di topo di uveite e può prevenire o ridurre il danno alla retina. In realizzazioni preferite, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia wexlerae*, per uso nel

trattamento dell'uveite. Composizioni che usano *Blautia wexlerae* possono essere particolarmente efficaci per trattare l'uveite. In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris*, per uso nel trattamento dell'uveite.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso in un metodo per ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione di una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17. In particolare, le composizioni dell'invenzione possono essere usate per ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione di asma, artrite reumatoide o sclerosi multipla, oppure di asma, artrite reumatoide, sclerosi multipla, uveite o cancro. Preferibilmente, l'invenzione fornisce composizioni comprendenti un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris*, per uso nel ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione dell'asma, artrite reumatoide o sclerosi multipla. L'invenzione fornisce inoltre composizioni comprendenti un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris*, per uso nel ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione dell'uveite. L'invenzione fornisce inoltre composizioni comprendenti un ceppo batterico della specie *Blautia wexlerae*, per uso nel ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione di asma, artrite reumatoide o sclerosi multipla o uveite.

In alcune realizzazioni, la composizione è per uso in un paziente con livelli elevati di IL-17 o cellule Th17. L'effetto sulla risposta infiammatoria di Th17 mostrato i ceppi di *Blautia* può essere particolarmente utile per tali pazienti.

In realizzazioni preferite dell'invenzione, il ceppo batterico nella composizione è di *Blautia stercoris*. È inoltre possibile usare ceppi strettamente correlati, come ceppi batterici che hanno una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% alla sequenza di 16s rRNA di un ceppo batterico di *Blautia stercoris*. Preferibilmente, il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 1 o 2. Preferibilmente, l'identità di sequenza è con

SEQ. ID. N.: 2. Preferibilmente, il ceppo batterico per uso nell'invenzione ha la sequenza di 16s rRNA rappresentata da SEQ. ID. N.: 2.

In realizzazioni preferite dell'invenzione, il ceppo batterico nella composizione è di *Blautia wexlerae*. È inoltre possibile usare ceppi strettamente correlati, come ceppi batterici che hanno una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% alla sequenza di 16s rRNA di un ceppo batterico di *Blautia wexlerae*. Preferibilmente, il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 3 o 4. Preferibilmente, l'identità di sequenza è con SEQ. ID. N.: 4. Preferibilmente, il ceppo batterico per uso nell'invenzione ha la sequenza di 16s rRNA rappresentata da SEQ. ID. N.: 4.

In alcune realizzazioni, la composizione dell'invenzione è per somministrazione orale. La somministrazione orale dei ceppi dell'invenzione può essere efficace per trattare malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. Inoltre, la somministrazione orale è pratica per pazienti e professionisti e permette il rilascio e/o colonizzazione parziale o totale dell'intestino.

In alcune realizzazioni, la composizione dell'invenzione comprende uno o più eccipienti o veicoli accettabili farmaceuticamente.

In alcune realizzazioni, la composizione dell'invenzione comprende un ceppo batterico che è stato liofilizzato. La liofilizzazione è una tecnica efficace e opportuna per preparare composizioni stabili che permettono il rilascio di batteri.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce un prodotto alimentare comprendente la composizione come descritta sopra.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione di vaccino comprendente la composizione come descritta sopra.

Inoltre, l'invenzione fornisce un metodo per trattare o prevenire una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17, comprendente il somministrare una composizione comprendente un ceppo batterico del genere *Blautia*.

Nello sviluppare l'invenzione di cui sopra, gli inventori hanno identificato e caratterizzato un ceppo batterico che è particolarmente utile per la terapia. È mostrato che il ceppo di *Blautia stercoris* dell'invenzione è efficace per trattare le malattie descritte nella presente, come artrite, asma e sclerosi multipla. Pertanto, in un altro aspetto, l'invenzione fornisce una cellula del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con il numero di collocazione NCIMB 42381. L'invenzione fornisce inoltre composizioni comprendenti tali cellule, o colture biologicamente pure di tali cellule. L'invenzione fornisce inoltre una cellula del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con il numero di collocazione NCIMB 42381, per uso in terapia, in particolare per le malattie descritte nella presente.

Nello sviluppare l'invenzione di cui sopra, gli inventori hanno identificato e caratterizzato un ceppo batterico aggiuntivo che è particolarmente utile per la terapia. È mostrato che il ceppo di *Blautia wexlerae* dell'invenzione è efficace per trattare le malattie descritte nella presente, come l'uveite. Pertanto, in un altro aspetto, l'invenzione fornisce una cellula del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con il numero di collocazione NCIMB 42381. L'invenzione fornisce inoltre composizioni comprendenti tali cellule, o colture biologicamente pure di tali cellule. L'invenzione fornisce inoltre una cellula del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con il numero di collocazione NCIMB 42486, per uso in terapia, in particolare per le malattie descritte nella presente.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figura 1: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica - Conta totale di cellule nel liquido di BAL.

Figura 2: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Conta totale di eosinofili nel BALF.

Figura 3: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Proporzioni di eosinofili nel BALF.

Figura 4: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Conta totale dei macrofagi nel BALF.

Figura 5: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Proporzioni di macrofagi nel BALF.

Figura 6: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Conta totale dei neutrofili nel BALF.

Figura 7: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Proporzione di neutrofili nel BALF.

Figura 8: Modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica - Conta totale dei linfociti nel BALF.

Figura 9: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica - Proporzione di linfociti nel BALF.

Figura 10: Modello di topo di asma neutrofila grave - Conta totale delle cellule nel liquido di BAL.

Figura 11: Modello di topo di asma neutrofila grave - Conta totale degli eosinofili nel BALF.

Figura 12: Modello di topo di asma neutrofila grave - Proporzione di eosinofili nel BALF.

Figura 13: Modello di topo di asma neutrofila grave - Conta totale dei macrofagi nel BALF.

Figura 14: Modello di topo di asma neutrofila grave - Proporzione di macrofagi nel BALF.

Figura 15: Modello di topo di asma neutrofila grave - Conta totale dei neutrofili nel BALF.

Figura 16: Modello di topo di asma neutrofila grave - Proporzione di neutrofili nel BALF.

Figura 17: Modello di topo di asma neutrofila grave - Conta totale dei linfociti nel BALF.

Figura 18: Modello di topo di asma neutrofila grave - Proporzione di linfociti nel BALF.

Figura 19: Modello di topo di artrite reumatoide - Pesi corporei, giorni -14 fino a 0. I dati sono presentati come percentuali di Media \pm SEM dei pesi corporei iniziali (Giorno -14).

Figura 20: Modello di topo di artrite reumatoide - Pesi corporei, giorni 0 fino a 42. I dati sono presentati come percentuali di Media \pm SEM dei pesi corporei iniziali (Giorno 0). $\blacklozenge p < 0,05$ rispetto al gruppo trattato con veicolo.

Figura 21: Modello di topo di artrite reumatoide - Punteggi clinici. I dati sono presentati come Media \pm SEM. **** $p < 0,0001$ rispetto al Giorno 21 nel gruppo trattato con veicolo. $\blacklozenge p < 0,05$ rispetto al gruppo trattato con veicolo in un dato giorno.

Figura 22: Modello di topo di artrite reumatoide - Risposta proliferativa di splenociti al Collagene II. Conte con sfondo dei terreni sottratto [stimolati con CII - sfondo dei terreni] al minuto basate sull'incorporazione di ³H-TdR. Tutti i dati sono presentati come Media \pm SEM. * p < 0,05 rispetto al gruppo di Veicolo.

Figura 23: Modello di topo di artrite reumatoide - Livelli di IFN γ nei supernatanti di coltura tissutale. Le linee rappresentano i valori mediani del gruppo.

Figura 24: Modello di topo di artrite reumatoide - Livelli di IL-17A nei supernatanti di coltura tissutale. Le linee rappresentano i valori mediani del gruppo.

Figura 25: Modello di topo di artrite reumatoide - Livelli di IL-10 nei supernatanti di coltura tissutale. Le linee rappresentano i valori mediani del gruppo.

Figura 26: Modello di topo di artrite reumatoide - Livelli di IL-6 nei supernatanti di coltura tissutale. Le linee rappresentano i valori mediani del gruppo.

Figura 27: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – IgE totale nel siero

Figura 28: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – IgG1 specifica per HDM nel siero

Figura 29: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – IgE totale nel BALF

Figura 30: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – IgG1 specifica per HDM nel BALF

Figura 31: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione peribronchiolare

Figura 32: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione perivascolare

Figura 33: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Analisi istologica – Punteggio infiammatorio medio (media del punteggio di infiltrazione sia peribronchiolare che perivascolare)

Figura 34: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Analisi istologica – Punteggio di muco

Figura 35: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IL-9 nel tessuto polmonare

Figura 36: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IL-1a nel tessuto polmonare

Figura 37: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IFN γ nel tessuto polmonare

Figura 38: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IL-17A nel tessuto polmonare

Figura 39: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IL-4 nel tessuto polmonare

Figura 40: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IL-5 nel tessuto polmonare

Figura 41: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di IL-1b nel tessuto polmonare

Figura 42: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di RANTES nel tessuto polmonare

Figura 43: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di MIP-1a nel tessuto polmonare

Figura 44: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica – Livello di KC nel tessuto polmonare

Figura 45: Modello di topo di asma indotta dagli acari della polvere domestica - Livello di MIP-2 nel tessuto polmonare

Figura 46: Modello di topo di asma neutrofila grave – IgG1 specifica per HDM nel siero

Figura 47: Modello di topo di asma neutrofila grave – IgG2a specifica per HDM nel siero

Figura 48: Modello di topo di asma neutrofila grave – IgG1 specifica per HDM nel BALF

Figura 49: Modello di topo di asma neutrofila grave – IgG2a specifica per HDM nel BALF

Figura 50: Modello di topo di asma neutrofila grave – Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione peribronchiolare

Figura 51: Modello di topo di asma neutrofila grave – Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione perivascolare

Figura 52: Modello di topo di asma neutrofila grave – Analisi istologica – Punteggio infiammatorio medio (media del punteggio di infiltrazione sia peribronchiolare che perivascolare)

Figura 53: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di TNF α nel tessuto polmonare

Figura 54: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di IL-1a nel tessuto polmonare

Figura 55: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di IFN γ nel tessuto polmonare

Figura 56: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di IL-17F nel tessuto polmonare

Figura 57: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di IL-1b nel tessuto polmonare

Figura 58: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di RANTES nel tessuto polmonare

Figura 59: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di MIP-2 nel tessuto polmonare

Figura 60: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di KC nel tessuto polmonare

Figura 61: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di IL-17A nel tessuto polmonare

Figura 62: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di MIP-1a nel tessuto polmonare

Figura 63: Modello di topo di asma neutrofila grave – Livello di IL-33 nel tessuto polmonare

Figura 64: Modello di topo di artrite reumatoide - Modello visivo per il punteggio di istopatologia. Immagini rappresentative che mostrano punteggi composti da articolazioni tarsali di topo in uno studio sull'artrite indotta da collagene.

Figura 65: Modello di topo di artrite reumatoide - Istopatologia: punteggi di infiammazione. I dati sono presentati come Media \pm SEM. ** p < 0,01 rispetto al gruppo trattato con veicolo.

Figura 66: Modello di topo di artrite reumatoide - Istopatologia: punteggi di cartilagine. I dati sono presentati come Media \pm SEM. *** p < 0,001 rispetto al gruppo trattato con veicolo.

Figura 67: Modello di topo di artrite reumatoide - Istopatologia: punteggi ossei. I dati sono presentati come Media \pm SEM. *** $p < 0,001$ rispetto al gruppo trattato con veicolo.

Figura 68: Modello di topo di artrite reumatoide - Istopatologia: punteggi totali. I dati sono presentati come Media \pm SEM. *** $p < 0,001$ rispetto al gruppo trattato con veicolo.

Figura 69: Modello di topo di artrite reumatoide - Istopatologia: immagini rappresentative. ID. animale (#n.n) e arto (R per destra, L per sinistra) sono indicati tra parentesi. Immagine a sinistra (veicolo): ampia distruzione di articolazioni e ossa con infiammazione e fibrosi che si estendono ai tessuti molli periarticolari.

Figura 70: Modello di topo di sclerosi multipla - punteggio clinico.

Figura 71: Modello di topo di sclerosi multipla - incidenza della malattia.

Figura 72: Modello di topo di uveite - Risposta proliferativa dei linfonodi al peptide di IRBP. Conte con sfondo dei terreni sottratto [stimolati con peptide IRBP - sfondo dei terreni] al minuto basate sull'incorporazione di 3H-timidina. Tutti i dati sono presentati come Media + SEM (n=3).

Figura 73: Modello di topo di uveite - Punteggi di TEFI nel gruppo di controllo. I dati sono presentati come Media \pm SEM.

Figura 74: Modello di topo di uveite - Punteggi di TEFI al giorno 21. I dati sono presentati come Media \pm SEM.

Figura 75: Saggio infiammatorio indotto da LPS – Livelli di IL-6

Figura 76: Saggio infiammatorio indotto da LPS – Livelli di TNF α

Figura 77: Saggio infiammatorio indotto da LPS – livello di maturazione di Mo-DC

Figura 78: Saggio infiammatorio indotto da ovalbumina – Livelli di cellule CD4+

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Ceppi batterici

Le composizioni dell'invenzione comprendono un ceppo batterico del genere *Blautia*. Gli esempi dimostrano che i batteri di questo genere sono utili per trattare o prevenire malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. I ceppi batterici preferiti sono della specie *Blautia*. Esempi di ceppi di *Blautia* per uso nell'invenzione includono *Blautia stercoris*, e *B. wexlerae*.

Le specie di *Blautia* sono batteri positivi alla reazione di Gram, non mobili che possono essere coccoidei o ovali e sono tutti anaerobi obbligati che producono acido acetico come il prodotto finale principale della fermentazione del glucosio [16]. *Blautia* può essere isolato dall'intestino umano, sebbene *B. producta* sia stato isolato da un campione di setticemia. Il numero di collocazione GenBank per la sequenza genica del 16S rRNA di *Blautia stercoris* ceppo GAM6-1^T è HM626177 (descritto nella presente come SEQ. ID. N.: 1). Un ceppo di *Blautia stercoris* illustrativo è descritto in [17]. Il ceppo tipo di *Blautia wexlerae* è WAL 14507 = ATCC BAA-1564 = DSM 19850 [18]. Il numero di collocazione GenBank per la sequenza genica del 16S rRNA di *Blautia wexlerae* ceppo WAL 14507 T è EF036467 (descritto nella presente come SEQ. ID. N.: 3). Questo ceppo di *Blautia wexlerae* illustrativo è descritto in [18].

Il batterio di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 è stato provato negli Esempi ed è inoltre indicato nella presente come ceppo 830. Una sequenza di 16S rRNA per il ceppo 830 che è stato provato è fornita in SEQ. ID. N.: 2. Ceppo 830 è stato depositato presso l'autorità internazionale di deposito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scozia) da GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scozia) il 12 marzo 2015 come "*Blautia stercoris* 830" e gli è stato assegnato il numero di collocazione NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. Ha successivamente cambiato nome in 4D Pharma Research Limited.

Il genoma di ceppo 830 comprende un cromosoma e plasmide. Una sequenza cromosomica per il ceppo 830 è fornita in SEQ. ID. N.: 5 nell'elenco delle sequenze pubblicato con WO2016/203218. Una sequenza plasmidica per il ceppo 830 è fornita in SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218. Queste sequenze sono state generate usando la piattaforma PacBio RS II.

Il batterio *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486 è stato provato negli Esempi ed è inoltre indicato come ceppo MRX008. Una sequenza di 16R rRNA per il ceppo MRX008 che è stato provato è fornita in SEQ. ID. N.: 4. Il ceppo MRX008 è stato depositato presso l'autorità internazionale di deposito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scozia) da 4D Pharma Research Ltd. (Life

Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scozia) il 16 novembre 2015 come “*Blautia/Ruminococcus*” e gli è stato assegnato il numero di collocazione NCIMB 42486.

Si prevede inoltre che ceppi batterici strettamente correlati ai ceppi provati negli esempi siano efficaci per trattare o prevenire malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. In alcune realizzazioni, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% alla sequenza di 16s rRNA di un ceppo batterico di *Blautia stercoris*. Preferibilmente, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 1 o 2. Preferibilmente, l’identità di sequenza è con SEQ. ID. N.: 2. Preferibilmente, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha la sequenza di 16s rRNA rappresentata da SEQ. ID. N.: 2. In alcune realizzazioni, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% alla sequenza di 16s rRNA di un ceppo batterico di *Blautia wexlerae*. Preferibilmente, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 3 o 4. Preferibilmente, l’identità di sequenza è con SEQ. ID. N.: 4. Preferibilmente, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha la sequenza di 16s rRNA rappresentata da SEQ. ID. N.: 4.

In alcuni casi, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha un cromosoma con identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218. In casi preferiti, il ceppo batterico per uso nell’invenzione ha un cromosoma con un’identità di sequenza di almeno il 90% (ad es. almeno il 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza) con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo almeno il 60% (ad es. almeno il 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218. Ad esempio, il ceppo batterico per uso nell’invenzione può avere un cromosoma con identità di sequenza di almeno il 90% con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 70% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 90% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo l’80% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 90% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 90% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 90% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il

100% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 70% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo l'80% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 90% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 100% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 70% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo l'80% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 90% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 lungo il 100% di SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218.

In alcuni casi, il ceppo batterico per uso nell'invenzione ha un plasmide con identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218. In casi preferiti, il ceppo batterico per uso nell'invenzione ha un plasmide con identità di sequenza di almeno il 90% (ad es. identità di sequenza di almeno il 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo almeno il 60% (ad es. almeno il 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218. Ad esempio, il ceppo batterico per uso nell'invenzione può avere un plasmide con identità di sequenza di almeno il 90% con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 70% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 90% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo l'80% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 90% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 90% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 90% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 100% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 70% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo l'80% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 90% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218,

o almeno il 95% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 100% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 70% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo l'80% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 90% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218, o almeno il 98% di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218 lungo il 100% di SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218.

In alcuni casi, il ceppo batterico per uso nell'invenzione ha un cromosoma con identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 5 di WO2016/203218 e un plasmide con identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 6 di WO2016/203218.

Si prevede inoltre che ceppi batterici che sono biotipi del batterio depositato con numero di collocazione 42381 siano efficaci per trattare o prevenire malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. Si prevede inoltre che i ceppi batterici che sono biotipi del batterio depositato con numero di collocazione 42486 siano efficaci per trattare o prevenire malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. Un biotipo è un ceppo strettamente correlato che ha caratteristiche fisiologiche e biochimiche uguali o molto simili.

Ceppi che sono biotipi di un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486 e che sono adatti all'uso nell'invenzione possono essere identificati sequenziando altre sequenze nucleotidiche per un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486. Ad esempio, è possibile sequenziare sostanzialmente l'intero il genoma e un ceppo di biotipo per uso nell'invenzione può avere almeno il 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% di identità di sequenza lungo almeno l'80% del suo intero genoma (ad es. lungo almeno l'85%, 90%, 95% o 99%, o lungo il suo intero genoma). Altre sequenze adatte all'uso nell'identificare ceppi di biotipo possono includere hsp60 o sequenze ripetitive come BOX, ERIC, (GTG)₅, o REP oppure [19]. Ceppi di biotipo possono avere sequenze con identità di sequenza di almeno il 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% con la sequenza corrispondente di un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486.

In alternativa, ceppi che sono biotipi di un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486 e che sono adatti all'uso nell'invenzione possono essere identificati usando il deposito con numero di collocazione NCIMB o il deposito con numero di collocazione NCIMB, e analisi del frammento di restrizione e/o analisi PCR, ad esempio usando il polimorfismo fluorescente da lunghezza dei frammenti amplificati (FAFLP) e identificazione dell'impronta dell'elemento di DNA ripetitivo (rep) mediante PCR, o profilazione delle proteine, o sequenziamento parziale di rDNA 16S o 23s. In realizzazioni preferite, tali tecniche possono essere usate per identificare altri ceppi di *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

In alcune realizzazioni, ceppi che sono biotipi del batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486 e che sono adatti all'uso nell'invenzione sono ceppi che forniscono lo stesso profilo di un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486 quando analizzati mediante analisi di restrizione del DNA ribosomiale amplificato (ARDRA), ad esempio quando si usa l'enzima di restrizione Sau3AI (per metodi illustrativi e indicazioni si veda, ad esempio, [20]). In alternativa, i ceppi di biotipo sono identificati come ceppi che hanno gli stessi profili di fermentazione dei carboidrati di un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486.

Altri ceppi di *Blautia* che sono utili nelle composizioni e metodi dell'invenzione, come i biotipi di un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486, possono essere identificati usando qualsiasi metodo o strategia appropriata, inclusi i saggi descritti negli esempi. Ad esempio, ceppi per uso nell'invenzione possono essere identificati coltivando in YCFA anaerobico e/o somministrando i batteri al modello di topo di artrite indotta da collagene di tipo II e poi valutando i livelli di citochine. In particolare, ceppi batterici che hanno profili di crescita, tipo metabolico e/o antigeni di superficie simili ad un batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 o 42486 possono essere utili nell'invenzione. Un ceppo utile avrà attività immunomodulante confrontabile con il ceppo NCIMB 42381 o 42486. In particolare, un ceppo di biotipo susciterà effetti confrontabili sui modelli di malattia di asma, artrite, sclerosi multipla e uveite ed effetti sui livelli di citochine confrontabili con gli effetti mostrati negli Esempi, che possono essere identificati usando i protocolli di coltura e somministrazione descritti negli Esempi.

Un ceppo particolarmente preferito dell'invenzione è il ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381. Questo è il ceppo 830 illustrativo provato negli esempi e mostrato come efficace per trattare la malattia. Pertanto, l'invenzione fornisce una cellula, ad esempio una cellula isolata, del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381. L'invenzione fornisce inoltre una composizione comprendente una cellula del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381. L'invenzione fornisce inoltre una coltura biologicamente pura del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381. L'invenzione fornisce inoltre una cellula del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381 per uso in terapia, in particolare per le malattie descritte nella presente.

Un ceppo particolarmente preferito dell'invenzione è il ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486. Questo è il ceppo illustrativo MRX008 provato negli esempi e mostrato come efficace per trattare la malattia. Pertanto, l'invenzione fornisce una cellula, ad esempio una cellula isolata, del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486. L'invenzione fornisce inoltre una composizione comprendente una cellula del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486. L'invenzione fornisce inoltre una coltura biologicamente pura del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486. L'invenzione fornisce inoltre una cellula del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486 per uso in terapia, in particolare per le malattie descritte nella presente.

In realizzazioni preferite, i ceppi batterici nelle composizioni dell'invenzione sono vitali e in grado di colonizzare parzialmente o totalmente l'intestino.

Usi terapeutici

Come dimostrate negli esempi, le composizioni batteriche dell'invenzione sono efficaci per ridurre la risposta infiammatoria di Th17. In particolare, il trattamento con composizioni dell'invenzione ottiene una riduzione dei livelli di IL-17A e altre citochine della via di Th17, e miglioramenti clinici nei modelli animali di condizioni mediate da IL-17 e dalla via di Th17. Pertanto, le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare o

prevenire malattie infiammatorie e autoimmuni, e in particolare malattie o condizioni mediate da IL-17. In particolare, le composizioni dell'invenzione possono essere utili per ridurre o prevenire l'elevazione della risposta infiammatoria di IL-17.

Le cellule Th17 sono un sottoinsieme di cellule T *helper* che producono, ad esempio, IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. La differenziazione delle cellule Th17 e l'espressione di IL-17 possono essere guidate da IL-23. Queste e altre citochine formano parti importanti della via di Th17, che è una via di segnalazione infiammatoria ben consolidata che contribuisce e sottende numerose malattie infiammatorie e autoimmuni (come descritte, ad esempio, in [21-26]). Malattie in cui è attivata la via di Th17 sono malattie mediate dalla via di Th17. Le malattie mediate dalla via di Th17 possono essere migliorate o alleviate reprimendo la via di Th17, il che può avvenire attraverso una riduzione della differenziazione delle cellule di Th17 o una riduzione della loro attività o una riduzione del livello delle citochine della via di Th17. Malattie mediate dalla via di Th17 possono essere caratterizzate da livelli aumentati di citochine prodotte da cellule Th17, come IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (studiate in [27]). Malattie mediate dalla via di Th17 possono essere caratterizzate da un'espressione aumentata di geni correlati a Th-17, come Stat3 o IL-23R. Malattie mediate dalla via di Th17 possono essere associate a livelli aumentati di cellule Th17. IL-17 è una citochina pro-infiammatoria che contribuisce alla patogenesi di diverse malattie e condizioni infiammatorie e autoimmuni. IL-17 come usata nella presente può fare riferimento a qualsiasi membro della famiglia di IL-17, incluse IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, e IL-17F. Malattie e condizioni mediate da IL-17 sono caratterizzate da un'elevata espressione di IL-17 e/o dall'accumulo o presenza di cellule positive a IL-17 in un tessuto affetto dalla malattia o condizione. Analogamente, malattie e condizioni mediate da IL-17 sono malattie e condizioni che sono esacerbate da alti livelli di IL-17 o un aumento dei livelli di IL-17, e che sono alleviate da bassi livelli di IL-17 o una riduzione dei livelli di IL-17. La risposta infiammatoria di IL-17 può essere locale o sistemica.

Esempi di malattie e condizioni che possono essere mediate da IL-17 o dalla via di Th17 includono sclerosi multipla; artrite, come artrite reumatoide, osteoartrite, artrite psoriasica, o artrite idiopatica giovanile; neuromielite ottica (malattia di Devic); spondilite anchilosante; spondiloartrite; psoriasi; lupus eritematoso

sistemico; malattia infiammatoria intestinale, come morbo di Crohn o colite ulcerosa; celiachia; asma, come asma allergica o asma neutrofila; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); uveite; sclerite; vasculite; malattia di Behçet; aterosclerosi; dermatite atopica; enfisema; parodontite; rinite allergica; e rigetto di allotrapianto. In realizzazioni preferite, le composizioni dell'invenzione sono usate per trattare o prevenire una o più di queste condizioni o malattie. In realizzazioni preferite aggiuntive, queste condizioni o malattie sono mediate da IL-17 o dalla via di Th17.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso in un metodo per ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione di una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare o prevenire una malattia infiammatoria o autoimmune, in cui detto trattamento o prevenzione si ottiene riducendo o impedendo l'elevazione della risposta infiammatoria di Th17. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare un paziente con una malattia infiammatoria o autoimmune, in cui il paziente ha livelli elevati di IL-17 o cellule Th17 elevate o presenta una risposta infiammatoria di Th17. In alcune realizzazioni, al paziente può essere stata diagnosticata una malattia o condizione infiammatoria cronica o autoimmune, oppure la composizione dell'invenzione può essere per uso nel prevenire una malattia o condizione infiammatoria o autoimmune che si sviluppa in una malattia o condizione infiammatoria cronica o autoimmune. In alcune realizzazioni, la malattia o condizione potrebbe non rispondere al trattamento con inibitori di TNF- α . Questi usi dell'invenzione possono essere applicati a qualsiasi delle malattie o condizioni specifiche elencate nel paragrafo precedente. IL-17 e la via di Th17 sono spesso associate a malattie infiammatorie croniche e autoimmuni, quindi le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente utili per trattare o prevenire malattie o condizioni croniche come elencate sopra. In alcune realizzazioni, le composizioni sono per uso in pazienti con malattia cronica. In alcune realizzazioni, le composizioni sono per uso nel prevenire lo sviluppo della malattia cronica.

Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare malattie e condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17 e per far fronte alla risposta infiammatoria di Th17, quindi le composizioni dell'invenzione possono

essere particolarmente utili per trattare o prevenire malattie croniche, trattare o prevenire la malattia in pazienti che non hanno risposto ad altre terapie (ad esempio trattamento con inibitori di TNF- α), e/o trattare o prevenire il danno tissutale e sintomi associati a IL-17 e cellule Th17. Ad esempio, è noto che IL-17 attiva la distruzione della matrice nella cartilagine e tessuto osseo e IL-17 ha un effetto inibitorio sulla produzione di matrice nei condrociti e osteoblasti, quindi le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare o prevenire l'erosione ossea o danno alla cartilagine.

In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un aumento dei livelli di IL-17, in particolare livelli di IL-17A. In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un'elevazione dei livelli di TNF α , IFN- γ o IL-6. Tale riduzione o prevenzione di livelli elevati di queste citochine può essere utile per trattare o prevenire malattie e condizioni infiammatorie e autoimmuni, in particolare quelle mediate da IL-17 o dalla via di Th17.

In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un'elevazione dei livelli di cellule CD4+. In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un'elevazione del livello di maturazione delle cellule dendritiche, in particolare di cellule dendritiche derivate da monociti CD1a+ CD14-. Una tale riduzione o prevenzione di livelli elevati dei livelli di cellule CD4+ o la riduzione o prevenzione dell'elevazione del livello di maturazione delle cellule dendritiche può essere utile per trattare o prevenire malattie e condizioni infiammatorie e autoimmuni, in particolare quelle mediate da IL-17 o dalla via di Th17.

Asma

In realizzazioni preferite, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare o prevenire l'asma. Gli esempi dimostrano che le composizioni dell'invenzione ottengono una riduzione del reclutamento di neutrofili e/o eosinofili nelle vie aeree a seguito della sensibilizzazione e stimolazione con estratto di acari della polvere domestica e quindi possono essere utili nel trattamento o prevenzione dell'asma. L'asma è una malattia cronica caratterizzata da infiammazione e restrizione delle vie aeree. L'infiammazione nell'asma può essere mediata da

IL-17 e/o cellule Th17, e quindi le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente efficaci per prevenire o trattare l'asma. L'infiammazione nell'asma può essere mediata da eosinofili e/o neutrofili.

In alcune realizzazioni, l'asma è eosinofila o allergica. Asma eosinofila e allergica sono caratterizzate da numeri aumentati di eosinofili nel sangue periferico e in secrezioni delle vie aeree e sono associata a livello patologico all'ispessimento della zona della membrana basale e a livello farmacologico alla reattività ai corticosteroidi [28].

Composizioni che riducono o inibiscono il reclutamento o attivazione degli eosinofili possono essere utili per trattare o prevenire l'asma eosinofila e allergica.

In realizzazioni aggiuntive, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare o prevenire l'asma neutrofila (o asma non eosinofila). Numeri elevati di neutrofili sono associati ad asma grave che può essere insensibile al trattamento con corticosteroidi. Composizioni che riducono o inibiscono il reclutamento o attivazione dei neutrofili possono essere utili per trattare o prevenire l'asma neutrofila.

Asma eosinofila e neutrofila non sono condizioni che si escludono reciprocamente e trattamenti che aiutano a far fronte a risposte sia eosinofile che neutrofile possono essere utili per trattare l'asma in generale. Livelli aumentati di IL-17 e attivazione della via di Th17 sono associati all'asma grave, quindi le composizioni dell'invenzione possono essere utili per prevenire lo sviluppo di asma grave o per trattare l'asma grave.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso in metodi che riducono una risposta infiammatoria eosinofila nel trattamento o prevenzione dell'asma, o per uso in metodi per ridurre una risposta infiammatoria neutrofila nel trattamento o prevenzione dell'asma. Come indicati sopra, alti livelli di eosinofili nell'asma sono associati a livello patologico all'ispessimento della zona della membrana basale, quindi la riduzione della risposta infiammatoria eosinofila nel trattamento o prevenzione dell'asma può essere in grado di far fronte in maniera specifica a questa proprietà della malattia. Inoltre, neutrofili elevati, in combinazione con eosinofili elevati o in loro assenza, sono associati ad asma grave e restringimento cronico delle vie aeree. Pertanto, ridurre la risposta infiammatoria neutrofila può essere particolarmente utile per trattare l'asma grave.

In alcune realizzazioni, le composizioni riducono l'infiltrazione peribronchiolare nell'asma allergica, oppure sono per uso nel ridurre l'infiltrazione peribronchiolare nel trattamento dell'asma allergica. In alcune

realizzazioni, le composizioni riducono l'infiltrazione peribronchiolare e/o perivascolare nell'asma neutrofila, oppure sono per uso nel ridurre l'infiltrazione peribronchiolare e/o perivascolare nel trattamento dell'asma neutrofila allergica.

In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un'elevazione dei livelli di TNF α .

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso in un metodo di trattare l'asma che risulta in una riduzione della risposta infiammatoria eosinofila e/o neutrofila. In alcune realizzazioni, il paziente da trattare è, o è stato precedentemente identificato come avente, livelli elevati di neutrofili o eosinofili, ad esempio come identificati mediante prelievi di sangue o analisi dell'espettorato.

Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per prevenire lo sviluppo dell'asma in un neonato quando somministrate al neonato, o ad una donna incinta. Le composizioni possono essere utili per prevenire lo sviluppo dell'asma nei bambini. Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare o prevenire l'asma con insorgenza nell'età adulta. Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per gestire o alleviare l'asma. Le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente utili per ridurre i sintomi associati all'asma che è aggravata da allergeni, come gli acari della polvere domestica.

Trattamento o prevenzione dell'asma possono fare riferimento, ad esempio, ad un alleviamento della gravità dei sintomi o una riduzione della frequenza delle esacerbazioni o della gamma di fattori scatenanti che rappresentano un problema per il paziente.

Artrite

In realizzazioni preferite, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare o prevenire l'artrite reumatoide (AR). Gli esempi dimostrano che le composizioni dell'invenzione ottengono una riduzione dei segni clinici di AR in un modello di topo, riducono il danno a cartilagine e ossa, e riducono la risposta infiammatoria di IL-17, e quindi possono essere utili nel trattamento o prevenzione di AR. L'AR è un disturbo infiammatorio sistemico che colpisce principalmente le articolazioni. L'AR è associata ad una risposta infiammatoria che provoca gonfiore delle articolazioni, iperplasia sinoviale, e distruzione di cartilagine e ossa. IL-17 e cellule Th17

possono avere un ruolo chiave nell'AR, ad esempio poiché IL-17 inibisce la produzione di matrice in condrociti e osteoblasti e attiva la produzione e funzione delle metalloproteinasi della matrice e poiché l'attività della malattia di AR è correlata a livelli di IL-17 e numeri di cellule Th-17 [29,30], quindi le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente efficaci per prevenire o trattare l'AR.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nell'abbassare i livelli di IL-17 o prevenire l'elevazione dei livelli di IL-17 nel trattamento o prevenzione dell'AR. In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un'elevazione dei livelli di IL-17, in particolare dei livelli di IL-17A. In alcune realizzazioni, il trattamento con composizioni dell'invenzione fornisce una riduzione o impedisce un'elevazione dei livelli di IFN- γ o IL-6.

In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta in una riduzione del gonfiore delle articolazioni. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso in pazienti con articolazioni gonfie o pazienti identificati come a rischio di avere articolazioni gonfie. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso in un metodo per ridurre il gonfiore delle articolazioni nell'AR.

In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta in una riduzione del danno alla cartilagine o danno osseo. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel ridurre o prevenire il danno a cartilagine o ossa nel trattamento dell'AR. In alcune realizzazioni, le composizioni sono per uso nel trattare pazienti con AR grave che sono a rischio di danno a cartilagine o ossa.

Livelli di IL-17 e numeri di cellule Th17 aumentati sono associati a distruzione di cartilagine e ossa nell'AR [29,30]. È noto che IL-17 attiva la distruzione della matrice nella cartilagine e tessuto osseo e IL-17 ha un effetto inibitorio sulla produzione di matrice in condrociti e osteoblasti. Pertanto, in alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel prevenire l'erosione ossea o danno alla cartilagine nel trattamento dell'AR. In alcune realizzazioni, le composizioni sono per uso nel trattare pazienti che presentano erosione ossea o danno alla cartilagine o pazienti identificati come a rischio di erosione ossea o danno alla cartilagine.

Anche TNF- α è associato all'AR, ma TNF- α non è coinvolto nella patogenesi degli stadi successivi della malattia. Al contrario, IL-17 ha un ruolo in tutti gli stadi della malattia cronica [31]. Pertanto, in alcune

realizzazioni le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare l'AR cronica o AR in stadio avanzato, ad esempio una malattia che include distruzione delle articolazioni e perdita di cartilagine. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione servono a trattare pazienti che hanno precedentemente ricevuto una terapia anti-TNF- α . In alcune realizzazioni, i pazienti da trattare non rispondono o non rispondono più alla terapia anti-TNF- α .

Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per modulare il sistema immunitario di un paziente, quindi in alcune realizzazioni le composizioni dell'invenzione sono per uso nel prevenire l'AR in un paziente che è stato identificato come a rischio di AR, o che ha ricevuto una diagnosi di AR allo stadio precoce. Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per prevenire lo sviluppo di AR.

Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per gestire o alleviare l'AR. Le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente utili per ridurre i sintomi associati a gonfiore articolare o distruzione ossea. Trattamento o prevenzione dell'AR possono fare riferimento, ad esempio, ad un alleviamento della gravità dei sintomi o una riduzione della frequenza delle esacerbazioni o della gamma di fattori scatenanti che rappresentano un problema per il paziente.

Sclerosi multipla

In realizzazioni preferite, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare o prevenire la sclerosi multipla. Gli esempi dimostrano che le composizioni dell'invenzione ottengono una riduzione dell'incidenza della malattia e gravità della malattia in un modello di topo di sclerosi multipla (il modello di EAE), e quindi possono essere utili nel trattamento o prevenzione della sclerosi multipla. La sclerosi multipla è un disturbo infiammatorio associato a danno alle guaine mieliniche dei neuroni, in particolare nel cervello e colonna vertebrale. La sclerosi multipla è una malattia cronica, che è progressivamente invalidante e che si evolve in episodi. IL-17 e cellule Th17 possono avere un ruolo chiave nella sclerosi multipla, ad esempio perché i livelli di IL-17 possono essere correlati a lesioni della sclerosi multipla, IL-17 può disgregare le giunzioni strette delle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica, e le cellule Th17 possono migrare verso il sistema nervoso

centrale e causare perdita neuronale [32,33]. Pertanto, le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente efficaci per prevenire o trattare la sclerosi multipla.

In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta in una riduzione dell'incidenza o gravità della malattia. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel ridurre l'incidenza o gravità della malattia. In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione impedisce un declino della funzione motoria o risulta in una funzione motoria migliorata. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel prevenire un declino della funzione motoria o per uso nel migliorare la funzione motoria. In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione impedisce lo sviluppo della paralisi. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel prevenire la paralisi nel trattamento della sclerosi multipla.

Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per modulare il sistema immunitario di un paziente, quindi in alcune realizzazioni le composizioni dell'invenzione sono per uso nel prevenire la sclerosi multipla in un paziente che è stato identificato come a rischio di sclerosi multipla, o che ha ricevuto una diagnosi di sclerosi multipla allo stadio iniziale o sclerosi multipla "recidivante-remittente". Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per prevenire lo sviluppo della sclerosi. Infatti, gli esempi mostrano che la somministrazione di composizioni dell'invenzione ha impedito lo sviluppo della malattia in molti topi.

Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per gestire o alleviare la sclerosi multipla. Le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente utili per ridurre i sintomi associati alla sclerosi multipla. Trattamento o prevenzione della sclerosi multipla possono fare riferimento, ad esempio, ad un alleviamento della gravità dei sintomi o una riduzione della frequenza delle esacerbazioni o della gamma di fattori scatenanti che rappresentano un problema per il paziente.

Uveite

In realizzazioni preferite, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel trattare o prevenire l'uveite. Gli esempi dimostrano che le composizioni dell'invenzione ottengono una riduzione dell'incidenza della malattia e gravità della malattia in un modello animale di uveite e quindi possono essere utili nel trattamento o prevenzione

dell'uveite. L'uveite è un'inflammatione dell'uvea e può risultare nella distruzione del tessuto retinico. Può presentarsi in diverse forme anatomiche (anteriore, intermedia, posteriore o diffusa) e derivare da cause diverse, ma correlate, inclusi disturbi autoimmuni sistemici. IL-17 e la via di Th17 sono hanno un ruolo centrale nell'uveite, quindi le composizioni dell'invenzione possono essere particolarmente efficaci per prevenire o trattare l'uveite. I riferimenti [34-41] descrivono livelli elevati di interleuchina-17A nel siero in pazienti con uveite, associazione specifica di varianti genetiche di IL17A con la panuveite, il ruolo di citochine associate a Th17 nella patogenesi dell'uveite autoimmune sperimentale, lo squilibrio tra cellule Th17 e cellule T regolatrici durante l'uveite autoimmune sperimentale monofasica, la sovra-regolazione di IL-17A in pazienti con uveite e malattie attive di Adamantiades-Behçet e Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), il trattamento dell'uveite non infettiva con secukinumab (anticorpo anti-IL-17A), e Th17 negli occhi con uveite.

In alcune realizzazioni, l'uveite è uveite posteriore. L'uveite posteriore si presenta principalmente con infiammazione della retina e coroide e gli esempi dimostrano che le composizioni dell'invenzione sono efficaci per ridurre infiammazione e danno alla retina.

In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta in una riduzione del danno alla retina. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel ridurre o prevenire il danno alla retina nel trattamento dell'uveite. In alcune realizzazioni, le composizioni sono per uso nel trattare pazienti con uveite grave che sono a rischio di danno alla retina. In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta in una riduzione dell'infiammazione del disco ottico. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel ridurre o prevenire l'infiammazione del disco ottico. In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta in una riduzione dell'infiltrazione del tessuto retinico da parte di cellule infiammatorie. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel ridurre l'infiltrazione del tessuto retinico da parte di cellule infiammatorie. In alcune realizzazioni, il trattamento con le composizioni dell'invenzione risulta nel mantenimento o miglioramento della vista. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione sono per uso nel mantenere o migliorare la visione.

In alcune realizzazioni, le composizioni sono per uso nel trattare o prevenire l'uveite associata ad una malattia non infettiva o autoimmune, come malattia di Behçet, morbo di Crohn, iridociclite eterocromica di Fuchs, granulomatosi con poliangioite, uveite correlata a HLA-B27, artrite idiopatica giovanile, sarcoidosi, spondiloartrite, oftalmia simpatica, nefrite tubulointerstiziale e sindrome dell'uveite o sindrome di Vogt-Koyanagi-Harada. È stato mostrato che IL-17A è coinvolta, ad esempio, nelle malattie di Behçet e Vogt-Koyanagi-Harada.

Trattamento o prevenzione dell'uveite possono fare riferimento, ad esempio, ad un alleviamento della gravità dei sintomi o una prevenzione della ricaduta.

Modalità di somministrazione

Preferibilmente, le composizioni dell'invenzione devono essere somministrate al tratto gastrointestinale al fine di permettere il rilascio e/o colonizzazione parziale o totale dell'intestino con il ceppo batterico dell'invenzione. Generalmente, le composizioni dell'invenzione vengono somministrate per via orale, ma possono essere somministrate per via rettale, intranasale, o tramite via buccale o sublinguale.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate come una schiuma, come uno spray o un gel.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate come una supposta, ad esempio una supposta rettale, ad esempio sotto forma di un olio di teobroma (burro di cacao), grasso duro sintetico (ad es. suppcire, witepsol), gelatina di glicerolo, polietilenglicole, o composizione di glicerina per sapone.

In alcune realizzazioni, la composizione dell'invenzione viene somministrata al tratto gastrointestinale attraverso un tubo, come un sondino nasogastrico, sonda orogastrica, sonda gastrica, sonda per digiunostomia (sonda J), gastrostomia endoscopica percutanea (PEG), o una porta, come una porta della parete toracica che fornisce accesso allo stomaco, digiuno e altre porte di accesso adatte.

Le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate una volta, oppure possono essere somministrate sequenzialmente come parte di un regime di trattamento. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione devono essere somministrate quotidianamente.

In alcune realizzazioni dell'invenzione, il trattamento secondo l'invenzione è accompagnato dalla valutazione del microbiota intestinale del paziente. Il trattamento può essere ripetuto se non si ottiene il rilascio e/o colonizzazione parziale o totale con il ceppo dell'invenzione al punto che non si osserva un'efficacia, oppure il trattamento può essere interrotto se il rilascio e/o colonizzazione parziale o totale va a buon fine e si osserva un'efficacia.

In alcune realizzazioni, la composizione dell'invenzione può essere somministrata ad un animale gravido, ad esempio un mammifero come un essere umano al fine di impedire che nel suo bambino si sviluppi una malattia infiammatoria o autoimmune durante la gestazione e/o dopo la nascita.

Le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate ad un paziente a cui è stata diagnosticata una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17, o che è stato identificato come a rischio di una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17. Le composizioni possono anche essere somministrate come una misura profilattica per prevenire lo sviluppo di malattie o condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17 in un paziente sano.

Le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate ad un paziente che è stato identificato come avente un microbiota intestinale anormale. Ad esempio, il paziente può avere colonizzazione ridotta o assente da parte di *Blautia*, e in particolare *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

Le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate come un prodotto alimentare, ad esempio un integratore nutrizionale.

Generalmente, le composizioni dell'invenzione sono per il trattamento di esseri umani, sebbene possano essere usate per trattare animali inclusi mammiferi monogastrici come pollame, maiali, gatti, cani, cavalli o conigli. Le composizioni dell'invenzione possono essere utili per migliorare la crescita e prestazioni degli animali. Se somministrate agli animali, è possibile usare una sonda gastrica orale.

Composizioni

Generalmente, la composizione dell'invenzione comprende batteri. In realizzazioni preferite dell'invenzione, la composizione viene formulata in forma liofilizzata. Ad esempio, la composizione dell'invenzione può comprendere granuli o capsule di gelatina, ad esempio capsule di gelatina dura, comprendenti un ceppo batterico dell'invenzione.

Preferibilmente, la composizione dell'invenzione comprende batteri liofilizzati. La liofilizzazione dei batteri è una procedura ben consolidata e sono disponibili indicazioni rilevanti, ad esempio, in riferimenti [48-50].

In alternativa, la composizione dell'invenzione può comprendere una coltura batterica viva, attiva.

In realizzazioni preferite, la composizione dell'invenzione è incapsulata per permettere il rilascio del ceppo batterico all'intestino. L'incapsulamento protegge la composizione dalla degradazione fino al rilascio nella posizione bersaglio attraverso, ad esempio, rottura con stimoli chimici o fisici come pressione, attività enzimatica, o disintegrazione fisica, che può essere innescata da variazioni nel pH. È possibile usare qualsiasi metodo di incapsulamento adatto. Tecniche di incapsulamento illustrative includono l'intrappolamento all'interno di una matrice porosa, fissaggio o adsorbimento su superfici di veicolo solide, auto-aggregazione mediante flocculazione o con agenti reticolanti, e contenimento meccanico dietro una membrana microporosa o una microcapsula. Indicazioni sull'incapsulamento che possono essere utili per preparare composizioni dell'invenzione sono disponibili, ad esempio, in riferimenti [51] e [52].

La composizione può essere somministrata per via orale e può essere sotto forma di una compressa, capsula o polvere. I prodotti incapsulati sono preferiti poiché *Blautia* è anaerobio. È possibile includere altri ingredienti (come la vitamina C, ad esempio) come agenti di eliminazione di ossigeno e substrati prebiotici per migliorare il rilascio e/o colonizzazione parziale o totale e sopravvivenza *in vivo*. In alternativa, la composizione probiotica dell'invenzione può essere somministrata per via orale come un alimento o prodotto nutrizionale, come latte o prodotti caseari fermentati a base di siero di latte, o come un prodotto farmaceutico.

La composizione può essere formulata come un probiotico.

Una composizione dell'invenzione include una quantità efficace terapeuticamente di un ceppo batterico dell'invenzione. Una quantità efficace terapeuticamente di un ceppo batterico è sufficiente per esercitare un effetto benefico su un paziente. Una quantità efficace terapeuticamente di un ceppo batterico può essere sufficiente a provocare il rilascio e/o colonizzazione parziale o totale dell'intestino del paziente.

Una dose giornaliera adeguata dei batteri, ad esempio per un essere umano adulto, può essere da circa 1×10^3 a circa 1×10^{11} unità formanti colonie (UFC); ad esempio, da circa 1×10^7 a circa 1×10^{10} UFC; in un altro esempio da circa 1×10^6 a circa 1×10^{10} UFC.

In alcune realizzazioni, la composizione contiene il ceppo batterico in una quantità da circa 1×10^6 a circa 1×10^{11} UFC/g, rispetto al peso della composizione; ad esempio, da circa 1×10^8 a circa 1×10^{10} UFC/g. La dose può essere, ad esempio, di 1 g, 3g, 5g, e 10 g.

Generalmente, un probiotico, come la composizione dell'invenzione, viene opzionalmente combinato con almeno un composto prebiotico adatto. Un composto prebiotico è di solito un carboidrato non digeribile come un oligo- o polisaccaride, o un alcol di zucchero, che non viene degradato o assorbito nel tratto digerente superiore. Prebiotici noti includono prodotti commerciali come inulina e transgalatto-oligosaccaridi.

In alcune realizzazioni, la composizione probiotica della presente invenzione include un composto prebiotico in una quantità da circa l'1 a circa il 30% in peso, rispetto alla composizione di peso totale, (ad es. dal 5 al 20% in peso). I carboidrati possono essere scelti dal gruppo costituito da: frutto-oligosaccaridi (o FOS), frutto-oligosaccaridi a catena breve, inulina, isomalto-oligosaccaridi, pectine, xilo-oligosaccaridi (o XOS), chitosano-oligosaccaridi (o COS), beta-glucani, amidi modificati con gomma arabica e resistenti, polidestrosio, D-tagatosio, fibre di acacia, carruba, avena, e fibre di agrumi. In un aspetto, i prebiotici sono i frutto-oligosaccaridi a catena breve (per semplicità mostrati di seguito nella presente come FOSs-c.c); detti FOSs-c.c. sono carboidrati non digeribili, generalmente ottenuti dalla conversione dello zucchero di barbabietola e mediante l'inclusione di una molecola di saccarosio a cui sono legate tre molecole di glucosio.

Le composizioni dell'invenzione possono comprendere eccipienti o veicoli accettabili farmaceuticamente. Esempi di tali eccipienti adatti possono essere trovati nel riferimento [53]. Veicoli o diluenti accettabili per uso

terapeutico sono ben noti nella tecnica farmaceutica e sono descritti, ad esempio, in riferimento [54]. Esempi di veicoli adatti includono lattosio, amido, glucosio, metilcellulosa, magnesio stearato, mannitolo, sorbitolo e simili. Esempi di diluenti adatti includono etanolo, glicerolo e acqua. La scelta di veicolo, eccipiente o diluente farmaceutico può essere selezionata in relazione alla via di somministrazione prevista e pratica farmaceutica standard. Le composizioni farmaceutiche possono comprendere come, o in aggiunta al, veicolo, eccipiente o diluente qualsiasi legante(i), lubrificante(i), agente(i) sospendente, agente(i) di rivestimento, agente(i) solubilizzante adatto. Esempi di leganti adatti includono amido, gelatina, zuccheri naturali come glucosio, lattosio anidro, lattosio a flusso libero, beta-lattosio, dolcificanti di mais, gomme naturali e sintetiche, come acacia, gomma adragante o alginato di sodio, carbossimetilcellulosa e polietilenglicole. Esempi di lubrificanti adatti includono oleato di sodio, stearato di sodio, stearato di magnesio, benzoato di sodio, acetato di sodio, cloruro di sodio e simili. Conservanti, stabilizzanti, coloranti e anche agenti aromatizzanti possono essere forniti nella composizione farmaceutica. Esempi di conservanti includono benzoato di sodio, acido sorbico ed esteri dell'acido p-idrossibenzoico. Possono inoltre essere usati antiossidanti e agenti sospendenti.

Le composizioni dell'invenzione possono essere formulate come un prodotto alimentare. Ad esempio, un prodotto alimentare può fornire un beneficio nutrizionale in aggiunta all'effetto terapeutico dell'invenzione, come in un integratore nutrizionale. Analogamente, un prodotto alimentare può essere formulato per migliorare il gusto della composizione dell'invenzione o per rendere la composizione più invitante da consumare essendo più simile ad un prodotto alimentare comune, piuttosto che ad una composizione farmaceutica. In alcune realizzazioni, la composizione dell'invenzione è formulata come un prodotto a base di latte. Il termine "prodotto a base di latte" indica qualsiasi prodotto liquido o semisolido a base di latte o siero di latte avente un contenuto di grasso variabile. Il prodotto a base di latte può essere, ad es., latte vaccino, latte di capra, latte di pecora, latte scremato, latte intero, latte ricombinato da latte in polvere e siero di latte senza alcuna elaborazione, o prodotto elaborato, come yogurt, latte cagliato, cagliata, latte acido, latte acido intero, latticello e altri prodotti del latte acido. Un altro gruppo importante include le bevande a base di latte, come bevande a base di siero di latte, latt

fermentati, latti condensati, latti per neonati o bambini; latti aromatizzati, gelato; alimenti contenenti latte come i dolci.

In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione contengono un singolo ceppo o specie batterica e non contengono nessun altro ceppo o specie batterica. Tali composizioni possono comprendere solo quantità minime o irrilevanti a livello biologico di altri ceppi o specie batteriche. Tali composizioni possono essere una coltura che è sostanzialmente priva di altre specie di organismi.

Le composizioni per uso secondo l'invenzione possono o possono non richiedere l'approvazione all'immissione in commercio.

In alcuni casi, il ceppo batterico liofilizzato viene ricostituito prima della somministrazione. In alcuni casi, la ricostituzione avviene mediante l'uso di un diluente descritto nella presente.

Le composizioni dell'invenzione possono comprendere eccipienti, diluenti o veicoli accettabili farmaceuticamente.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente: un ceppo batterico dell'invenzione; e un eccipiente, veicolo o diluente accettabile farmaceuticamente; in cui il ceppo batterico è in una quantità sufficiente per trattare un disturbo quando somministrato ad un soggetto che ne ha bisogno; e in cui il disturbo è scelto dal gruppo costituito da asma, asma allergica, asma neutrofila, osteoartrite, artrite psoriasica, artrite idiopatica giovanile, neuromielite ottica (malattia di Devic), spondilite anchilosante, spondiloartrite, lupus eritematoso sistemico, celiachia, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), uveite, sclerite, vasculite, malattia di Behcet, aterosclerosi, dermatite atopica, enfisema, periodontite, rinite allergica, e rigetto di allotrapianto.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente: un ceppo batterico dell'invenzione; e un eccipiente, veicolo o diluente accettabile farmaceuticamente; in cui il ceppo batterico è in una quantità sufficiente per trattare o prevenire una malattia o condizione mediata da IL-17 o dalla via di Th17.

In realizzazioni preferite, detta malattia o condizione è scelta dal gruppo costituito da artrite reumatoide, sclerosi multipla, psoriasi, malattia infiammatoria intestinale, morbo di Crohn, colite ulcerosa, celiachia, asma, asma

allergica, asma neutrofila, osteoartrite, artrite psoriasica, artrite idiopatica giovanile, neuromielite ottica (malattia di Devic), spondilite anchilosante, spondiloartrite, lupus eritematoso sistemico, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), uveite, sclerite, vasculite, malattia di Behcet, aterosclerosi, dermatite atopica, enfisema, parodontite, rinite allergica, e rigetto di allotrapianto.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, in cui la quantità del ceppo batterico è da circa 1×10^3 a circa 1×10^{11} unità formanti colonie per grammo rispetto ad un peso della composizione.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, in cui la composizione viene somministrata ad una dose di 1 g, 3 g, 5 g o 10 g.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, in cui la composizione viene somministrata mediante un metodo scelto dal gruppo costituito da via orale, rettale, sottocutaneo, nasale, buccale, e sublinguale.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, comprendente un veicolo scelto dal gruppo costituito da lattosio, amido, glucosio, metilcellulosa, stearato di magnesio, mannitolo e sorbitolo.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, comprendente un diluente scelto dal gruppo costituito da etanolo, glicerolo e acqua.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, comprendente un eccipiente scelto dal gruppo costituito da amido, gelatina, glucosio, lattosio anidro, lattosio a flusso libero, beta-lattosio, dolcificante di mais, acacia, gomma adragante, alginato di sodio, carbossimetilcellulosa, polietilenglicole, oleato di sodio, stearato di sodio, stearato di magnesio, benzoato di sodio, acetato di sodio e cloruro di sodio.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, comprendente inoltre almeno uno di un conservante, un antiossidante e uno stabilizzante.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, comprendente un conservante scelto dal gruppo costituito da benzoato di sodio, acido sorbico ed esteri dell'acido p-idrossibenzoico.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, in cui detto ceppo batterico è liofilizzato.

In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce la composizione farmaceutica di cui sopra, in cui quando la composizione viene conservata in un contenitore sigillato a circa 4°C o circa 25°C e il contenitore viene posto in un'atmosfera avente il 50% di umidità relativa, almeno l'80% del ceppo batterico come misurato nelle unità formanti colonie, rimane dopo un periodo di almeno circa: 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 1 anno, 1,5 anni, 2 anni, 2,5 anni o 3 anni.

Metodi di coltura

I ceppi batterici per uso nella presente invenzione possono essere coltivati usando tecniche di microbiologia standard come descritte in dettaglio, ad esempio, in riferimenti [55-57].

Il mezzo solido o liquido usato per la coltura può essere un YCFA agar o terreno YCFA. Il terreno YCFA può includere (per 100ml, valori approssimativi): Casitone (1,0 g), estratto di lievito (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteina (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄ · 7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurina (0,1 mg), emina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), acido p-amminobenzoico (3 µg), acido folico (5 µg), e piridossamina (15 µg).

Ceppi batterici per uso in composizioni di vaccini

Gli inventori hanno riscontrato che i ceppi batterici dell'invenzione sono utili per trattare o prevenire malattie o condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17. È probabile che questo sia un risultato dell'effetto che i ceppi batterici dell'invenzione hanno sul sistema immunitario dell'ospite. Pertanto, le composizioni dell'invenzione possono inoltre essere utili per prevenire malattie o condizioni mediate da IL-17 o dalla via di Th17, quando somministrate come composizioni di vaccino. In alcune realizzazioni tali, i ceppi batterici dell'invenzione possono essere uccisi, inattivati o attenuati. In alcune realizzazioni tali, le composizioni possono comprendere un

coadiuvante di vaccino. In alcune realizzazioni, le composizioni sono per somministrazione tramite iniezione, ad esempio tramite iniezione sottocutanea.

Generalità

La pratica della presente invenzione impiegherà, se non indicati diversamente, metodi convenzionali di chimica, biochimica, biologia molecolare, immunologia e farmacologia, che rientrano nell'esperienza della tecnica. Tali tecniche vengono spiegate completamente in letteratura. Si vedano, *ad es.*, riferimenti [58] e [59-65], *ecc.*

Il termine "comprendente" racchiude "incluso" nonché "costituito da" *ad es.* una composizione "comprendente" X può essere costituita esclusivamente da X o può includere qualcosa di aggiuntivo *ad es.* X + Y.

Il termine "circa" in relazione ad un valore numerico x è opzionale e significa, ad esempio, $x \pm 10\%$.

La parola "sostanzialmente" non esclude "completamente" *ad es.* una composizione che è "sostanzialmente priva" di Y può essere completamente priva di Y. Laddove è necessario, la parola "sostanzialmente" può essere omessa dalla definizione dell'invenzione.

Riferimenti ad un'identità di sequenza percentuale tra due sequenze nucleotidiche indicano che quella percentuale di nucleotidi, quando allineata, è uguale nel confronto tra le due sequenze. Questo allineamento e l'omologia o identità di sequenza percentuale possono essere determinati usando programmi software noti nella tecnica, ad esempio quelli descritti nella sezione 7.7.18 di riferimento [66]. Un allineamento preferito è determinato mediante l'algoritmo di ricerca dell'omologia di Smith-Waterman usando una ricerca di lacuna affine con una penalità di lacuna aperta di 12 e una penalità di estensione di lacuna di 2, matrice BLOSUM di 62. L'algoritmo di ricerca dell'omologia di Smith-Waterman è descritto in riferimento [67].

Se non indicato specificamente, un procedimento o metodo comprendente numerosi passaggi può comprendere passaggi aggiuntivi all'inizio o fine del metodo, oppure può comprendere passaggi intermedi aggiuntivi. Inoltre, i passaggi possono essere combinati, omessi o eseguiti in un ordine alternativo, se del caso.

Varie realizzazioni dell'invenzione sono descritte nella presente. Si comprenderà che le proprietà specificate in ciascuna realizzazione possono essere combinate con altre proprietà specificate, per fornire realizzazioni

aggiuntive. In particolare, realizzazioni evidenziate nella presente come adatte, tipiche o preferite possono essere combinate tra loro (tranne quando si escludono a vicenda).

MODALITÀ PER METTERE IN PRATICA L'INVENZIONE

Esempio 1 – Efficacia degli inoculi batterici in un modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica

Sommario

Ai topi sono state somministrate composizioni comprendenti ceppi batterici secondo l'invenzione ed essi sono stati successivamente stimolati con estratto di acari della polvere domestica (HDM) per suscitare una risposta infiammatoria allergica. La risposta infiammatoria a HDM include componenti eosinofili e neutrofilari, è mediata da IL-17 e dalla via di Th17, ed è un modello per l'asma. L'entità e caratteristiche della risposta infiammatoria presentate dai topi trattati con composizioni dell'invenzione sono state confrontate con i gruppi di controllo. Si è osservato che le composizioni dell'invenzione alleviano la risposta infiammatoria, e riducono il reclutamento di eosinofili e neutrofilari, indicando che possono essere utili per trattare condizioni mediate da IL-17 e Th17 come eosinofilia, neutrofilia e asma.

Ceppo

830: *Blautia stercoris*

Disegno dello studio

Gruppi:

1. Gruppo di controllo negativo. Trattamento con controllo con veicolo (per via orale).
6. Trattamento con ceppo 830 con inoculo di batteri terapeutici (per via orale).
7. Gruppo di controllo positivo. Trattamento con desametasone (i.p.).
8. Gruppo di controllo non trattato.

Numero di topi per gruppo = 5

Giorno -14 fino al giorno 13: Somministrazione quotidiana di controllo con veicolo per via orale (Gruppo 1).

Giorno -14 fino al giorno 13: Somministrazione quotidiana di inoculo di batteri terapeutici per via orale (Gruppo 2-6).

Giorno 0, 2, 4, 7, 9, 11 Somministrazione di 15ug di HDM (estratto di acari della polvere domestica – Numero di catalogo: XPB70D3A25, Numero di lotto: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, U.S.A.) in un volume di 30ul di PBS per via nasale (Gruppo 1-8).

Giorno 0, 2, 4, 7, 9, 11 Somministrazione di desametasone (i.p., 3mg/kg, Sigma-Aldrich, Numero di catalogo D1159) (Gruppo 7).

Giorno 14 Sacrificio di tutti gli animali per l'analisi.

Numero totale di topi = 40.

Punti di esito finale e analisi

Al giorno 14 gli animali sono stati sacrificati mediante iniezione intraperitoneale letale con pentobarbitolo (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat.: 1170139A) seguita immediatamente da un lavaggio broncoalveolare (BAL).

Le cellule sono state isolate dal liquido di BAL (lavaggio broncoalveolare) e sono state eseguite conte differenziali delle cellule (200 conte di cellule/campioni).

Materiale e metodi

Topi. Topi BALB/c femmine di 7 settimane di età sono stati acquistati da Charles River Laboratories e assegnati casualmente a gabbie con un totale di 5 topi per gabbia (gabbie ventilate provenienti da Indulab AG, Gams, Svizzera Tipo di gabbia: “The Sealsafe™ – IVC cage”. Numero prodotto 1248L). Le gabbie sono state etichettate con il numero dello studio, numero di gruppo e data di inizio dell'esperimento. I topi sono stati monitorati settimanalmente e lasciati acclimatare alla struttura per 7 giorni prima dell'inizio dello studio (Giorno di studio -14). Gli animali avevano 8 settimane di età al Giorno di studio -14. Acqua e cibo erano disponibili *ad libitum*. Era presente arricchimento della gabbia. La cura quotidiana degli animali è stata eseguita in conformità con la licenza di autorizzazione locale numero 2283.1 (rilasciata e approvata da: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Acqua potabile e cibo erano disponibili *ad libitum* e ricaricati una volta al giorno. Era presente arricchimento della gabbia. Sono state osservate le norme sul benessere degli

animali come fornite dalle autorità ufficiali della Svizzera ai sensi dell'ordinanza 455.163 dell'FVO. (Federal Veterinary Office) sull'allevamento di animali da laboratorio, produzione di animali modificati geneticamente, e metodi di sperimentazione sugli animali.

Coltura dell'inoculo di batteri. All'interno di una postazione di lavoro sterile, una fiala criogenica di batteri è stata scongelata riscaldando in mano guantata e ~0,7 ml di contenuto sono stati iniettati in una provetta Hungate (Numero di Cat., 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), contenente 8 ml di YCFA anaerobico. Di solito venivano preparate due provette per ceppo. Le provette Hungate sono state poi incubate (in maniera statica) a 37°C per un massimo di 24-26 ore (per il ceppo 830).

Coltura del controllo con veicolo. Una provetta Hungate contenente 8 ml di YCFA anaerobico è stata incubata (in maniera statica) a 37°C per 16 ore.

Somministrazione di inoculo di batteri o controllo con veicolo. 400ul di inoculo di batteri coltivati o controllo con veicolo sono stati somministrati al giorno tramite sonda orogastrica.

Sensibilizzazione intranasale. I topi sono stati anestetizzati mediante iniezione i.p. con 9,75 mg di xilasolo e 48,75 mg di ketasolo per kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Svizzera) e sottoposti a somministrazione di 15ug di HDM (Numero di catalogo: XPB70D3A25, Numero di lotto: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, U.S.A.) in un volume di 30ul di PBS per via nasale.

Preparazione e somministrazione di composto di controllo positivo Desametasone. Il sale disodico di Desametasone 21-fosfato (Sigma-Aldrich, Numero di catalogo D1159, Lotto N° SLBD.1030V) è stato disciolto in H₂O e somministrato agli animali in una dose di 3mg/kg in un volume di 200ul per via orale nei giorni indicati nel protocollo di studio sopra.

Procedura terminale. Al giorno 14 gli animali sono stati sacrificati mediante iniezione i.p. letale con pentobarbitolo (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat.: 117013 9A) seguita immediatamente da lavaggio broncoalveolare (BAL) in 500 ul di soluzione salina.

Misurazione di infiltrati cellulari nel BAL. Le cellule sono state isolate dal liquido di BAL e le conte differenziali di cellule sono state eseguite sulla base di criteri morfologici e citochimici standard.

Grafici e analisi statistica. Tutti i grafici sono stati generati con Graphpad Prism versione 6 ed è stata applicata un'ANOVA a una via. I risultati dall'analisi statistica sono stati forniti con le singole tabelle di dati. Le barre di errore rappresentano l'errore standard della media (SEM).

Risultati e analisi

I risultati degli esperimenti sono mostrati in Figure 1-9.

Non è stata osservata morbilità o mortalità nei topi trattati con i batteri o il veicolo. I due controlli, trattamento con veicolo (controllo negativo) e il trattamento con desametasone (controllo positivo) si sono comportati come attesi, con eosinofilia e neutrofilia alterate osservate in seguito al trattamento con desametasone.

I risultati più importanti di questo esperimento sono mostrati in Figure 6 e 7, che forniscono un rapporto sul numero totale e percentuale di neutrofili rilevati nel lavaggio bronchiolare in seguito alla stimolazione con HDM. La somministrazione del ceppo 830 è risultata in una riduzione dei neutrofili totali e la proporzione di neutrofili nel BAL rispetto al controllo con solo veicolo.

Esempio 2 - Efficacia degli inoculi batterici in un modello di topo di asma neutrofila grave

Sommario

Ai topi sono state somministrate composizioni comprendenti ceppi batterici secondo l'invenzione ed essi sono stati successivamente sensibilizzati con somministrazioni sottocutanee di estratto di acari della polvere (HDM) e stimolati con una somministrazione intranasale di HDM al fine di modellare la risposta infiammatoria dell'asma neutrofila grave. L'entità e caratteristiche della risposta infiammatoria mostrata dai topi trattati con le composizioni dell'invenzione sono state confrontate con gruppi di controllo. È stato osservato che le composizioni dell'invenzione alleviano la risposta infiammatoria, e in particolare riducono il reclutamento dei neutrofili, in una maniera confrontabile con il controllo positivo comprendente somministrazioni di anticorpi anti-IL-17. I dati indicano pertanto che le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare condizioni mediate da IL-17 e Th17 come neutrofilia e asma.

Ceppo

830: *Blautia stercoris*

Disegno dello studio

Gruppi:

1. Gruppo di controllo negativo. Trattamento con controllo di veicolo (per via orale).
6. Trattamento con ceppo 830 di inoculo di batteri terapeutici (per via orale).
7. Gruppo di controllo positivo. Trattamento anti-IL-17 (i.p.).
8. Gruppo di controllo non trattato.
- 9: Topi sani (valore al basale).

Numero di topi per gruppo (Gruppo 1-8) = 5

Giorno 14 fino al giorno 17: Somministrazione quotidiana di controllo con veicolo per via orale (gruppo 1).

Giorno 14 fino al giorno 17: Somministrazione quotidiana di inoculo di batteri terapeutici per via orale (Gruppo 2-6).

Giorno 0: Sensibilizzazione con HDM in CFA (s.c.) (Gruppo 1-8).

Giorno 7: Sensibilizzazione con HDM in CFA (s.c.) (Gruppo 1-8).

Giorno 13, 15, 17: Somministrazione di anticorpi neutralizzanti anti IL-17 per via i.p. (Gruppo 7).

Giorno 14, 15, 16, 17: Stimolazione con HDM in 30ul di PBS per via nasale (Gruppo 1-8).

Giorno 18: Sacrificio di tutti gli animali per l'analisi.

Punti di esito finali e analisi:

Al giorno 14 gli animali sono stati sacrificati mediante iniezione intraperitoneale letale con pentobarbitolo (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat.: 1170139A) seguita immediatamente da un lavaggio broncoalveolare (BAL).

Le cellule sono state isolate dal liquido di BAL e sono state eseguite conte differenziali delle cellule (200 conte di cellule/campioni).

Materiale e metodi

Topi. Topi C57BL/6 femmine di 7 settimane di età sono stati acquistati da Charles River Laboratories e assegnati casualmente a gabbie con un totale di 5 topi per gabbia (gabbie ventilate provenienti da Indulab AG, Gams, Svizzera Tipo di gabbia: "The Sealsafe™ – IVC cage". Numero prodotto 1248L). Le gabbie sono state

etichettate con il numero dello studio, numero di gruppo e data di inizio dell'esperimento. I topi sono stati monitorati settimanalmente e lasciati acclimatare alla struttura per 7 giorni prima dell'inizio dello studio (Giorno di studio -14). Gli animali avevano 8 settimane di età al Giorno di studio -14. Acqua e cibo erano disponibili *ad libitum*. Era presente arricchimento della gabbia. La cura quotidiana degli animali è stata eseguita in conformità con la licenza di autorizzazione locale numero 2283.1 (rilasciata e approvata da: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Acqua potabile e cibo erano disponibili *ad libitum* e ricaricati una volta al giorno. Era presente arricchimento della gabbia. Sono state osservate le norme sul benessere degli animali come fornite dalle autorità ufficiali della Svizzera ai sensi dell'ordinanza 455.163 dell'FVO. (Federal Veterinary Office) sull'allevamento di animali da laboratorio, produzione di animali modificati geneticamente, e metodi di sperimentazione sugli animali.

Coltura dell'inoculo di batteri. All'interno di una postazione di lavoro sterile, una fiala criogenica di batteri è stata scongelata riscaldando in mano guantata e ~0,7 ml di contenuto sono stati iniettati in una provetta Hungate (Numero di Cat., 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), contenente 8 ml di YCFA anaerobico. Di solito venivano preparate due provette per ceppo. Le provette Hungate sono state poi incubate (in maniera statica) a 37°C per un massimo di 24-26 ore (per il ceppo 830).

Coltura del controllo con veicolo. Una provetta Hungate contenente 8 ml di YCFA anaerobico è stata incubata (in maniera statica) a 37°C per 16 ore.

Somministrazione di inoculo di batteri o controllo con veicolo. 400ul di inoculo di batteri coltivati o controllo con veicolo sono stati somministrati al giorno tramite sonda orogastrica.

Sensibilizzazione con HDM. 50 µg di HDM (Numero di catalogo: XPB70D3A25, Numero di lotto: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, U.S.A.) in PBS sono stati emulsionati in volume uguale di coadiuvante completo di Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, U.S.A.) e somministrati per via sottocutanea in un volume di 200 µl, due volte nell'arco di due settimane su fianchi opposti. Una settimana dopo la seconda immunizzazione, i topi sono stati anestetizzati mediante iniezione i.p. con 9,75 mg di xilasolo e 48,75 mg di ketasolo per kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Svizzera) e poi sono state fornite loro stimolazioni intranasali di 15

µg di HDM in un volume di 30ul di PBS in 4 giorni consecutivi. L'analisi è stata eseguita un giorno dopo la stimolazione finale.

Preparazione e somministrazione del composto di controllo positivo anticorpo anti-IL-17 di topo.

L'anticorpo neutralizzante anti-IL-17 è stato ottenuto da Bio X Cell ed è stato conservato a 4°C (Clone 17F3, Numero di cat. BE0173, Bio X Cell) e somministrato per via i.p. alla dose di 12,5 mg/kg nei giorni indicati nel protocollo di studio di cui sopra.

Procedura terminale. Al giorno 18 gli animali sono stati sacrificati mediante iniezione i.p. letale con pentobarbitolo (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat.: 117013 9A) seguita immediatamente da lavaggio broncoalveolare (BAL) in 500 ul di soluzione salina.

Misurazione di infiltrati cellulari nel BAL. Le cellule sono state isolate dal liquido di BAL e le conte differenziali di cellule sono state eseguite sulla base di criteri morfologici e citochimici standard.

Grafici e analisi statistica. Tutti i grafici sono stati generati con Graphpad Prism versione 6 ed è stata applicata un'ANOVA a una via. I risultati dall'analisi statistica sono forniti con le singole tabelle di dati. Le barre di errore rappresentano l'errore standard della media (SEM).

Risultati e analisi

I risultati dell'esperimento sono mostrati in Figure 10-18.

Non è stata osservata morbilità o mortalità nei topi trattati con i batteri o il veicolo. Come mostrati in Figure 11, 12, 15 e 16, alcuni topi trattati con il ceppo 830 presentavano eosinofilia e neutrofilia ridotte.

Esempio 3 – Efficacia degli inoculi batterici per trattare l'artrite in un modello di topo di artrite indotta da collagene di tipo II

Materiali e metodi

Ceppo

830: *Blautia stercoris*

Colture batteriche

Le colture batteriche sono state coltivate per la somministrazione in una stazione di lavoro anaerobica (Don Whitley Scientific).

Il ceppo batterico #830 è stato coltivato usando soluzioni madre di glicerolo. Le soluzioni madre di glicerolo sono state conservate a -80°C. Tre volte alla settimana, le soluzioni madre di glicerolo sono state scongelate a temperatura ambiente e strisciate su piastre di YCFA. In ogni occasione è stata usata una nuova aliquota di glicerolo. I batteri sono stati lasciati crescere su una data piastra per un massimo di 72 ore.

Le soluzioni da somministrare agli animali sono state preparate due volte al giorno con un intervallo di otto ore per i trattamenti mattutini (AM) e pomeridiani (PM). Una colonia batterica è stata prelevata dalla piastra strisciata e trasferita in una provetta contenente terreno YCFA. Il ceppo batterico #830 è stato lasciato crescere per 24 ore prima delle somministrazioni AM. I batteri sono stati sottoposti a sub-coltura all'1% in terreno YCFA per le somministrazioni PM. I valori di OD sono stati registrati per ciascun ceppo dopo i preparativi per il trattamento mattutino e pomeridiano.

Modello di topo artrite indotta da collagene di tipo II

Topi DBA/1 maschi adulti sono stati assegnati in maniera casuale a gruppi sperimentali e sono stati lasciati acclimatarsi per due settimane. Al Giorno 0, agli animali sono stati somministrati mediante iniezione sottocutanea 100 microlitri di un'emulsione contenente 100 microgrammi di collagene di tipo II (CII) in coadiuvante incompleto di Freund integrato con 4 mg/ml di *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Al Giorno 21, agli animali è stata somministrata mediante iniezione sottocutanea un'emulsione di richiamo contenente 100 µg di collagene di tipo II in coadiuvante incompleto di Freund.

I trattamenti sono stati forniti secondo il programma di somministrazione di seguito. Dal Giorno -14 fino alla fine dell'esperimento al Giorno 45, gli animali sono stati pesati tre volte alla settimana. Dal Giorno 21 fino alla fine dell'esperimento, gli animali sono stati valutati tre volte alla settimana per i segni clinici di artrite che includevano gonfiore delle zampe posteriori e anteriori, articolazioni radio-carpi (polso) e articolazioni tibio-tarsali (caviglia).

Al Giorno 45 i topi sono stati abbattuti e campioni di sangue terminali sono stati prelevati per l'analisi delle citochine.

Al Giorno -14, Giorno 0 e Giorno 45, campioni fecali sono stati raccolti per l'analisi microbiologica, immediatamente sottoposti a congelamento rapido e conservati a -80°C.

Il modello di topo di artrite indotta da collagene (CIA) è un modello di topo ampiamente consolidato per l'artrite reumatoide [68]. L'immunizzazione con CII provoca una patogenesi che include diverse proprietà patologiche importanti dell'artrite reumatoide, inclusa iperplasia sinoviale, infiltrazione di cellule mononucleate e degradazione della cartilagine. In maniera significativa, lo sviluppo di CIA è mediato da cellule Th17 attraverso la secrezione di IL-17A [69]. La risposta immunitaria alla base del modello di artrite è migliorata dall'uso del coadiuvante di Freund integrato con *Mycobacterium tuberculosis*.

Al Giorno 21, le milze sono state raccolte da tre animali satellite in ciascun gruppo. Le cellule sono state coltivate per 72 ore in presenza o assenza di collagene di tipo II. Le citochine, incluse TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17, sono state quantificate nei supernatanti di coltura e nel siero terminale mediante Luminex. La proliferazione cellulare è stata quantificata usando un metodo di incorporazione con timidina triziata.

Gruppi di trattamento e dosaggi

Tutti i gruppi erano n=15 (n=12 per il gruppo di studio principale e n=3 per i gruppi satellite)

Il veicolo usato per la bioterapia era terreno di estratto di lievito-casitone-acidi grassi (YCFA).

	Gruppo	Dose	Somministrazione		Induzione della malattia
			Via	Regime	
1	Veicolo	5 ml/kg	P.O.	BID: Giorno -14-Fine	Giorno 0: Collagene/CFA, una volta, S.C. Giorno 21: Collagene/IFA, una volta, S.C.
3	Agente bioterapeutico #830	5 ml/kg			

P.O.: sonda orogastrica, *S.C.*: iniezione sottocutanea, *BID*: due volte al giorno, *CFA*: coadiuvante completo di Freund.

Pesi corporei

Dal Giorno -14 fino alla fine dell'esperimento, gli animali sono stati pesati tre volte alla settimana. I dati sono stati rappresentati graficamente (Media \pm SEM).

Osservazioni cliniche non specifiche

Dal Giorno -14 fino alla fine dell'esperimento, gli animali sono stati esaminati quotidianamente per segni clinici non specifici che includevano postura anomala (curvata), condizioni del mantello anomale (piloerezione) e livelli di attività anomali (attività ridotta o aumentata).

Osservazioni cliniche

Dal Giorno 21 fino alla fine dell'esperimento al Giorno 45, gli animali sono stati valutati tre volte alla settimana per i segni clinici di artrite che includevano gonfiore delle zampe posteriori e anteriori, articolazioni radio-carpali (polso) e articolazioni tibio-tarsali (caviglia). Ogni arto è stato valutato usando la seguente scala: (0) normale, (1) gonfiore minimo, (2) gonfiore lieve, (3) gonfiore moderato e (4) gonfiore grave. È stato calcolato un punteggio clinico aggiungendo il punteggio di ciascun arto. Il punteggio clinico massimo possibile per un animale era di (16). Animali con un punteggio pari a (12) in due occasioni consecutive e animali con un punteggio maggiore di (12) in una qualsiasi occasione sono stati abbattuti. I dati sono stati rappresentati graficamente (Media \pm SEM).

Analisi della proliferazione cellulare

Al giorno 21, tre animali satellite per gruppo sono stati abbattuti e le milze sono state dissezionate. Le cellule della milza sono state coltivate per 72 ore in presenza o assenza di collagene di tipo II. Dopo 72 ore, le cellule sono state pulsate per una notte in presenza di timidina triziata. La proliferazione cellulare è stata quantificata misurando l'incorporazione di timidina. I dati sono stati rappresentati graficamente (Media \pm SEM). I supernatanti sono stati prelevati e provati per la presenza di citochine chiave.

Analisi delle citochine

I supernatanti terminali dalle colture di cellule della milza sono stati provati per quantificare TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 mediante Luminex. I dati sono stati rappresentati graficamente (Media \pm SEM).

Analisi microbiologica

Al Giorno -14, Giorno 0 e Giorno 45, sono stati raccolti campioni fecali da ciascun animale, immediatamente sottoposti a congelamento rapido e conservati a -80°C. I ciechi (incluso il contenuto) sono stati immediatamente sottoposti a congelamento rapido e conservati a -80°C. Una prova di identificazione batterica è stata eseguita quotidianamente piastrandoli i batteri.

Istopatologia

Alla fine dell'esperimento, le zampe posteriori sono state conservate in fissativo per tessuti. I campioni sono stati trasferiti in soluzione di decalcificazione. I campioni di tessuto sono stati elaborati, sezionati e colorati con ematossilina ed eosina. Le sezioni sono state valutate da un istopatologo qualificato, cieco rispetto al disegno dell'esperimento, per segni di artrite che includono infiammazione, danno alla cartilagine articolare e danno all'osso metafisario sottostante. È stato usato un sistema di punteggio dettagliato (si veda di seguito). I dati sono stati rappresentati graficamente (Media \pm SEM). Sono stati forniti dati grezzi e analizzati nonché immagini rappresentative.

Tabella 1: Sistema di punteggio istopatologico

Valutazione	Descrizione
Infiammazione	
0	Articolazione normale
1	Iperplasia sinoviale lieve con infiammazione dominata dai neutrofili. Bassi numeri di neutrofili e macrofagi nello spazio articolare.
2	Iperplasia sinoviale con infiammazione da moderata a marcata che coinvolge sia neutrofili che macrofagi. Neutrofili e macrofagi nello spazio articolare; possono esservi dei detriti di tessuto necrotico.
3	Iperplasia sinoviale con infiammazione marcata che coinvolge sia neutrofili che macrofagi. Perdita del rivestimento dei sinoviociti. L'infiammazione può estendersi dalla sinovia al tessuto circostante incluso il muscolo. Numerosi neutrofili e macrofagi nello spazio articolare, insieme a detriti di tessuto necrotico significativi.
Danno alla cartilagine articolare	
0	Articolazione normale
1	La cartilagine articolare mostra solo lievi alterazioni degenerative. Perifericamente può essere presente formazione iniziale di <i>pannus</i> .
2	La cartilagine articolare mostra alterazione degenerativa moderata e perdita focale. La formazione di <i>pannus</i> è presente a livello focale.

Valutazione	Descrizione
Infiemmazione	
3	Disgregazione e perdita di cartilagine articolare significativa con ampia formazione di <i>pannus</i> .
Danno all'osso metafisario sottostante	
0	Articolazione normale
1	Nessuna variazione nell'osso metafisario sottostante.
2	Può esservi necrosi focale o fibrosi dell'osso metafisario.
3	Disgregazione o collasso dell'osso metafisario. Infiammazione estesa, necrosi o fibrosi che si estende allo spazio midollare della metafisi.

Risultati e analisi

Sopravvivenza e osservazioni cliniche non specifiche

Alcuni animali sono stati abbattuti prima della fine programmata dello studio a causa della gravità dei segni clinici di artrite o a causa della gravità delle osservazioni cliniche non specifiche.

Un animale in Gruppo 1 (trattato con veicolo) è stato abbattuto durante il periodo di pre-trattamento (Giorno -14 fino a Giorno 0 – animale arrivato dal venditore con una zampa rotta).

Sette animali sono stati abbattuti a causa della gravità dei segni clinici di artrite: cinque animali in Gruppo 1 (trattati con veicolo) e due animali in Gruppo 2 (trattati con agente bioterapeutico #830).

Sei animali sono stati abbattuti a causa della gravità dei segni clinici non specifici inclusa postura anomala (curvata), condizioni anomale del mantello (piloerezione), livelli anomali di attività (attività ridotta): tre animali in Gruppo 1 (trattati con veicolo) e tre animali in Gruppo 2 (trattati con agente bioterapeutico #830).

Pesi corporei

I dati sui pesi corporei registrati dal Giorno -14 al Giorno 0 ed espressi come una percentuale dei pesi corporei iniziali (Giorno -14) sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie seguita da post-test di Dunnett per confronti multipli con il Giorno -14 poi per confronti multipli con il gruppo trattato con veicolo. I dati sono presentati in Figura 19. I dati dagli animali abbattuti prima della fine programmata dell'esperimento sono stati esclusi dalle analisi.

Rispetto al Giorno -14, le somministrazioni due volte al giorno tramite sonda orogastrica hanno indotto una perdita di peso corporeo significativa nel gruppo trattato con veicolo al Giorno -9 e -7 e in Gruppo 3 (trattato con agente bioterapeutico #830) al Giorno -11 e Giorno -9.

I dati sui pesi corporei registrati dal Giorno 0 al Giorno 28 ed espressi come una percentuale dei pesi corporei iniziali (Giorno 0) sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie seguita da post-test di Dunnett per confronti multipli con il Giorno 0 nel Gruppo di veicolo, poi per un confronto multiplo con il gruppo trattato con veicolo. I dati sono presentati in Figura 20. I dati dagli animali abbattuti prima della fine programmata dell'esperimento e dagli animali satellite sono stati esclusi dalle analisi. I dati da Giorno 28, Giorno 35 e Giorno 42 sono stati inoltre analizzati mediante ANOVA a una via seguita da post-test di Dunnett per confronti multipli con il gruppo trattato con veicolo.

L'insorgenza dei segni clinici di artrite era associata ad una perdita di peso corporeo significativa al Giorno 26 e Giorno 28 ($p < 0,0001$) rispetto al Giorno 0 nel gruppo trattato con veicolo.

Rispetto al gruppo trattato con veicolo, i pesi corporei erano significativamente più alti in Gruppo 3 (agente bioterapeutico #830) trattato al Giorno 28 ($<0,005$).

Osservazioni cliniche

I dati dei punteggi clinici sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie seguita da post-test di Dunnett per confronti multipli tra i giorni nel gruppo trattato con veicolo poi per confronti multipli tra i gruppi sperimentali e il gruppo trattato con veicolo ogni giorno. I dati sono presentati in Figura 21. I dati registrati da animali abbattuti prima della fine dell'esperimento sono stati esclusi dall'analisi. Quando gli animali sono stati abbattuti a causa della gravità dei segni clinici di artrite, è stato riportato l'ultimo punteggio registrato per i giorni successivi e usato nelle analisi statistiche.

Un aumento significativo dei punteggi clinici è stato osservato nel gruppo trattato con veicolo dal Giorno 28 fino al Giorno 45 ($p < 0,0001$) rispetto al Giorno 21.

Agente bioterapeutico #830 ha indotto una riduzione dei punteggi clinici rispetto al gruppo trattato con veicolo dal Giorno 28 fino al Giorno 45. La riduzione era statisticamente significativa al Giorno 31 e Giorno 45 ($p < 0,05$).

Analisi della proliferazione cellulare

Per validare il saggio, sono stati coltivati splenociti in presenza di anti-CD3 e anti-CD28 solubile (anti-CD3/CD28) come stimoli di controllo positivo per confermare il potenziale proliferativo delle cellule.

Sono state osservate forti risposte proliferative ad anti-CD3/CD28 in tutti i gruppi sperimentali, mostrando che le cellule erano sane, vitali e in grado di rispondere ai segnali di attivazione.

Per provare la risposta proliferativa in presenza di Collagene II (CII), gli splenociti sono stati coltivati in presenza di CII a 50 $\mu\text{g/ml}$. La risposta proliferativa degli splenociti a CII è stata analizzata mediante ANOVA a due vie seguita da post-test di Sydak per confronti multipli tra splenociti non stimolati e stimolati con CII e ANOVA a una via seguita da post-test di Dunnett per il confronto della risposta stimolata con CII in diversi gruppi sperimentali con il gruppo trattato con veicolo. I dati sono presentati in Figura 22.

CII ha indotto un aumento molto significativo di incorporazione di ^3H -timidina (cpm) rispetto agli splenociti non stimolati nel gruppo trattato con veicolo ($p < 0,0001$).

I gruppi trattati con agente bioterapeutico #830 hanno dimostrato livelli significativamente più bassi di proliferazione degli splenociti indotta da CII rispetto al gruppo trattato con veicolo.

Livelli di citochine in supernatanti di coltura tissutale

I livelli di ciascuna citochina sono stati misurati in supernatanti di coltura tissutale derivati da colture stimolate con anti-CD3/CD28 mediante analisi con Luminex. Queste hanno mostrato risposte solide per tutte le citochine misurate (i livelli medi nel gruppo con veicolo erano i seguenti: 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).

Le sezioni seguenti riassumono i dati ottenuti dalle colture stimolate con Collagene II. Ove applicabile, sono state condotte analisi statistiche delle differenze tra i livelli di citochine nei supernatanti di splenociti non stimolati e stimolati con CII usando ANOVA a due vie seguita da post-test di Sidak per confronti multipli,

mentre è stata usata ANOVA a una via seguita da post-test di Dunnett per il confronto della risposta stimolata con CII in gruppi trattati con agente bioterapeutico con il gruppo trattato con veicolo. Non vi era alcuna differenza significativa nei livelli di citochine tra i gruppi in entrambi i casi. Ciò è probabilmente dovuto alla piccola dimensione del campione usato (n=3).

Al fine di presentare in maniera più accurata la distribuzione dei dati per le citochine con una dispersione sostanziale dei dati, questi vengono presentati come grafici di diffusione.

Le medie di gruppo di IL-4 nei supernatanti di coltura tissutale dopo stimolazione con CII erano <5pg/ml. Queste non sono considerate significative biologicamente e non sono incluse nella presente. Le medie di gruppo di TNF- α nei supernatanti di coltura tissutale dopo stimolazione con collagene erano al di sotto del limite di quantificazione.

Livelli nei supernatanti di IFN- γ (Figura 23)

Insieme a IL-17, IFN- γ è la principale citochina che guida la malattia nel modello di CIA. Il grafico di diffusione in Figura 23 dimostra livelli di IFN- γ dopo stimolazione con CII, con una mediana di gruppo che è più alta per il gruppo trattato con veicolo rispetto a quello con agente bioterapeutico.

Livelli nei supernatanti di IL-17A (Figura 24)

I livelli di IL-17A erano di 50pg/ml nelle colture stimolate con CII per il gruppo trattato con veicolo. I livelli di questa citochina sembravano inferiori nel gruppo con agente bioterapeutico rispetto a quello trattato con veicolo.

Livelli nei supernatanti di IL-10 (Figura 25)

I livelli di IL-10 nel gruppo trattato con veicolo erano di 13 pg/ml e 2,1 pg/ml per le colture stimolate con CII, e di controllo con terreno, rispettivamente. Livelli più alti di IL-10 (che è una citochina antinfiammatoria) per il gruppo trattato con veicolo possono essere attesi poiché infiammazione e induzione di citochine pro-infiammatorie potrebbero essere accompagnate da un meccanismo antinfiammatorio di risposta.

Livelli nei supernatanti di IL-6 (Figura 26)

Citochine infiammatorie come IL-6 e TNF- α generalmente non sono prodotte ad alti livelli in colture anti-CII. Tuttavia, i loro livelli possono essere alterati come conseguenza della modulazione immunitaria. I livelli di IL-6

in colture stimolate con CII erano modesti, raggiungendo i 10pg/ml. Sebbene più alte rispetto alle colture di controllo con terreno, queste differenze erano troppo piccole per fornire una base logica per l'esecuzione di analisi statistiche.

Analisi microbiologica

La crescita batterica è stata confermata misurando la densità ottica a 600 nm usando uno spettrofotometro. L'identità dei batteri è stata confermata confrontando le immagini di piastre con striscio con immagini di riferimento.

Seguendo il metodo di preparazione dei batteri migliorato, sono state somministrate dosi di ceppo batterico notevolmente alte dal Giorno -2 e Giorno -3 come indicate dagli alti valori di OD misurati.

Campioni fecali sono stati raccolti e sottoposti a congelamento rapido al Giorno -14, Giorno 0 e al termine.

Istopatologia

I risultati di istopatologia sono mostrati in Figure 65-69. Come attesa per questo modello, è stata osservata una variabilità intra-individuale e interindividuale in termini di presenza/assenza di artrite o della gravità della variazione presente.

La natura della patologia era quella attesa per questo modello, con ampia infiammazione cronica-attiva mista della sinovia e borsa che si estendeva fino a coinvolgere i tessuti molli periarticolari (muscolo, tessuto adiposo, collagene dermico). Nelle articolazioni colpite in maniera più grave si è verificata degenerazione della cartilagine articolare e perdita con detriti intra-articolari e infiammazione e disgregazione della struttura articolare e ossea mediante fibrosi e infiammazione.

L'incidenza delle variazioni istopatologiche era: veicolo – 80% (16/20); Agente bioterapeutico #830 – 20% (4/20). Il trattamento con Agente bioterapeutico #830 ha ridotto l'incidenza dei punteggi istopatologici negli arti posteriori di topo rispetto al gruppo trattato con veicolo (si vedano Figure 65-68). I punteggi di istopatologia sono stati analizzati mediante ANOVA a una via per dati non parametrici (test di Kruskal-Wallis) seguita da post-test di Dunn per confronti multipli con il gruppo trattato con veicolo. Agente bioterapeutico #830 ha indotto una riduzione significativa dei punteggi di infiammazione articolare osservati nell'istopatologia rispetto al

gruppo trattato con veicolo ($p < 0,01$). Agente bioterapeutico #830 ha indotto una riduzione significativa dei punteggi di danno alla cartilagine osservati nell'istopatologia rispetto al gruppo trattato con veicolo ($p < 0,001$). Agente bioterapeutico #830 ha indotto una riduzione significativa dei punteggi di danno osseo osservati nell'istopatologia rispetto al gruppo trattato con veicolo ($p < 0,001$). Agente bioterapeutico #830 ha indotto una riduzione significativa dei punteggi di istopatologia totali rispetto al gruppo trattato con veicolo ($p < 0,001$).

Sommario

Punteggi clinici aumentati sono stati osservati dal Giorno 28 dopo la prima somministrazione di collagene di tipo II, come attesi in questo modello di artrite in topi DBA/1. È stato mostrato che Agente bioterapeutico #830 era efficace nel trattare l'artrite in questo modello. Agente bioterapeutico #830 è stato efficace nel ridurre la gravità dei punteggi clinici e nel ridurre la malattia patologica nelle articolazioni, come dimostrata nell'analisi istopatologica.

Risposte proliferative di richiamo al Collagene II sono state osservate nelle colture di splenociti da tutti i gruppi sperimentali. La risposta specifica per il collagene è stata ridotta significativamente in seguito al trattamento con Agente bioterapeutico #830 (Gruppo 3).

La maggior parte delle citochine di cellule T provate ha mostrato aumenti rilevabili tra colture stimolate con Collagene II e controlli con terreno nel gruppo trattato con veicolo. Questi aumenti non erano così ovvi nel gruppo trattato con agente bioterapeutico. Questo supporta ampiamente le risposte proliferative di richiamo al Collagene II descritte sopra.

Vi era evidenza di soppressione dell'asse Th1/Th17, che è la risposta patogenica in questo modello e nell'AR umana. La correlazione di livelli ridotti di citochine con proliferazione ridotta suggerisce la modulazione immunitaria. Non vi erano prove che questa modulazione risultasse da livelli potenziati di IL-4 associata a Th2 o da aumenti della citochina immunomodulante, IL-10.

Esempio 4 – Analisi aggiuntiva dell'effetto di inoculi batterici nel modello di topo di asma indotta da acari della polvere domestica

I topi provati in Esempio 1 sono stati sottoposti ad analisi aggiuntive per caratterizzare inoltre l'effetto delle composizioni dell'invenzione sulla risposta infiammatoria di asma allergica.

Materiali e metodi

Prelievo di sangue e preparazione del siero al giorno 14. Campioni di sangue di animali sono stati prelevati tramite puntura cardiaca. Il siero è stato isolato dal campione di sangue mediante centrifugazione per 5 min. a 14000g e conservato a -20°C.

Rimozione di organi al giorno 14. Prelievo del lobo polmonare sinistro in formalina per analisi istologica di prosecuzione. Prelievo dei lobi polmonari destri (tutti i lobi rimanenti) e rimozione del siero per congelamento rapido e analisi di prosecuzione. Il liquido di BAL rimanente è stato sottoposto a congelamento rapido per analisi di prosecuzione.

Misurazione dei livelli di anticorpi nel siero e liquido di BAL

La produzione totale di anticorpi IgE e IgG1 specifico per l'acaro della polvere domestica (HDM) è stata misurata nel BAL e siero mediante saggio ELISA.

Isolamento del polmone e analisi istologica

I lobi polmonari sinistri sono stati fissati in formalina seguita da incorporazione in paraffina, sezionamento, e colorazione con ematossilina ed eosina e PAS. L'assegnazione del punteggio istologico successiva è stata eseguita in cieco come segue: Cinque campi visivi casuali per campione sono stati valutati per infiammazione (infiltrazione peribronchiale e infiltrazione perivascolare) e produzione di muco. L'infiltrazione infiammatoria è stata valutata con il seguente sistema di classificazione:

0 - normale

1 - infiltrati infiammatori lievi

2 - infiltrati infiammatori moderati

3 - infiltrati infiammatori marcati

4 - infiltrati infiammatori gravi

5 - infiltrati infiammatori molto gravi

In ciascun campo visivo, le vie aeree sono state misurate in termini di dimensioni e sono stati quantificati i numeri di cellule nel muco/um.

Misurazione dei mediatori dell'infiammazione nel tessuto polmonare

Lobi polmonari destri (tutti i lobi rimanenti) isolati per la quantificazione dei mediatori dell'infiammazione sono stati sottoposti a congelamento rapido per la successiva misurazione di CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 e CCL5 mediante saggio in multiplo disponibile in commercio (Merck-Millipore). L'analisi è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore.

Risultati e analisi

I risultati degli esperimenti sono mostrati in Figure 27-45.

A supporto dei risultati descritti in Esempio 1, l'analisi degli infiltrati cellulari nel tessuto polmonare dei topi trattati con ceppo 830 ha mostrato una riduzione notevole e statisticamente significativa del punteggio di infiammazione medio (si vedano Figure 31 e 33).

Sono stati analizzati i livelli di anticorpi nel liquido di BAL e siero (si vedano Figure 27-30). Non è stato osservato alcun chiaro effetto del trattamento batterico sui livelli di anticorpi nel siero. Questo può riflettere un fallimento nell'esperimento, poiché la distribuzione dei dati e le barre di errore per ciascun trattamento sono grandi, e i controlli positivi e negativi non sembrano essersi comportati come ci si sarebbe aspettato. Inoltre, i livelli di anticorpi nel siero al basale potrebbero aver mascherato qualsiasi variazione.

Analogamente, non è stato osservato alcun chiaro effetto del trattamento batterico sui livelli di citochine nel tessuto polmonare (si vedano Figure 35-45). Di nuovo, ciò potrebbe riflettere un fallimento nell'esperimento, poiché la dispersione dei dati e le barre di errore per ciascun trattamento sono grandi, e i controlli positivi e negativi non sembrano essersi comportati come ci si sarebbe aspettato. È inoltre possibile che il meccanismo d'azione coinvolto influenzi le risposte iniziali delle citochine che non erano più rivelabili al Giorno 4 dopo la stimolazione finale delle vie aeree con HDM. È necessario prestare attenzione quando si interpretano i dati sulle citochine nel presente studio, a causa della variabilità dei livelli rilevata. Questa variabilità potrebbe in parte essere spiegata dal fatto che il tessuto polmonare è stato separato per le diverse analisi, e quindi un lobo

polmonare potrebbe non essere stato pienamente rappresentativo o confrontabile con lo stesso lobo in altri topi a causa della distribuzione irregolare dell'inflammazione.

Esempio 5 – Analisi aggiuntiva dell'effetto di inoculi batterici nel modello di topo di asma neutrofila grave

I topi provati in Esempio 2 sono stati sottoposti ad analisi aggiuntive per caratterizzare inoltre l'effetto delle composizioni dell'invenzione sulla risposta neutrofila associata ad asma grave.

Materiali e metodi

Rimozione di organi al giorno 18. Prelievo del lobo polmonare sinistro in formalina per analisi istologica di prosecuzione. Raccolta dei lobi polmonari destri (tutti i lobi rimanenti) e rimozione del siero per congelamento rapido e analisi di prosecuzione. Il liquido di BAL rimanente è stato sottoposto a congelamento rapido per analisi di prosecuzione.

Misurazione dei mediatori dell'inflammazione nel tessuto polmonare (analisi di prosecuzione). Lobi polmonari destri (tutti i lobi rimanenti) isolati per quantificazione dei mediatori dell'inflammazione sono stati sottoposti a congelamento rapido per la successiva misurazione di IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa, IL-17F, IL-23 e IL-33 mediante saggio in multiplo disponibile in commercio (Merck-Millipore). L'analisi è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore.

Misurazione dei livelli di anticorpi nel siero e liquido di BAL (analisi di prosecuzione). La produzione di anticorpi IgG1 e IgG2a specifici per l'acaro della polvere domestica (HDM) è stata misurata nel BAL e siero mediante saggio ELISA.

Isolamento del polmone e analisi istologica (analisi di prosecuzione). I lobi polmonari sinistri sono stati fissati in formalina seguita da incorporazione in paraffina, sezionamento, e colorazione con ematossilina ed eosina e PAS. L'assegnazione del punteggio istologico successiva è stata eseguita in cieco come segue: Cinque campi visivi casuali per campione sono stati valutati per inflammazione (infiltrazione peribronchiale e infiltrazione perivascolare) e produzione di muco. L'infiltrazione infiammatoria è stata valutata con il seguente sistema di classificazione:

0 - normale

- 1 - infiltrati infiammatori lievi
- 2 - infiltrati infiammatori moderati
- 3 - infiltrati infiammatori marcati
- 4 - infiltrati infiammatori gravi
- 5 - infiltrati infiammatori molto gravi

Risultati e analisi

I risultati degli esperimenti sono mostrati in Figure 46-63.

In relazione ai livelli di citochine, come per Esempio 4, la dispersione dei dati e le barre di errore per ciascun trattamento sono grandi, e i controlli positivi e negativi non sembrano essersi comportati come ci si sarebbe necessariamente aspettato. È inoltre possibile che il meccanismo d'azione implichi l'influenza di risposte iniziali delle citochine che non erano più rivelabili al giorno 4 dopo la stimolazione finale delle vie aeree con HDM. È necessario prestare attenzione quando si interpretano i dati sulle citochine nel presente studio, a causa della variabilità dei livelli rilevata. Questa variabilità potrebbe in parte essere spiegata dal fatto che il tessuto polmonare è stato separato per le diverse analisi, e quindi un lobo polmonare potrebbe non essere stato pienamente rappresentativo o confrontabile con lo stesso lobo in altri topi a causa della distribuzione irregolare dell'infiammazione. Nonostante questa variabilità, è stato dimostrato un chiaro effetto antinfiammatorio sui livelli di citochine per il ceppo 830, e il controllo positivo con Ab anti-IL-17 si è generalmente comportato come atteso.

Con gli avvertimenti di cui sopra, i dati in Figura 53 suggeriscono che il trattamento con il ceppo 830 può ottenere una riduzione dei livelli di TNF- α , che può essere indicativa di un meccanismo d'azione correlato ad influenze sul rilascio di chemiochine (e quindi reclutamento di cellule) da parte di cellule immunitarie stromali o innate. TNF- α fa parte della via di Th17. Prendendo insieme questa serie di dati, si può concludere che il ceppo 830 aveva un effetto benefico sul meccanismo di infiammazione in questo modello di topo di asma neutrofila grave.

Esempio 6 – Efficacia di inoculi batterici in un modello di topo di sclerosi multipla

Sommario

Ai topi sono state somministrate composizioni comprendenti ceppi batterici secondo l'invenzione e i topi sono stati successivamente immunizzati con glicoproteina oligodendrocitica della mielina per indurre encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE). EAE è il modello sperimentale più comunemente usato per la sclerosi multipla umana. È stato osservato che le composizioni dell'invenzione hanno un effetto sorprendente sull'incidenza della malattia e gravità della malattia.

Ceppo

830: batterio depositato con numero di collocazione NCIMB 43281

Disegno dello studio

Gruppi:

1. Gruppo di controllo negativo. Trattamento con controllo di veicolo (per via orale).
4. Trattamento con ceppo 830 di inoculo di batteri terapeutici (per via orale).
9. Gruppo di controllo positivo. Trattamento con Desametasone (i.p.).
10. Gruppo di controllo non trattato.

Numero di topi per gruppo = 10

Giorni -14 fino a giorno 27: Somministrazione quotidiana di controllo con veicolo per via orale (Gruppo 1).

Giorni -14 fino a giorno 27: Somministrazione quotidiana di inoculo di batteri terapeutici per via orale (Gruppo 4).

Giorni 0-28: Somministrazione di Desametasone (i.p.) tre volte a settimana (Gruppo 9)

Giorno 0: MOG35-55 (glicoproteina oligodendrocitica della mielina - 2mg/ml) e CFA (2mg/ml di MTB) sono stati miscelati 1:1 risultando in soluzioni da 1mg/ml. 100µl della miscela di peptide-CFA sono stati iniettati per via sottocutanea in ciascuna zampa posteriore. Somministrazione di tossina della pertosse per via intraperitoneale (300ng).

Giorno 1: Somministrazione di tossina della pertosse per via intraperitoneale (300ng).

Giorni 7-in poi: Misurazione dell'incidenza della malattia e peso tre volte a settimana.

Punti di esito finali e analisi

I topi sono stati analizzati per incidenza della malattia e gravità della malattia tre volte a settimana. L'assegnazione del punteggio è stata eseguita in cieco. La gravità della malattia è stata valutata usando un punteggio clinico che variava da 0 a 5, con 5 che indicava un topo morto (si veda sistema di assegnazione del punteggio clinico di seguito).

Monitoraggio

Nei giorni indicati i topi sono stati pesati e osservati per il punteggio di attività della malattia e incidenza della malattia.

Osservazioni sul punteggio dell'attività di malattia:

- 0 - Nessuna variazione evidente nella funzione motoria rispetto a topi non immunizzati.
- 0,5 - La punta della coda è molle.
- 1,0 - Coda molle.
- 1,5 - Coda molle e inibizione delle zampe posteriori.
- 2,0 - Coda molle e debolezza delle zampe posteriori.
 OPPURE - Vi sono segni evidenti di inclinazione della testa quando si osserva la camminata. L'equilibrio è scarso.
- 2,5 - Coda molle e trascinamento delle zampe posteriori.
 - OPPURE - Vi è una forte inclinazione della testa che fa sì che il topo cada occasionalmente.
- 3,0 - Coda molle e paralisi completa delle zampe posteriori.
- 3,5 - Coda molle e paralisi completa delle zampe posteriori.

In aggiunta a: Il topo si muove intorno alla gabbia, ma quando è posizionato su un lato, non è in grado di raddrizzarsi.

Le zampe posteriori sono unite su un lato del corpo.

- 4,0 - Coda molle, paralisi completa delle zampe posteriori e parziale delle zampe anteriori.
- Il topo si sposta in maniera minima intorno alla gabbia ma appare vigile e si nutre
- 4,5 - Paralisi completa delle zampe posteriori e parziale di quelle anteriori, nessun movimento intorno alla gabbia.
- Il topo viene immediatamente sottoposto ad eutanasia e rimosso dalla gabbia.
- 5,0 Il topo viene sottoposto ad eutanasia a causa di paralisi grave.

Quando un animale ha un punteggio di attività della malattia pari o superiore a 1, si considera che abbia un punteggio positivo di incidenza della malattia.

Risultati

I risultati dello studio sono mostrati in Figure 70 e 71.

L'induzione della malattia nei gruppi di controllo negativo è stata efficace con i punteggi alti mostrati dal controllo con veicolo e dal controllo non trattato. L'effetto del trattamento con ceppo 830 era sorprendente e i topi trattati con ceppo 830 hanno mostrato un'incidenza della malattia e gravità della malattia ridotte. In effetti, la riduzione dell'incidenza della malattia e gravità della malattia era confrontabile con il gruppo di controllo positivo. Questi dati indicano che ceppo 830 può essere utile per trattare o prevenire la sclerosi multipla.

Esempio 7 – Efficacia degli inoculi batterici in un modello di topo di uveite

Sommario

Questo studio ha usato un modello di topo di uveite indotta da proteina legante i retinoidi interfotorecettori (IRBP) per provare gli effetti della somministrazione batterica sull'uveite. L'uveite è una condizione pericolosa per la vista derivante dall'infiammazione intraoculare e distruzione del tessuto retinico. Questa malattia può essere studiata nei roditori in un modello di uveoretinite autoimmune sperimentale (EAU) [70]. EAU è un disturbo specifico dell'organo in cui cellule Th1/Th17 sono dirette verso gli antigeni della retina e producono citochine che attivano le cellule mononucleate residenti e infiltranti portando alla distruzione dei tessuti. EAU

può essere indotta nei topi mediante stimolazione con antigeni retinici incluso un peptide della proteina legante i retinoidi interfotorecettori (IRBPp). L'insorgenza della malattia si verifica normalmente dal giorno 8-9 e i picchi dopo i giorni 14-15. I segni della malattia clinica possono essere monitorati usando acquisizione topica endoscopica delle immagini del fondo oculare (TEFI).

Ceppo

MRX008: *Blautia wexlerae*, batteri depositati con numero di collocazione NCIMB 42486.

L'agente bioterapeutico è stato fornito in soluzioni madre di glicerolo. Terreni di crescita microbiologici (YCFA) sono stati usati per la coltura dell'agente.

Topi

I topi erano di ceppo C57BL/6 e avevano più di 6 settimane di età all'inizio dello studio. Sono stati usati 72 topi (+ 36 animali satellite). Animali non sani sono stati esclusi dallo studio. Gli animali sono stati alloggiati in condizioni specifiche prive di patogeni (spf), in una stanza di mantenimento monitorata con termostato ($22 \pm 4^\circ\text{C}$). Gli animali sono stati lasciati acclimatarsi nelle condizioni standard degli animali per almeno una settimana prima dell'uso. Lo stato di salute degli animali è stato monitorato durante tutto questo periodo e l'idoneità di ciascun animale per uso sperimentale è stata valutata prima dell'inizio dello studio. I topi sono stati alloggiati in gruppi fino a 10 animali per gabbia per la durata dello studio. Dieta irradiata con *pellet* (Lab diet, dieta EU Rodent 22%, 5LF5) e acqua erano disponibili *ad libitum* durante i periodi di acclimatazione e studio. È improbabile che qualsiasi componente della dieta o acqua abbia interferito con lo studio.

Descrizione dell'esperimento

Topi C57BL/6 femmine adulte sono stati assegnati in modo casuale ai gruppi sperimentali e sono stati lasciati acclimatarsi per una settimana. I trattamenti sono stati somministrati secondo il programma di seguito. Al Giorno 0, agli animali è stata somministrata un'emulsione contenente 200 μg di peptide 1-20 di proteina legante i retinoidi interfotorecettori (IRBP p1-20) in coadiuvante completo di Freund (CFA) integrato con 2,5 mg/ml di *Mycobacterium Tuberculosis* H37 Ra mediante iniezione sottocutanea. Sempre al Giorno 0, agli animali sono stati somministrati 1,5 μg di tossina di *Bordetella Pertussis* mediante iniezione intraperitoneale. Dal Giorno -14,

gli animali vengono pesati tre volte alla settimana. Dal Giorno -1 fino alla fine dell'esperimento al Giorno 42, gli animali vengono monitorati due volte alla settimana per segni clinici di uveite usando acquisizione topica endoscopica delle immagini del fondo oculare (TEFI).

Programma di somministrazione

Tutti i Gruppi sono n = 12

Il veicolo per la somministrazione orale è terreno YCFA.

Il volume di somministrazione per la somministrazione orale due volte al giorno è di 5 ml/kg.

<i>Gruppo</i>	<i>Trattamento</i>	<i>Dose</i>	<i>Via</i>	<i>Frequenza</i>	<i>Induzione della malattia</i>
1	Veicolo	5 ml/kg	P.O.	BID Giorno -14-Fine	Giorno 0: IRBP/CFA, S.C. Giorno 0: PTx, I.P.
2	MRX008	5 ml/kg			

P.O.: somministrazione orale, *BID:* due volte al giorno, *S.C.:* iniezione sottocutanea, *I.P.:* iniezione intraperitoneale, *IRBP:* proteina legante gli interfotorecettori, *CFA:* coadiuvante completo di Freund, *PTx:* Tossina della pertosse

È stato inoltre provato un gruppo di controllo positivo usando il trattamento con il farmaco ciclosporina A.

Letture

Pesi corporei. Dal Giorno -14, gli animali vengono pesati tre volte a settimana. Gli animali con una perdita di peso corporeo pari o superiore al 15% del loro peso corporeo iniziale (Giorno 0) in due occasioni consecutive vengono abbattuti.

Osservazioni cliniche non specifiche. Dal Giorno -14 fino alla fine dell'esperimento, gli animali vengono esaminati ogni giorno per segni clinici non specifici che includono postura anomala (curvata), condizioni anomale del mantello (piloerezione) e livelli di attività anomali (attività ridotta o aumentata).

Punteggi clinici: Acquisizione di immagini della retina mediante acquisizione topica endoscopica di immagini del fondo oculare (TEFI). Dal Giorno -1 fino alla fine dell'esperimento, gli animali vengono valutati due volte a settimana per segni clinici dell'uveite. Le immagini della retina vengono catturate usando TEFI in animali non anestetizzati ma immobilizzati in seguito a dilatazione della pupilla usando Tropicamide 1% poi

Fenilefrina cloridrato 2,5%. Le immagini della retina sono punteggi che usano il seguente sistema. Il punteggio cumulativo massimo è di 20.

Punteggio	Infiammazione del disco ottico	Vasi retinici	Infiltrazione nel tessuto retinico	Danno strutturale
1	Minima	1-4 manicotti lievi	1-4 piccole lesioni oppure 1 lesione lineare	Lesioni retiniche o atrofia che coinvolgono $\frac{1}{4}$ fino a $\frac{3}{4}$ dell'area retinica
2	Lieve	>4 manicotti lievi o 1-3 manicotti moderati	5-10 piccole lesioni oppure 2-3 lesioni lineari	Atrofia panretinica con piccole lesioni multiple (cicatrici) o ≤ 3 lesioni lineari (cicatrici)
3	Moderata	>3 manicotti moderati	>10 piccole lesioni oppure >3 lesioni lineari	Atrofia panretinica con >3 lesioni lineari o lesioni confluenti (cicatrici)
4	Grave	>1 manicotti gravi	Lesione lineare confluyente	Distacco della retina con ripiegamento
5	Non visibile (sbiancamento o distacco grave)			

Risultati

I risultati dello studio sono mostrati in Figure 72-74.

Proliferazione cellulare (animali satellite, giorno 21). I linfonodi drenanti (DLN) sono stati rimossi e le cellule sono state isolate. Dopo la conta, le cellule sono state coltivate per 72 ore in presenza o assenza di peptide di IRBP. I supernatanti per l'analisi delle citochine sono stati rimossi prima della pulsazione con 3H-timidina. Le cellule sono state poi coltivate per altre 18 ore prima della raccolta e determinazione della proliferazione mediante incorporazione di 3H-timidina usando un contatore di particelle beta.

I gruppi mostravano proliferazione cellulare allo stimolo con IRBP superiore a quella osservata nei pozzetti di controllo con terreno (questi valori di sfondo sono stati sottratti dal risultato di IRBP per fornire i dati come Δ cpm). Entrambi i gruppi hanno dato risposte proliferative forti ad uno stimolo di controllo positivo (anti-CD3/CD28) mostrando che le cellule in coltura erano vitali e in grado di proliferare (dati non mostrati).

Le risposte proliferative al peptide di IRBP sono state analizzate mediante ANOVA a una via seguita da post-test di Dunnett per il confronto delle risposte stimulate nel gruppo sperimentale con il gruppo di controllo.

Le risposte proliferative al peptide di IRBP negli animali di controllo della malattia erano dell'entità attesa per questo modello. Il farmaco di controllo positivo, Ciclosporina A, ha ridotto la proliferazione, sebbene questa riduzione non abbia raggiunto una significatività statistica (Figura 72).

I gruppi di trattamento (incluso il solo veicolo) hanno mostrato una proliferazione non aumentata significativamente al di sopra di quella osservata negli animali di controllo.

Le risposte proliferative al peptide di IRBP sono state analizzate mediante ANOVA a una via seguita da post-test di Dunnett per il confronto delle risposte stimulate nei gruppi di trattamento con il gruppo di veicolo. Non sono state osservate differenze statistiche.

Punteggi clinici: Acquisizione di immagini della retina mediante acquisizione topica endoscopica di immagini del fondo oculare (TEFI). I dati dei punteggi di TEFI misurati nel Gruppo di controllo dal Giorno 0 fino al Giorno 21 sono stati analizzati mediante test di Kruskal-Wallis per dati non parametrici seguito da post-test di Dunn per confronti multipli tra i giorni dell'esperimento.

La somministrazione di IRBP ha indotto un aumento significativo dei punteggi di TEFI misurati dal Giorno 14 ($p < 0,01$) e al Giorno 21 ($p < 0,0001$) rispetto al Giorno 0 nel Gruppo di controllo (Figura 73).

I dati dei punteggi di TEFI misurati in tutti i gruppi sperimentali al Giorno 21 sono stati analizzati mediante test di Kruskal-Wallis per dati non parametrici seguito da post-test di Dunn per confronti multipli tra gruppi sperimentali.

In questo stadio dell'esperimento, non vi era alcuna differenza significativa tra i gruppi sperimentali, ma i punteggi di TEFI erano più bassi nel gruppo trattato con MRX008 rispetto ai gruppi di controllo negativo. In effetti, i punteggi di TEFI erano più bassi nel gruppo trattato con MRX008 rispetto al gruppo di controllo positivo, trattato con ciclosporina A.

Conclusioni. Risposte proliferative al peptide di IRBP sono state osservate nelle colture di linfonodi da tutti i gruppi sperimentali, esclusi animali mai trattati, indicando un'induzione efficace della malattia. I punteggi clinici

determinati mediante TEFI sono aumentati dal Giorno 14, come attesi in questo modello di uveite indotta da IRBP. Entro il Giorno 21, differenze significative tra i gruppi sperimentali non sono ancora visibili, ma è stata osservata una notevole riduzione dell'incidenza e gravità della malattia nel gruppo trattato con MRX008, che era una riduzione maggiore di quella osservata per il gruppo di controllo positivo. In particolare, questi dati indicano che il trattamento con il ceppo MRX008 ha ridotto il danno alla retina, infiammazione del disco ottico e/o infiltrazione nel tessuto retinico da parte di cellule infiammatorie (si veda il sistema di assegnazione dei punteggi per l'acquisizione di immagini della retina tramite TEFI sopra). Questi dati indicano che il ceppo MRX008 può essere utile per trattare o prevenire l'uveite.

Esempio 8 – Efficacia degli inoculi batterici di MRX006 in un modello di infiammazione indotta da LPS – concentrazione di citochine ridotta

Sommario

Il ceppo batterico MRX006 (830) è stato provato in un saggio antinfiammatorio (n=9) per determinare il suo effetto sulle concentrazioni di citochine. L'infiammazione è stata indotta usando un fattore scatenante ben consolidato della risposta infiammatoria, il lipopolisaccaride (LPS). L'entità e caratteristiche della risposta infiammatoria nei gruppi trattati con MRX006 (830) sono state confrontate con i gruppi di controllo. È stato osservato che le composizioni dell'invenzione alleviano la risposta infiammatoria, e in particolare riducono la concentrazione delle citochine IL-6 e TNF α . I dati indicano pertanto che le composizioni dell'invenzione hanno un fenotipo infiammatorio ampio e possono essere utili per trattare malattie infiammatorie, come neutrofilia e asma.

Risultati e analisi

I risultati dell'esperimento sono mostrati in Figure 75 e 76.

Come mostrata in Figure 75 e 76, rispettivamente, la somministrazione di LPS causa un aumento dei livelli di IL-6 e TNF α , come ci si aspetterebbe dopo l'induzione dell'infiammazione. In maniera importante, i livelli di queste citochine sono significativamente ridotti nei gruppi trattati con MRX006 (830). Pertanto, le composizioni

dell'invenzione riducono la concentrazione di citochine infiammatorie e pertanto hanno un fenotipo antinfiammatorio ampio.

Esempio 9 – Efficacia degli inoculi batterici di MKX006 in un modello di infiammazione indotta da LPS – ridotta maturazione di cellule dendritiche derivate dai monociti (Mo-DC)

Sommario

Il ceppo batterico MRX006 (830) è stato provato in un saggio antinfiammatorio che implicava il rilevamento dell'entità della maturazione di cellule dendritiche derivate dai monociti (Mo-DC). Queste cellule, in particolare le cellule CD1a+ CD14- come usate in questo esempio, sono coinvolte nella risposta infiammatoria in seguito alla maturazione. La maturazione di cellule CD1a+ CD14- è indicata dalla loro espressione aumentata di CD80, CD83, CD86 e HLA-DR. È stato osservato che le composizioni dell'invenzione alleviano la risposta infiammatoria, e in particolare riducono la maturazione delle cellule dendritiche associate alla risposta infiammatoria (CD1a+ CD14-). I dati indicano pertanto che le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare le malattie infiammatorie, come neutrofilia e asma.

Risultati e analisi

I risultati dell'esperimento sono mostrati in Figura 77.

Come mostrata in Figura 77, la somministrazione di LPS causa un aumento dell'espressione dei marcatori di maturazione sulle MoDC, come indicato dallo spostamento della linea nera a destra del grafico. In maniera importante, il livello di espressione dei marcatori di maturazione è ridotto nel gruppo di LPS trattato con MRX006 (come indicato dallo spostamento della linea nera piena a sinistra). Per il gruppo di LPS+MRX006, il livello di espressione dei marcatori dell'infiammazione CD80, CD83 e HLA-DR ritorna al livello di espressione nel controllo non stimolato (linea tratteggiata). Inoltre, anche il livello di espressione di CD86 nel gruppo di LPS+MRX006 è notevolmente ridotto rispetto al gruppo con solo LPS. Pertanto, le composizioni dell'invenzione riducono il livello di maturazione delle MoDC associate all'infiammazione, e pertanto hanno un fenotipo antinfiammatorio ampio.

Esempio 10 - Efficacia degli inoculi batterici in un modello di topo di modello di infiammazione indotta da ovalbumina - divisione di cellule CD4+ ridotta

Sommario

Il ceppo batterico MRX006 (830) è stato provato in un saggio infiammatorio aggiuntivo (n=5) che implicava il rilevamento del livello di cellule CD4+. Livelli di cellule CD4+ aumentati è un indicatore di infiammazione. Una delle ragioni per ciò è che le cellule CD4+ sono coinvolte nelle vie infiammatorie di Th17 e IL-17. L'infiammazione è stata indotta usando un fattore scatenante consolidato della risposta infiammatoria, ovalbumina. È stato osservato che le composizioni dell'invenzione alleviano la risposta infiammatoria, e in particolare riducono il numero di cellule CD4+. I dati indicano pertanto che le composizioni dell'invenzione possono essere utili per trattare malattie infiammatorie, come neutrofilia e asma.

Risultati e analisi

I risultati dell'esperimento sono mostrati in Figura 78.

Come mostrato in Figura 78, il numero di cellule CD4+ nella popolazione che è sottoposta a tre o più divisioni cellulari aumenta dopo la stimolazione con ovalbumina (come ci si aspetterebbe in seguito ad una risposta infiammatoria). In maniera fondamentale, il numero di cellule che sono sottoposte a tre o più divisioni dopo la stimolazione con ovalbumina è significativamente ridotto nei gruppi trattati con MRX006. Pertanto, le composizioni dell'invenzione riducono i livelli di cellule CD4+ e pertanto, l'invenzione può essere utile per trattare malattie infiammatorie, come neutrofilia e asma.

Esempio 11 – Prova di stabilità

Una composizione descritta nella presente contenente almeno un ceppo batterico descritto nella presente viene conservata in un contenitore sigillato a 25°C o 4°C e il contenitore viene posto in un'atmosfera avente il 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% di umidità relativa. Dopo 1 mese, 2 mesi, 3 mesi, 6 mesi, 1 anno, 1,5 anni, 2 anni, 2,5 anni o 3 anni, dovrà rimanere almeno il 50%, 60%, 70%, 80% o 90% del ceppo batterico come misurato in unità formanti colonie determinate mediante protocolli standard.

Sequenze

SEQ. ID. N.: 1 (gene di 16S RNA ribosomiale di *Blautia stercoris* ceppo GAM6-1, sequenza parziale -

HM626177)

```

1  tgcaagtoga gcaagcgcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  ggggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccgggtgg
181 tatgagatgg acccgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggccac caagcgcagc
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaatttgca caatggggga aaccctgatg cagcgcagcc
361 gcggtgaagga agaagtatct cggatgtaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag
601 gtaagcggaa ttcttagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggt
661 gaaggcggtc tactggacggt taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg ggagcaaagc
781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt taattcgaag
901 caacgcgaag aaccttacc agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaacctt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcgtgtc gtgagatggt
1021 ggggttaagt ccgcaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcagagcc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaaatcgt agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccc
1321 ggtcttgtag acaccgcccg tcacacccat ggagtcagta acgcccgaag tc

```

SEQ. ID. N.: 2 (sequenza di consenso di 16S rRNA per *Blautia stercoris* ceppo 830)

```

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGCGCGGCGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGATAACA
GTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
GGACCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACCTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG
TACCTGACTAAGAAGCCCGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
ACTGGGTGTAAGGGAGCGTAGACGGAAAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
AAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGAGCAAACGCAA
TAAGTATTCACCTGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTGTAATGGAACCTT
TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAA

```

CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCGGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCGCCGTAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

SEQ. ID. N.: 3 (gene di 16S RNA ribosomiale di *Blautia wexlerae* ceppo WAL 14507, sequenza parziale - EF036467)

1 caagtcgaac ggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtgggat
 181 aagatggacc cgcgttggat tagcttgttg gtgggtaac ggcccaccaa ggcgacgac
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggaggcag cagtgggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcgcg
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca ggaagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcy gtaatacgta gggggcaagc
 481 gttatccgga ttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
 601 agcggaaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
 661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgcaaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
 901 acgcaagaa ccttaccag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatcttcc
 961 ttcgggacag gcgagacag tgggtcatgg ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcy caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggact
 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaa tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
 1201 agatggagca aatccccaaa ataactgcc agttcggact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgcc cgtgaaatc gttccccggg
 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
 1381 tgcaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

SEQ. ID. N.:4 (sequenza di consenso di 16S rRNA per *Blautia wexlerae* ceppo MRX008)

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTTAT
 ACAGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
 CGTTATCCGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTAAAGGCATGGGCTCAACCT

GTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNNGGGGAGCATGGCTCT
TCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCCTACCAAGTCTTGACATCC
GCCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTC
TGGGAGACTGCCAGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAAATAACGTCCCA
GTTTCGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCTAACT
GCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ. ID. N.: 5 (sequenza cromosomica di ceppo 830) – si veda elenco delle sequenze elettronico di
WO2016/203218.

SEQ. ID. N.: 6 (sequenza plasmidica di ceppo 830) - si veda elenco delle sequenze elettronico di
WO2016/203218.

RIFERIMENTI

- [1] Spor *et al.* (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg *et al.* (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan *et al.* (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang *et al.* (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin e Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl. 2:S96-100.
- [15] Azad *et al.* (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Liu *et al.* (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [17] Park *et al.* (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt. 4):776-9.
- [18] Liu *et al.* (2008) *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt. 8):1896-902.
- [19] Masco *et al.* (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
- [20] Srůtková *et al.* (2011) *J. Microbiol. Methods,* 87(1):10-6.
- [21] Ye *et al.* (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
- [22] Fabro *et al.* (2015) *Immunobiology.* 220(1):124-35.
- [23] Yin *et al.* (2014) *Immunogenetics.* 66(3):215-8.
- [24] Cheluvappa *et al.* (2014) *Clin Exp Immunol.* 175(2):316-22.

- [25] Schieck *et al.* (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):888-91.
- [26] Balato *et al.* (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
- [27] Monteleone *et al.* (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- [28] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6:256-259
- [29] Miossec e Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
- [30] Yang *et al.* (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.
- [31] Koenders *et al.* (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
- [32] Amedei *et al.* (2012) *Int J Mol Sci.* 13(10):13438-60.
- [33] Shabgah *et al.* (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
- [34] Zhang (2015) *Inflammation.* 23 Ago.
- [35] Sun *et al.* (2015) *Cytokine.* 74(1):76-80.
- [36] Mucientes *et al.* (2015) *Br J Ophthalmol.* 99(4):566-70.
- [37] Jawad *et al.* (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21(6):434-9.
- [38] Maya *et al.* (2014) *J. Ophthalmology.* 310329
- [39] Chi *et al.* (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119(5):1218-1224.
- [40] Chi *et al.* (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49(7): 3058-3064.
- [41] Luger e Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143.
- [42] Numasaki *et al.* (2003) *Blood.* 101:2620-2627.
- [43] Zhang *et al.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 533-537.
- [44] Karin (2006) *Nature.* 441: 431-436.
- [45] Faghieh *et al.* (2013). *Iranian Journal of Immunology.* 10(4):193-204.
- [46] Numasaki *et al.* (2005) *J. Immunol.* 175: 6177-6189
- [47] Hammerich e Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol.* 7:297-306.
- [48] Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9-24.
- [49] Cryopreservation e Freeze-Drying Protocols, a cura di Day e McLellan, Humana Press.

- [50] Leslie *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [51] Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [52] Kailasapathy *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [53] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2a Edizione, (1994), a cura di A Wade e PJ Weller
- [54] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro curatore 1985)
- [55] *Handbook of Microbiological Media, Quarta Edizione* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [56] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [57] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [58] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 20a edizione, ISBN: 0683306472.
- [59] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, curatori, 1998, Academic Press).
- [60] *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan, curatori, Academic Press, Inc.)
- [61] *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. I-IV (D.M. Weir e C.C. Blackwell, curatori, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [62] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edizione (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [63] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. curatore, CRC Press, 1997)
- [64] Ausubel *et al.* (curatori) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5a edizione (Current Protocols).
- [65] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2a ed. (Newton & Graham curatori, 1997, Springer Verlag)
- [66] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, curatori, 1987) Supplemento 30
- [67] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [68] Brand *et al.* (2007) *Nature Protocols.* 2(5):1269-1275
- [69] Jiao *et al.* (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases.* 184(4):1085-93.
- [70] Caspi (2003) *Curr Protoc Immunol.* Capitolo 15:Unità 15.6.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente un ceppo batterico della specie *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*, per uso in un metodo per trattare o prevenire una malattia infiammatoria o autoimmune.
2. Composizione per l'uso della rivendicazione 1, in cui la composizione è per uso in un metodo per trattare o prevenire una malattia o condizione scelta dal gruppo costituito da asma, come asma allergica o asma neutrofila; artrite, come artrite reumatoide, osteoartrite, artrite psoriasica, o artrite idiopatica giovanile; sclerosi multipla; neuromielite ottica (malattia di Devic); spondilite anchilosante; spondiloartrite; psoriasi; lupus eritematoso sistemico; malattia infiammatoria intestinale, come morbo di Crohn o colite ulcerosa; celiachia; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); uveite; sclerite; vasculite; malattia di Behçet; aterosclerosi; dermatite atopica; enfisema; parodontite; rinite allergica; e rigetto di allotrapianto.
3. Composizione per l'uso della rivendicazione 2; in cui (i) la composizione è per uso in un metodo per trattare o prevenire l'asma, come asma neutrofila o asma allergica, e in cui la composizione è per uso in un metodo per ridurre la neutrofilia o eosinofilia nel trattamento dell'asma; oppure in cui (ii) la composizione è per uso in un metodo per trattare o prevenire l'artrite reumatoide, e in cui la composizione è per uso in un metodo per ridurre il gonfiore articolare nell'artrite reumatoide; oppure in cui (iii) la composizione è per uso in un metodo per trattare o prevenire la sclerosi multipla, e la composizione è per uso in un metodo per ridurre l'incidenza o gravità della malattia; oppure in cui (iv) la composizione è per uso in un metodo per trattare o prevenire l'uveite, e la composizione è per uso in un metodo per ridurre o prevenire il danno alla retina nell'uveite.
4. Composizione per l'uso di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la composizione è per uso in un metodo per ridurre la produzione di IL-17 o ridurre la differenziazione di cellule Th17 nel trattamento o prevenzione della malattia infiammatoria o autoimmune.
5. Composizione per l'uso di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la composizione è per uso in un paziente con livelli elevati di IL-17 o cellule Th17.

6. Composizione per l'uso di qualsiasi delle rivendicazioni 1-5; in cui (a) il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% alla sequenza di 16s rRNA di un ceppo batterico di *Blautia stercoris*; oppure in cui (b) il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 1 o 2; in cui secondo (b), preferibilmente il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 2, oppure il ceppo batterico ha la sequenza di 16s rRNA rappresentata da SEQ. ID. N.: 2.
7. Composizione per l'uso di qualsiasi delle rivendicazioni 1-5; in cui (a) il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% alla sequenza di 16s rRNA di un ceppo batterico di *Blautia wexlerae*; oppure in cui (b) il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 3 o 4; in cui secondo (b), preferibilmente il ceppo batterico ha una sequenza di 16s rRNA che è identica almeno al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% a SEQ. ID. N.: 4, oppure il ceppo batterico ha la sequenza di 16s rRNA rappresentata da SEQ. ID. N.: 4.
8. Composizione per l'uso di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la composizione è per somministrazione orale; e/o in cui la composizione comprende uno o più eccipienti o veicoli accettabili farmaceuticamente; e/o in cui il ceppo batterico è liofilizzato.
9. Prodotto alimentare o composizione di vaccino comprendente la composizione di qualsiasi rivendicazione precedente, per l'uso di qualsiasi rivendicazione precedente.
10. Cellula del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381; oppure una composizione comprendente detta cellula, opzionalmente in cui la composizione comprende un veicolo o eccipiente accettabile farmaceuticamente.
11. Coltura biologicamente pura del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381.

12. Cellula del ceppo di *Blautia stercoris* depositato con numero di collocazione NCIMB 42381, per uso in terapia.
13. Cellula del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486; oppure una composizione comprendente detta cellula, opzionalmente in cui la composizione comprende un veicolo o eccipiente accettabile farmaceuticamente.
14. Coltura biologicamente pura del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486.
15. Cellula del ceppo di *Blautia wexlerae* depositato con numero di collocazione NCIMB 42486, per uso in terapia, opzionalmente in cui la cellula è per uso in un metodo definito in qualsiasi delle rivendicazioni 1-5.

FIG. 1
Total cell counts.

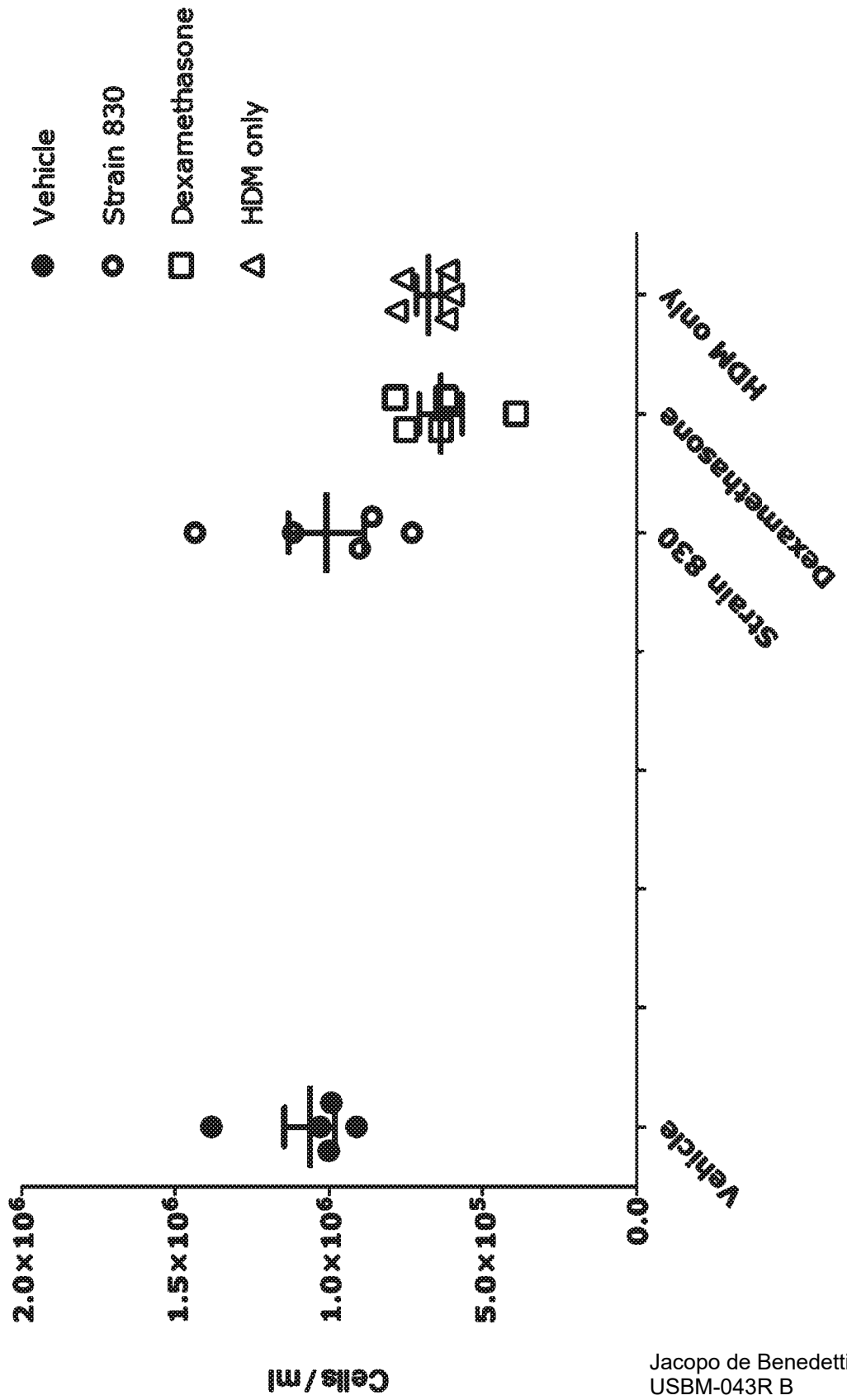


FIG. 2
Total eosinophils.

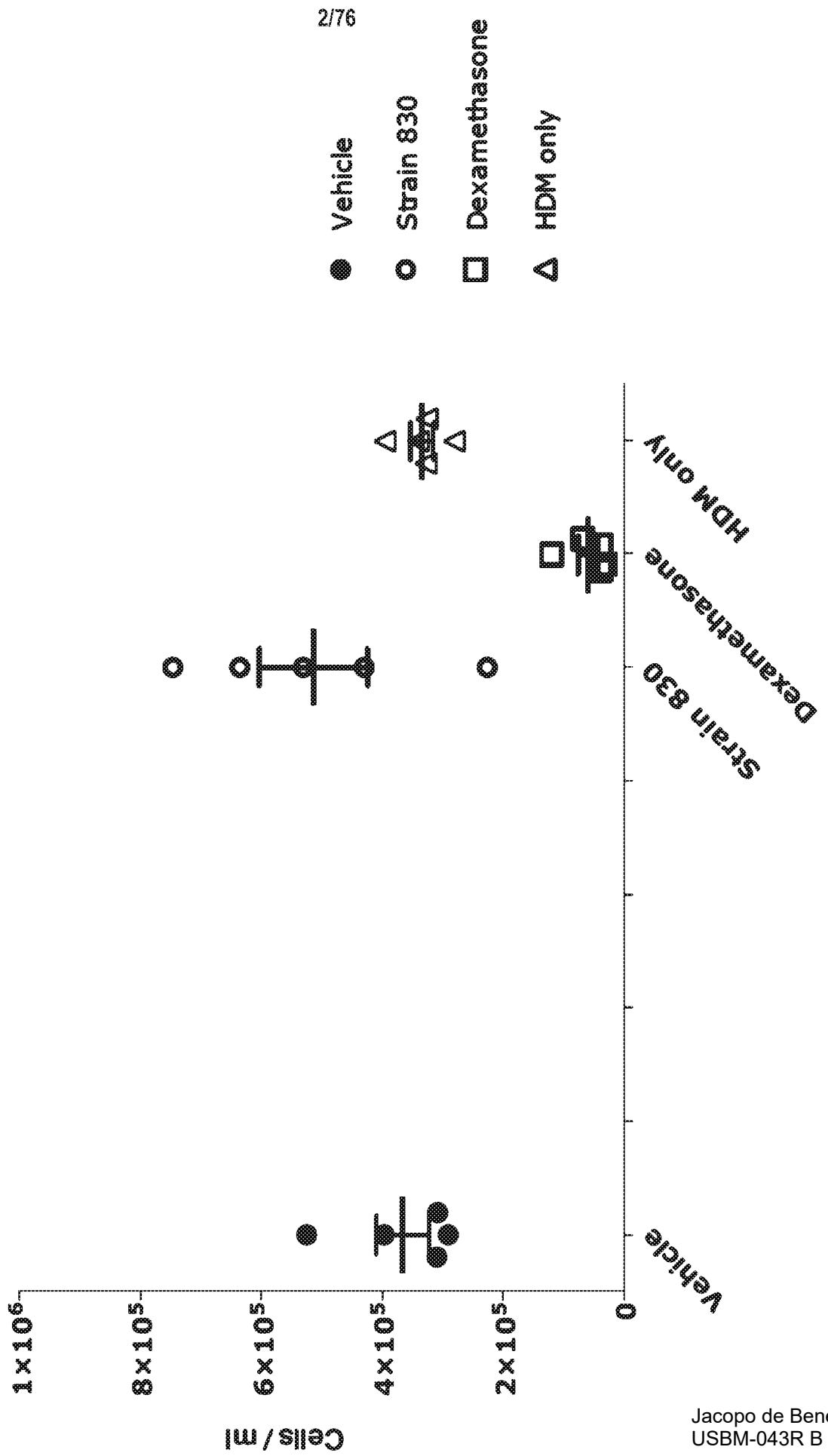


FIG. 3
Eosinophils %.

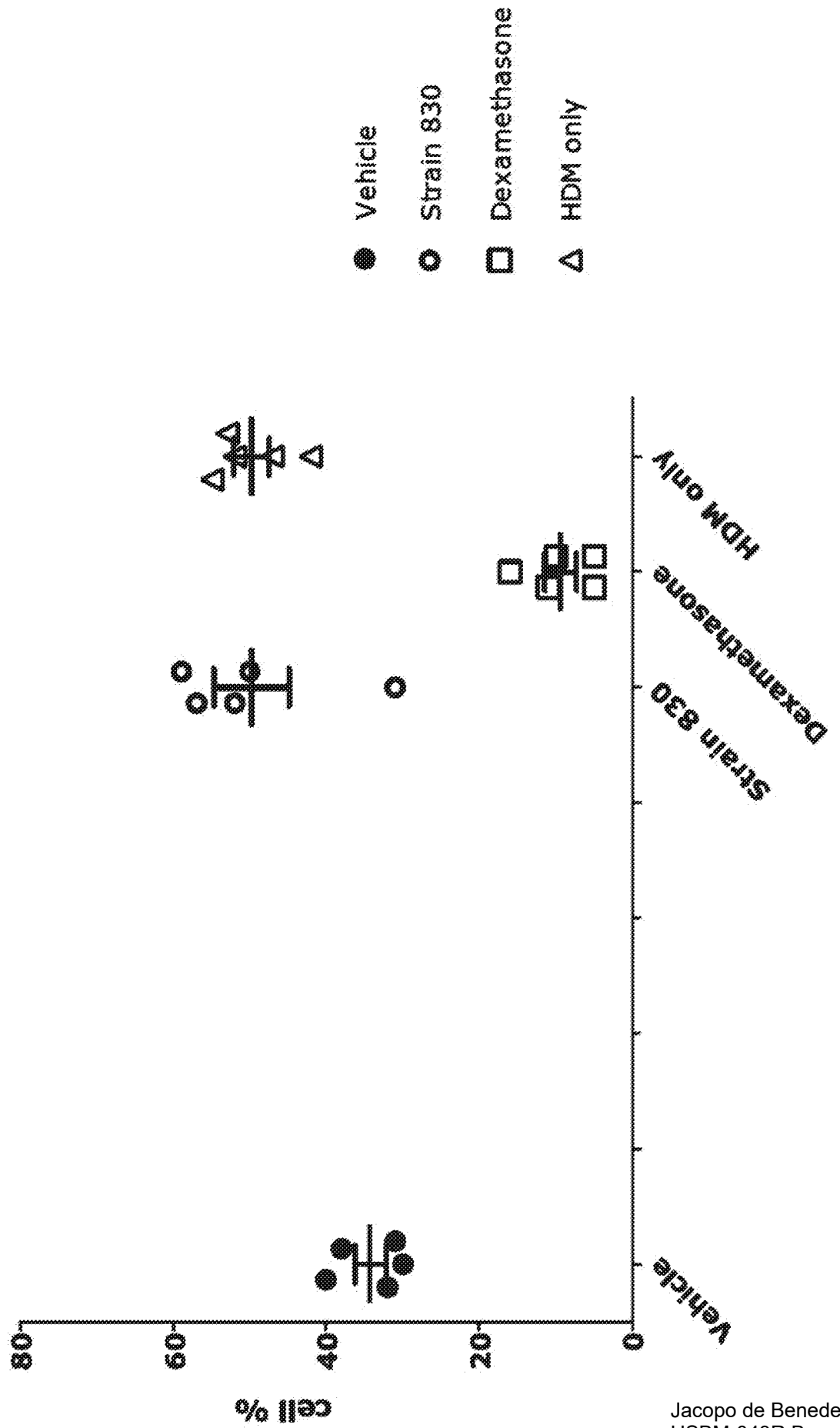


FIG. 4
Total macrophages.

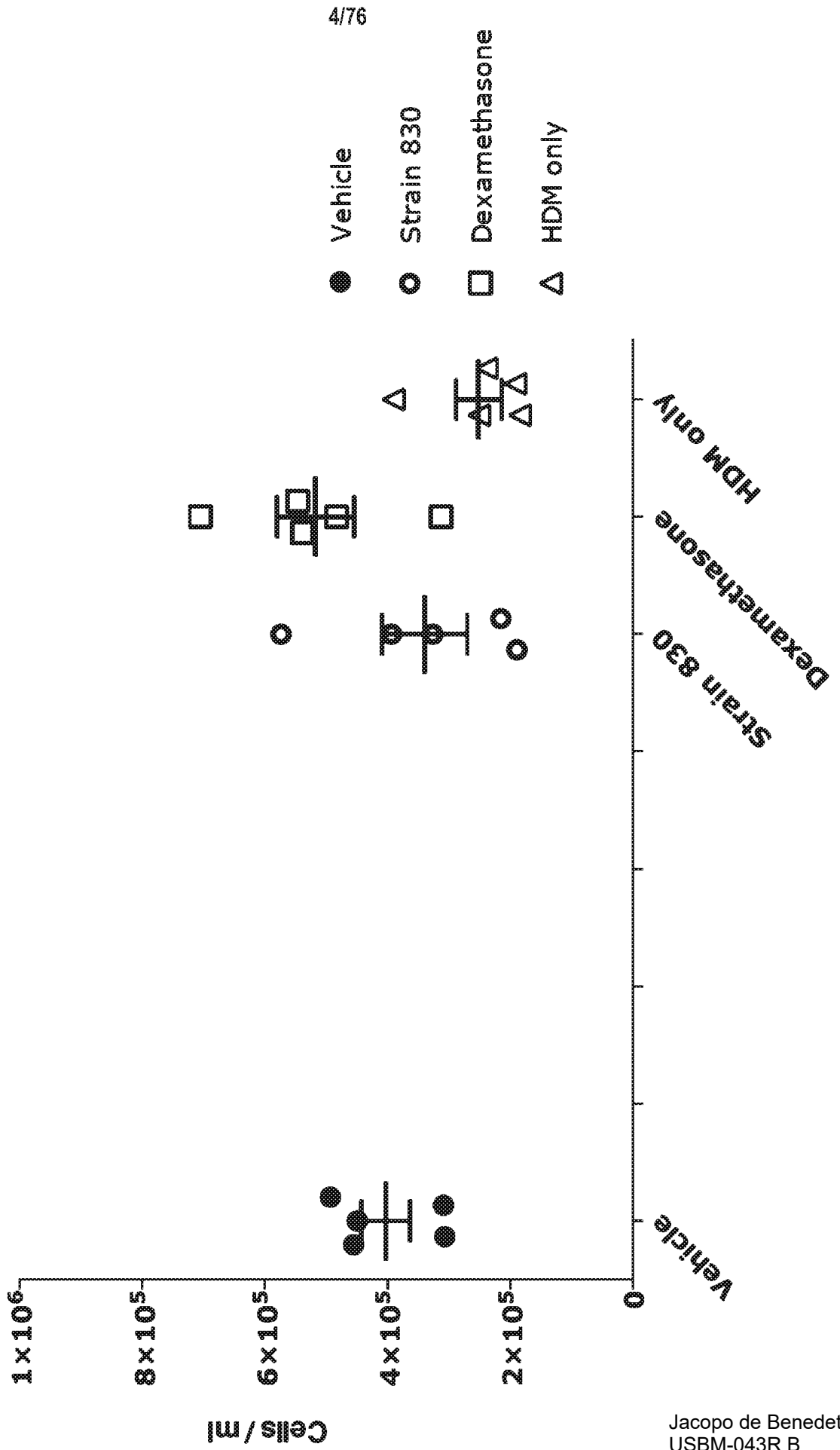


FIG. 5
Macrophages %.

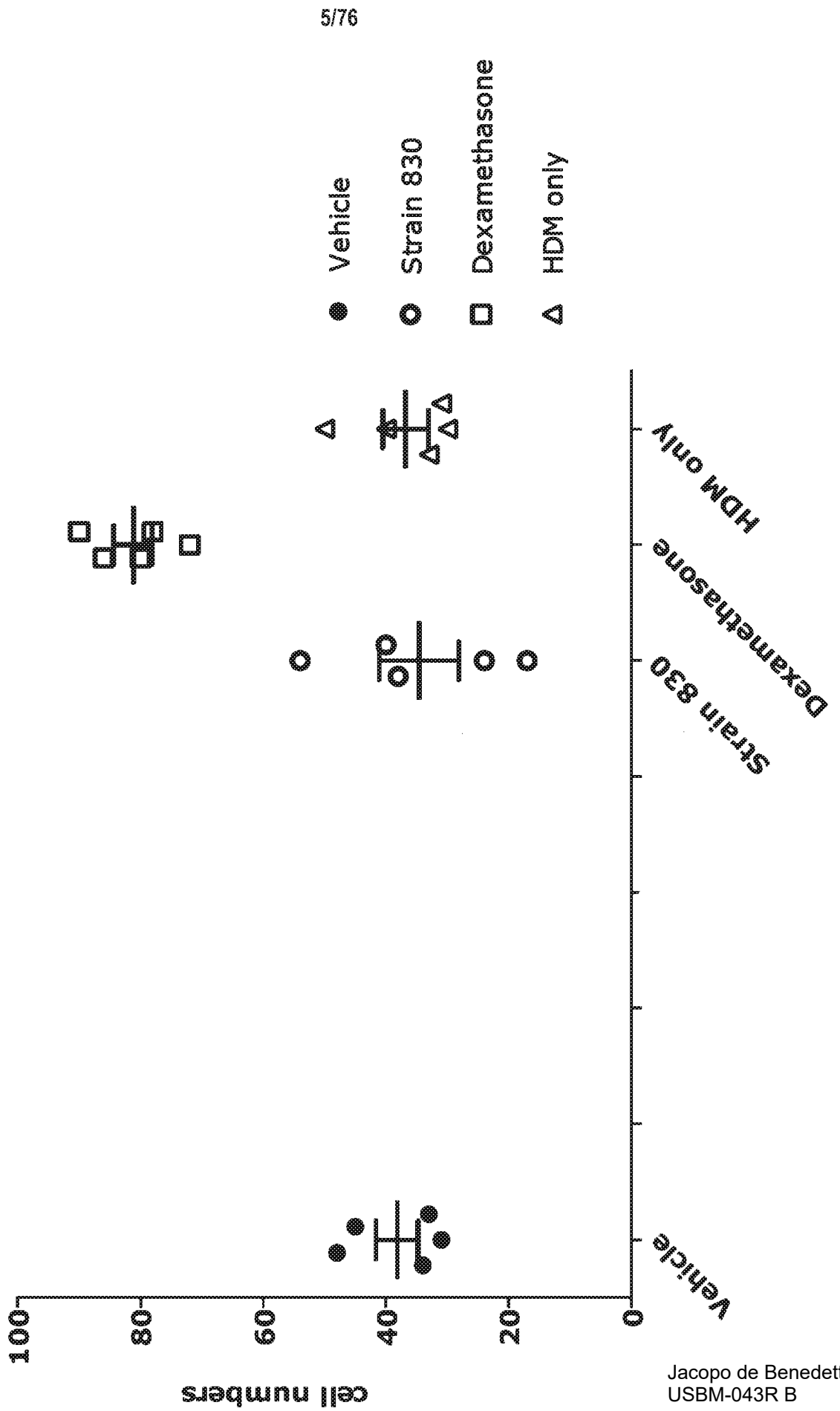


FIG. 6
Total neutrophils.

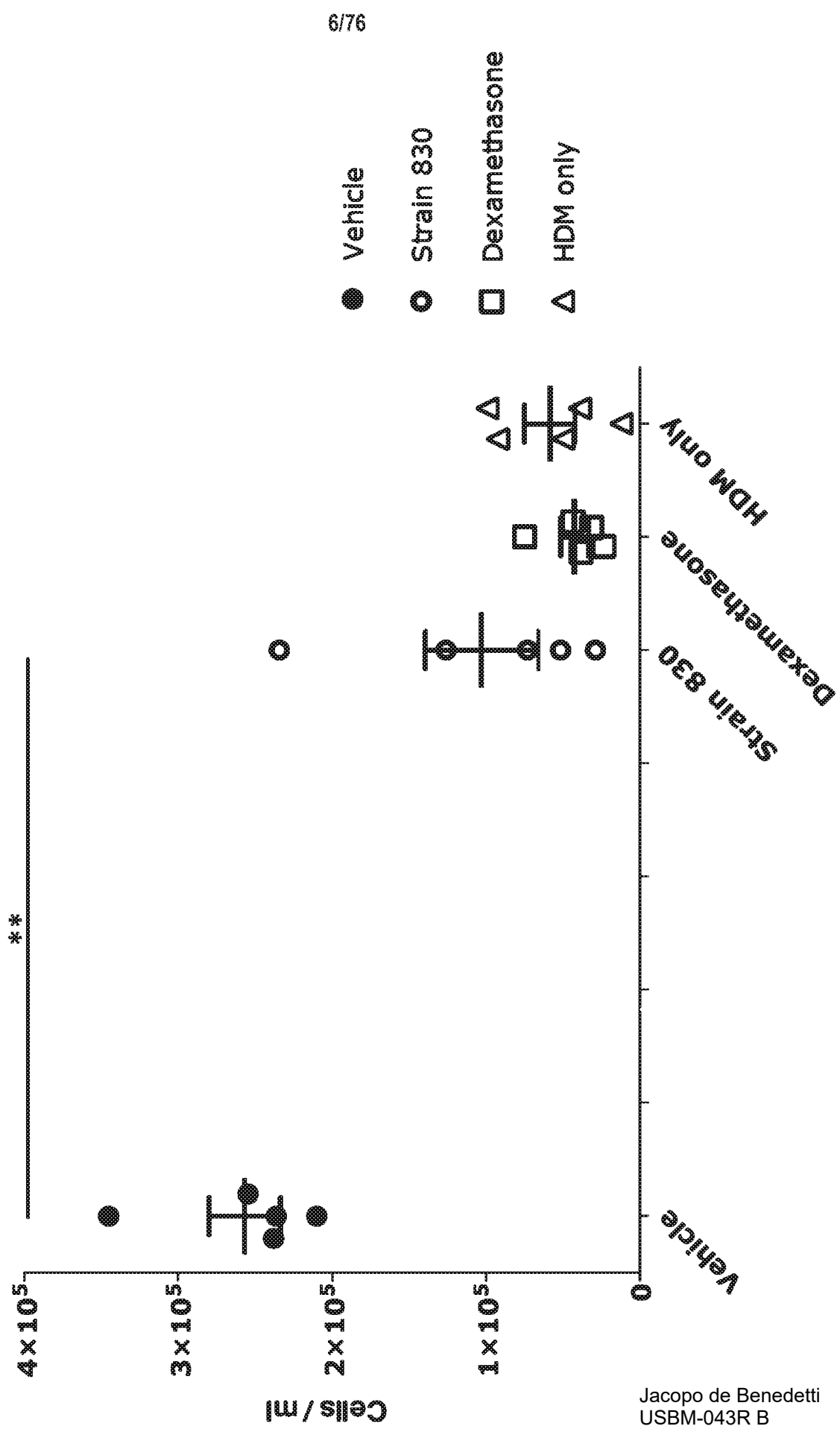


FIG. 7
Neutrophils %.

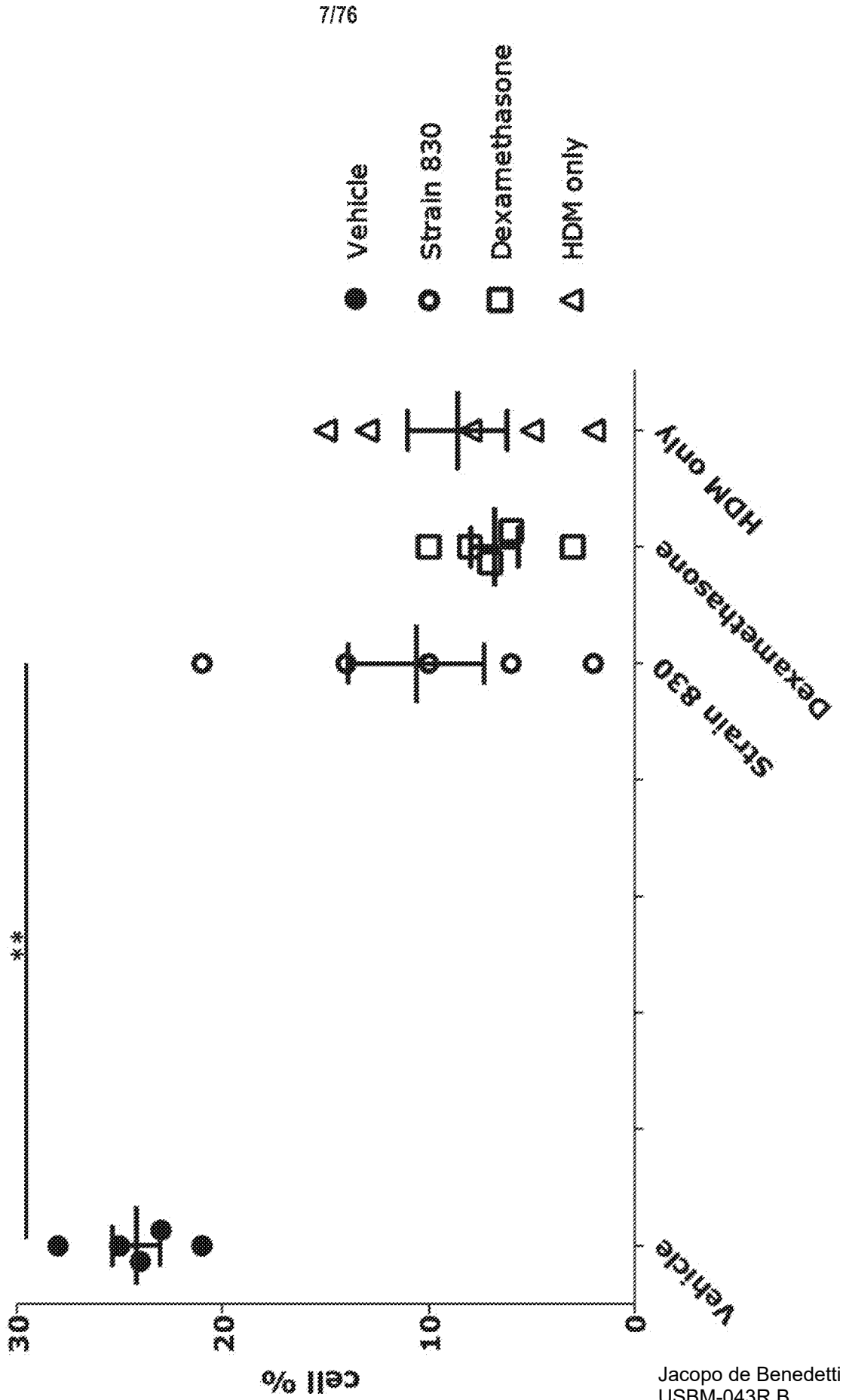


FIG. 8
Total lymphocytes.

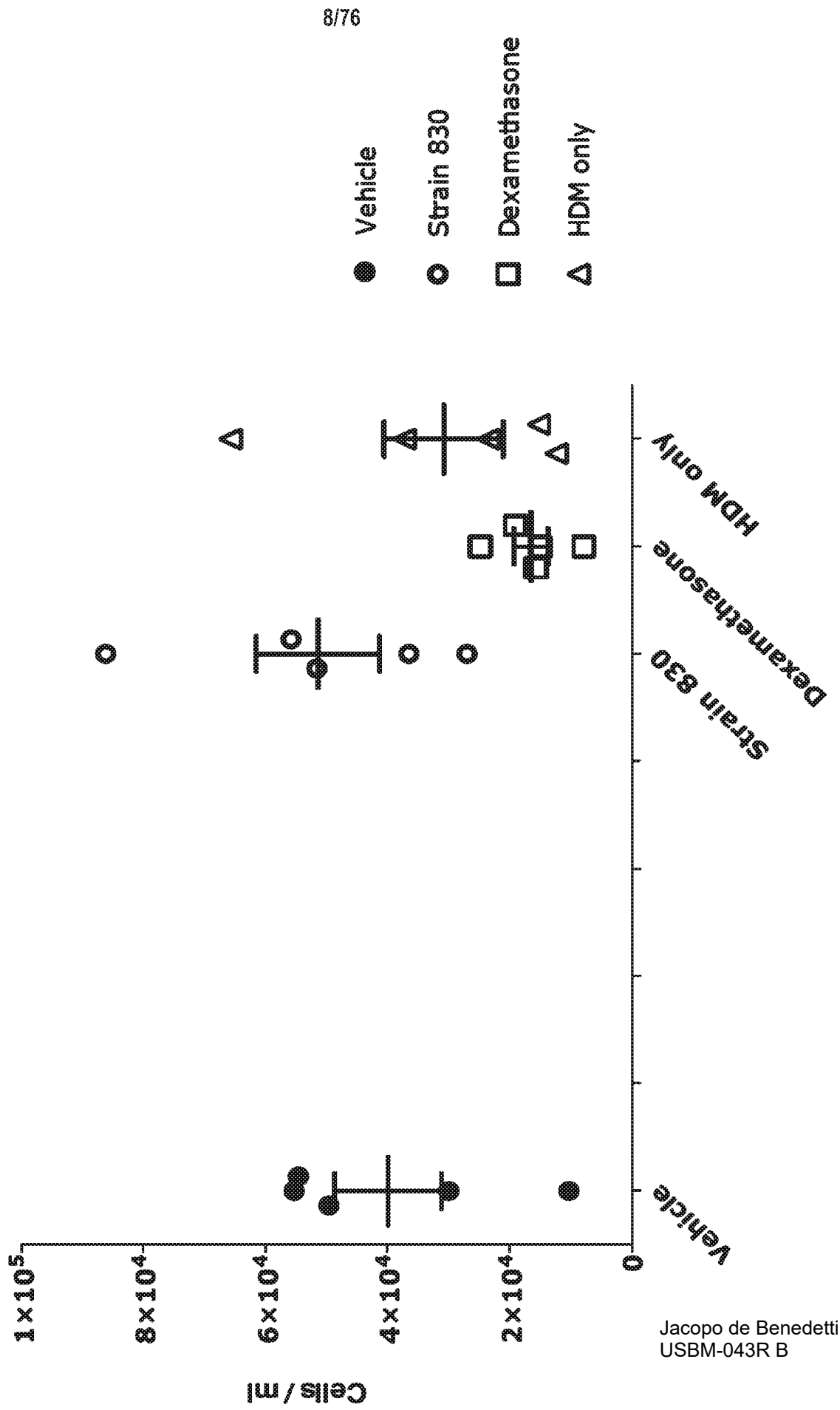


FIG. 9
Lymphocytes %.

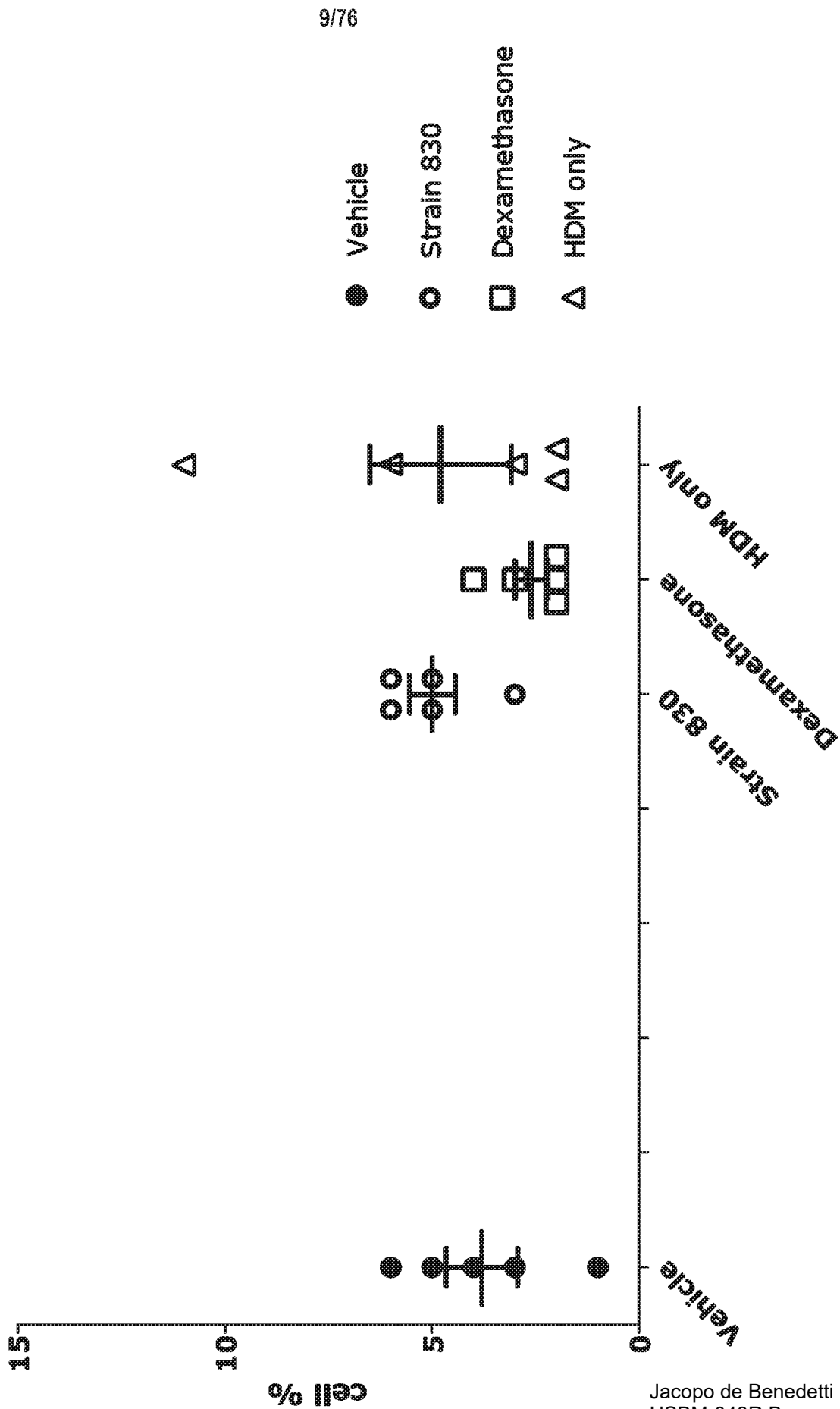


FIG. 10

Total cell counts.

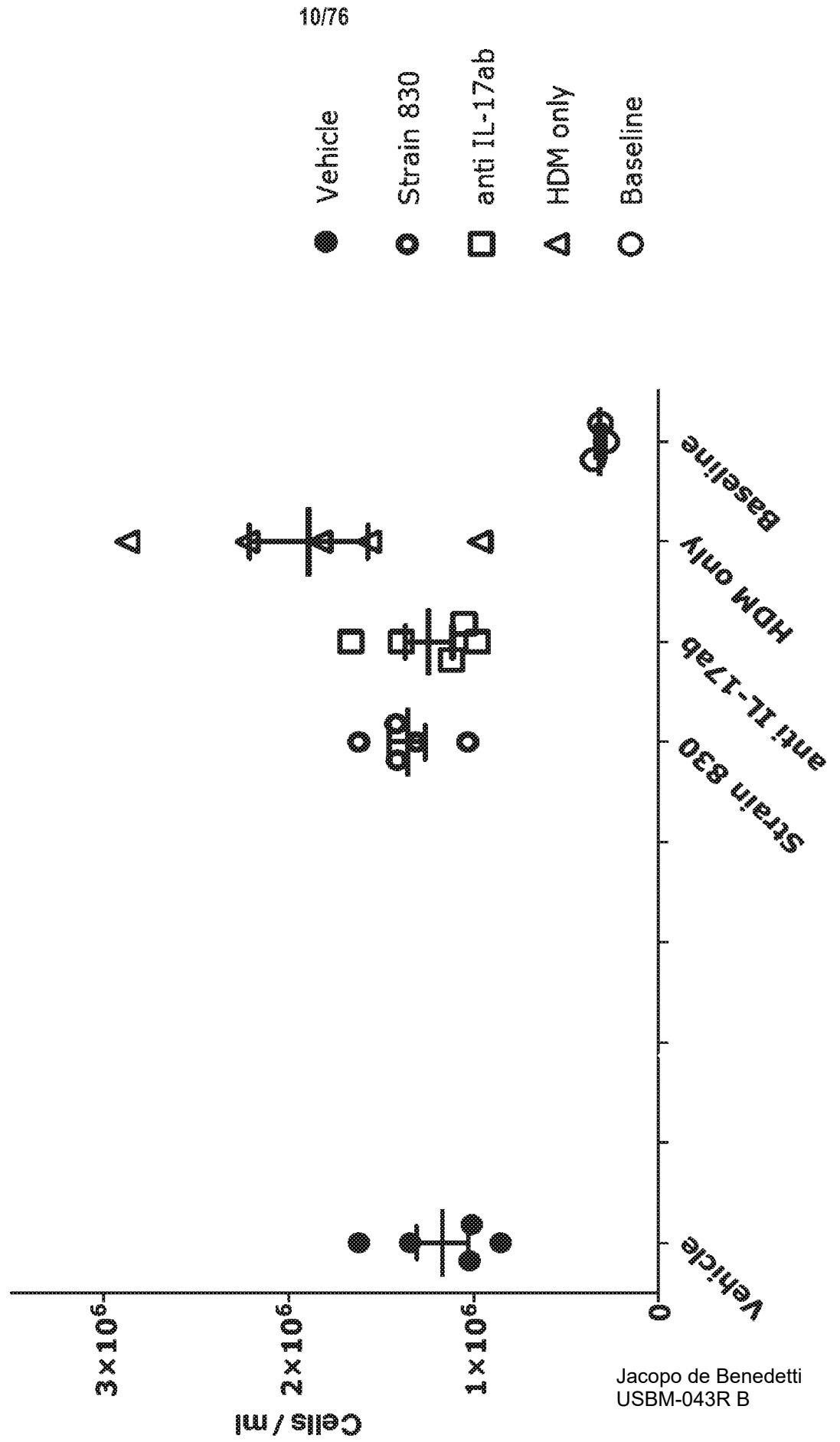


FIG. 11
Total eosinophils.

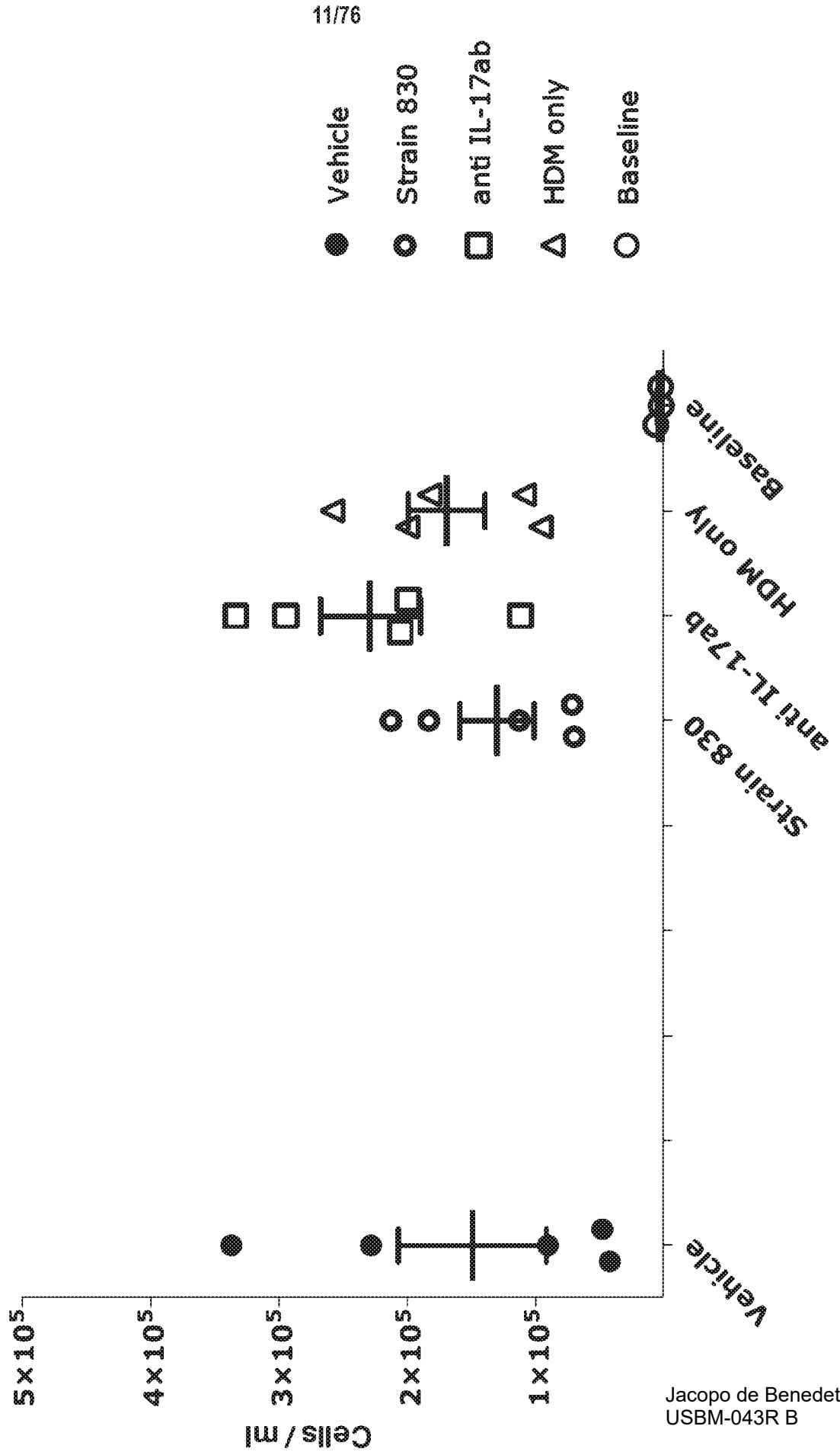


FIG. 12
Eosinophils %.

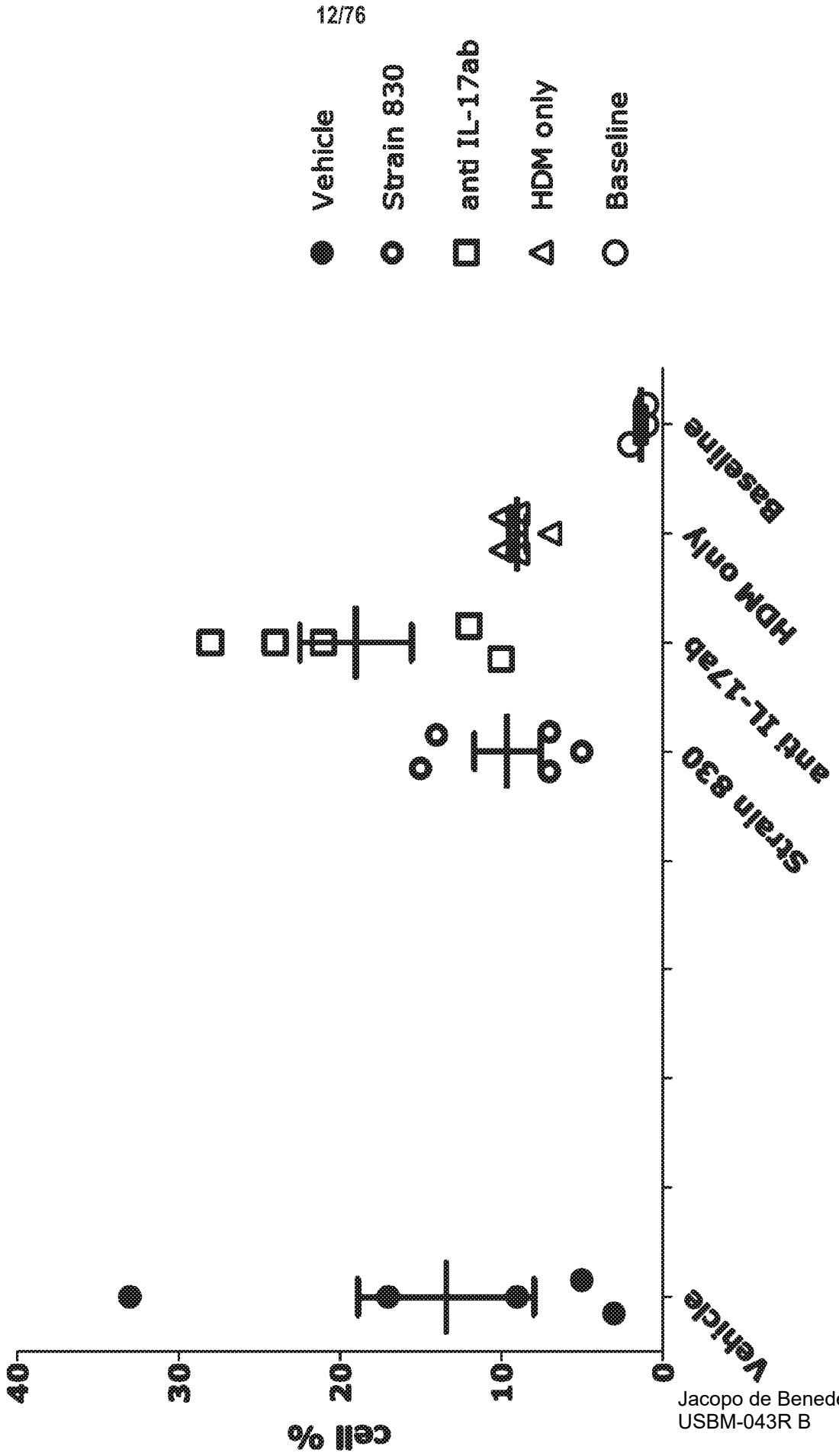


FIG. 13

Total macrophages.

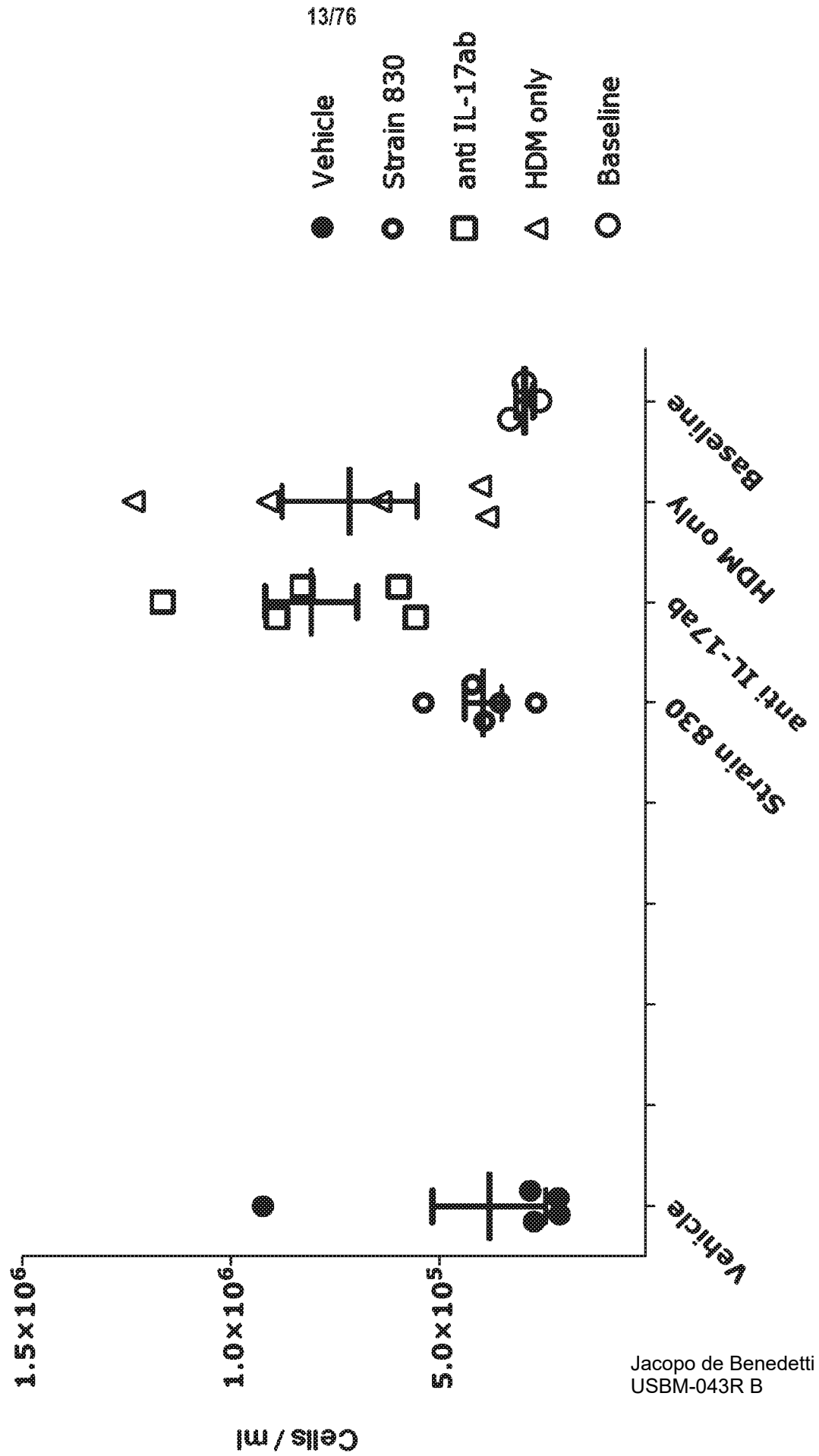


FIG. 14
Macrophages %.

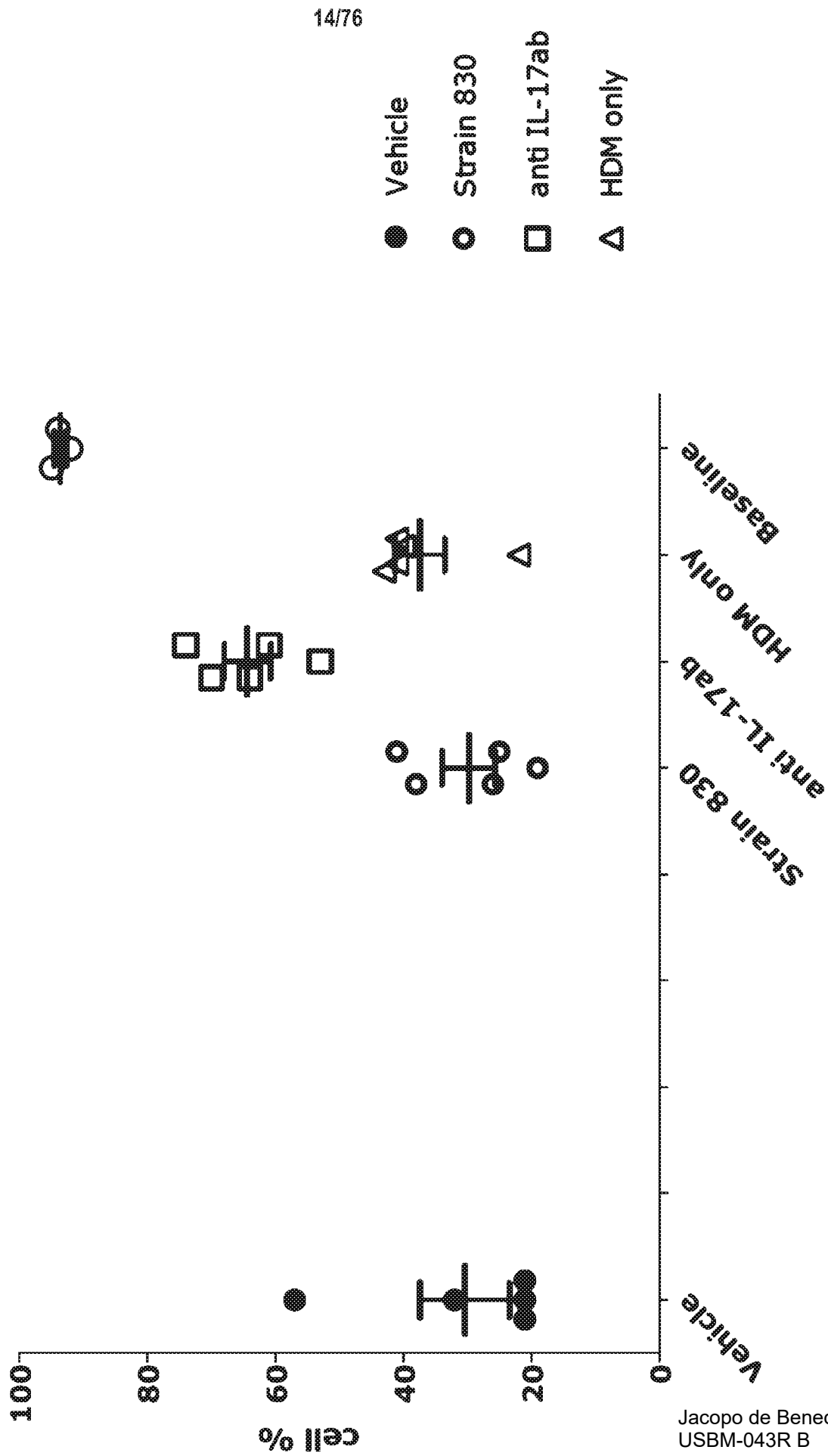


FIG. 15
Total neutrophils.

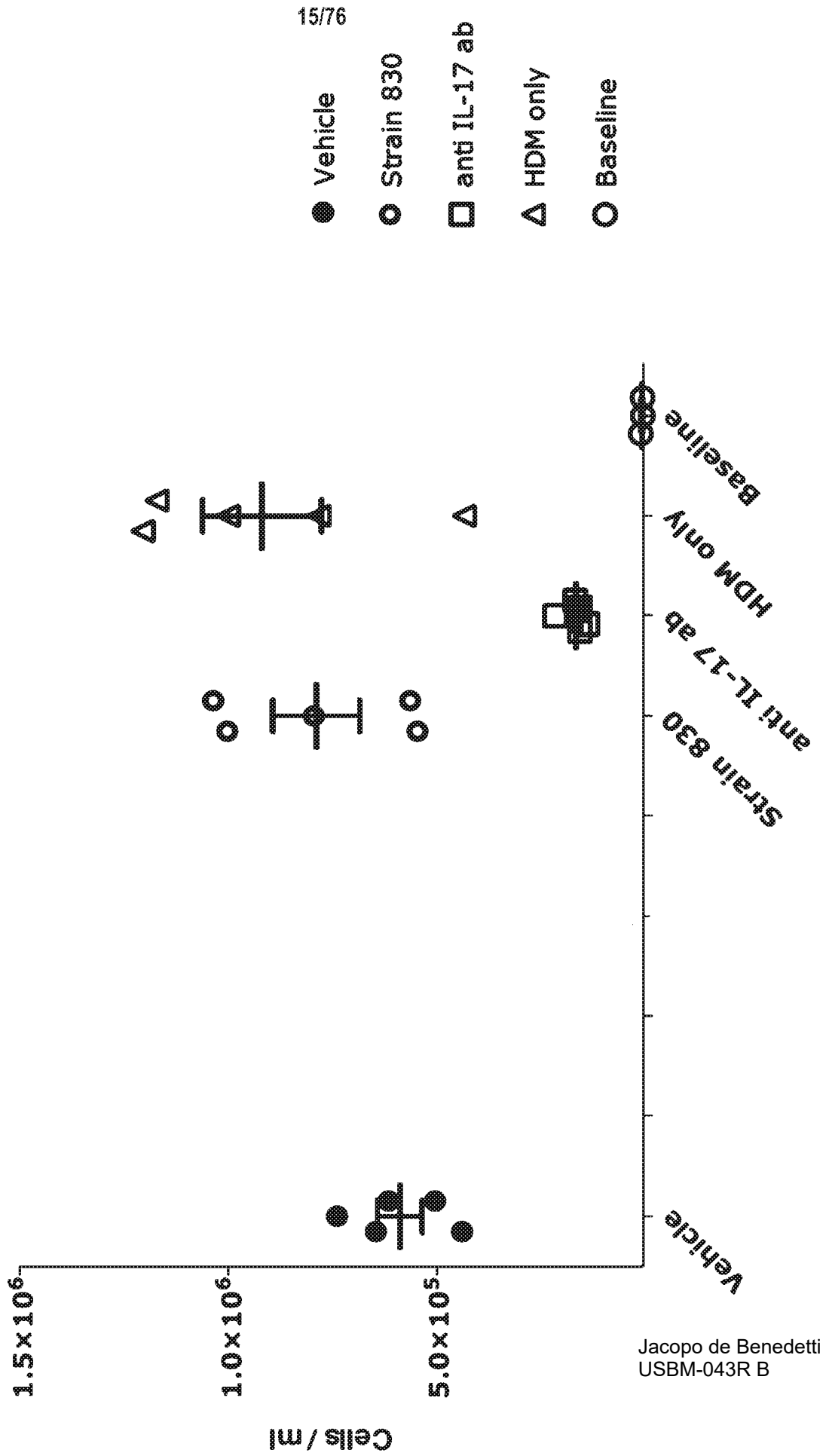


FIG. 16
Neutrophils %.

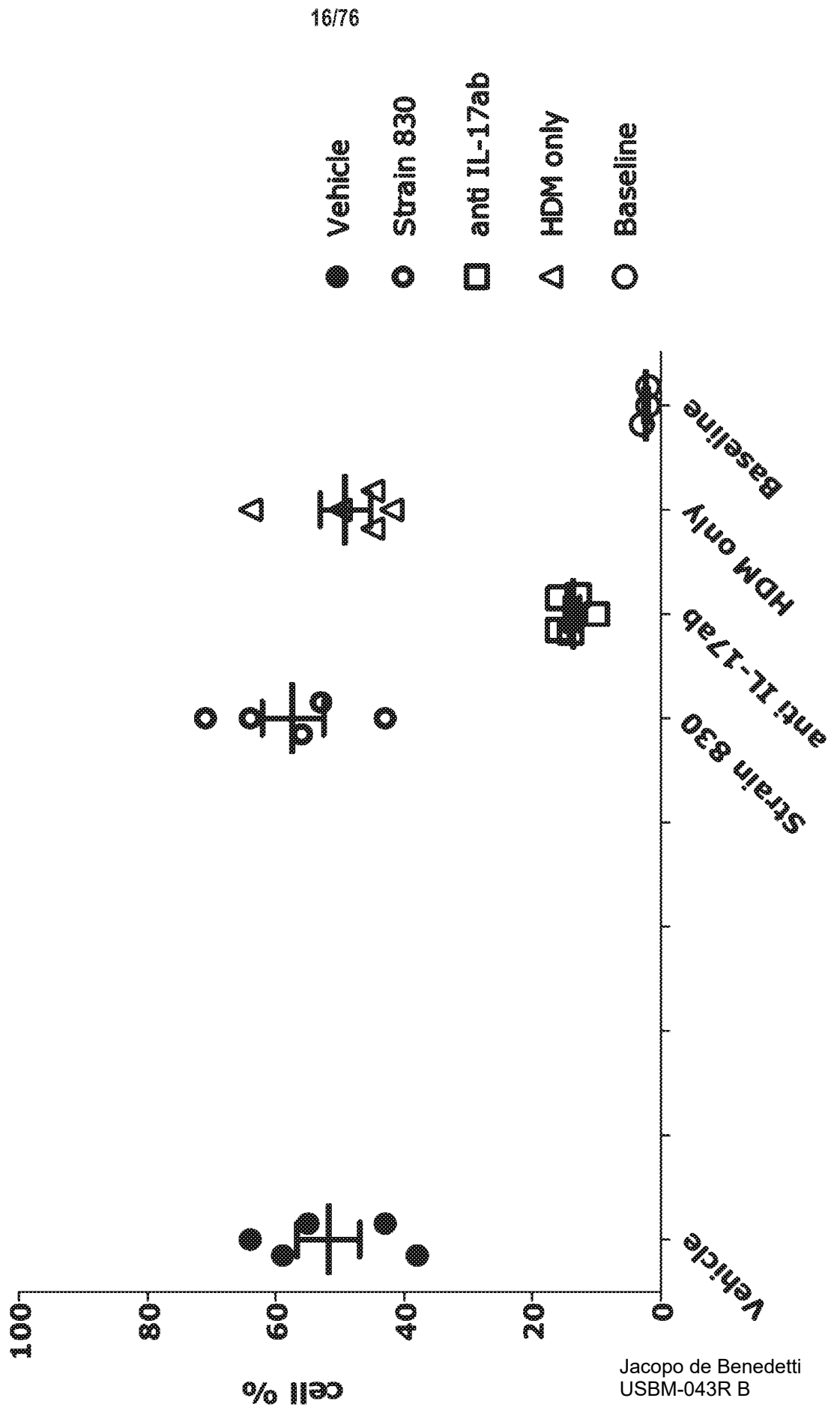


FIG. 17
Total lymphocytes.

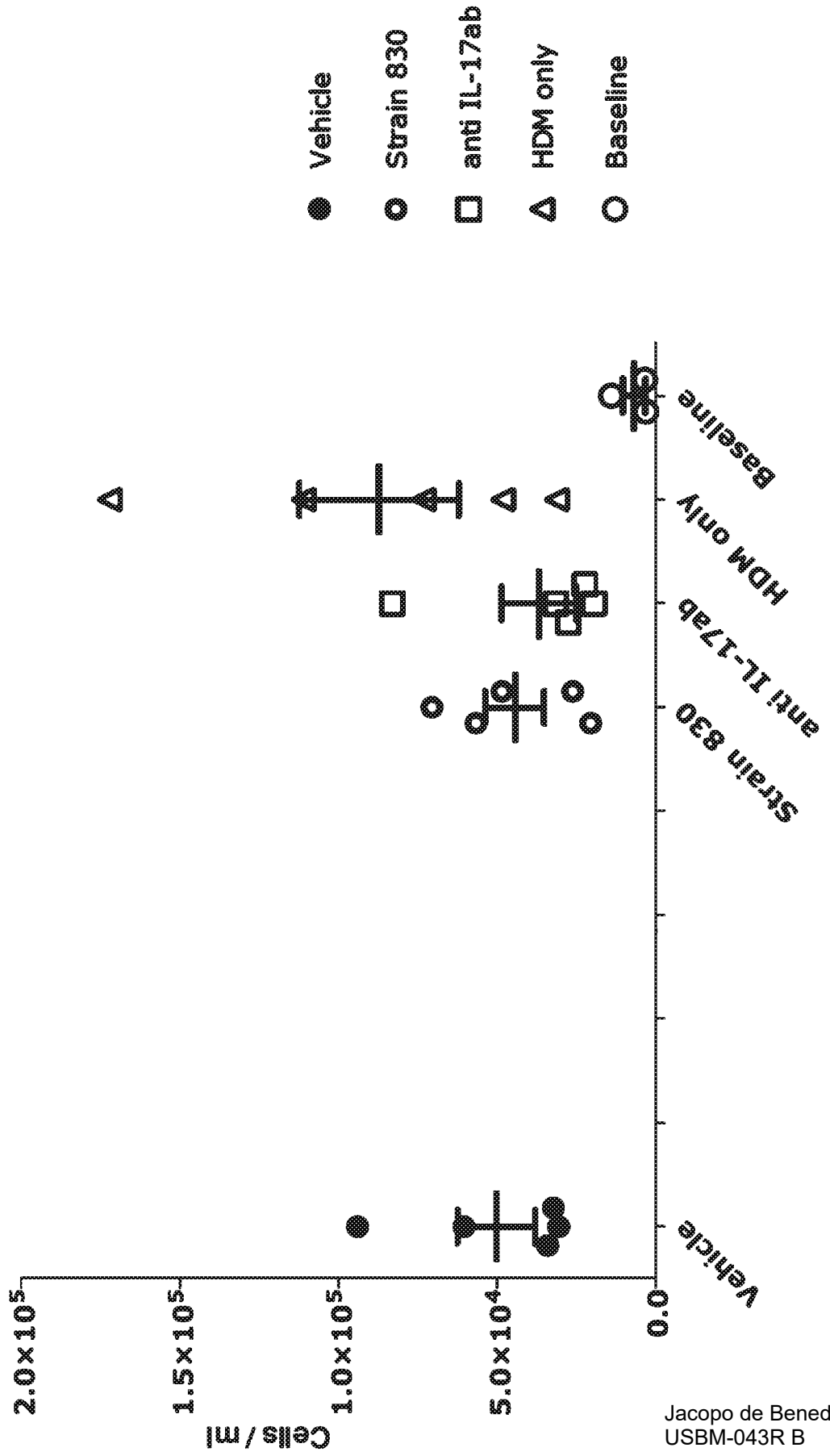


FIG. 18
Lymphocytes %.

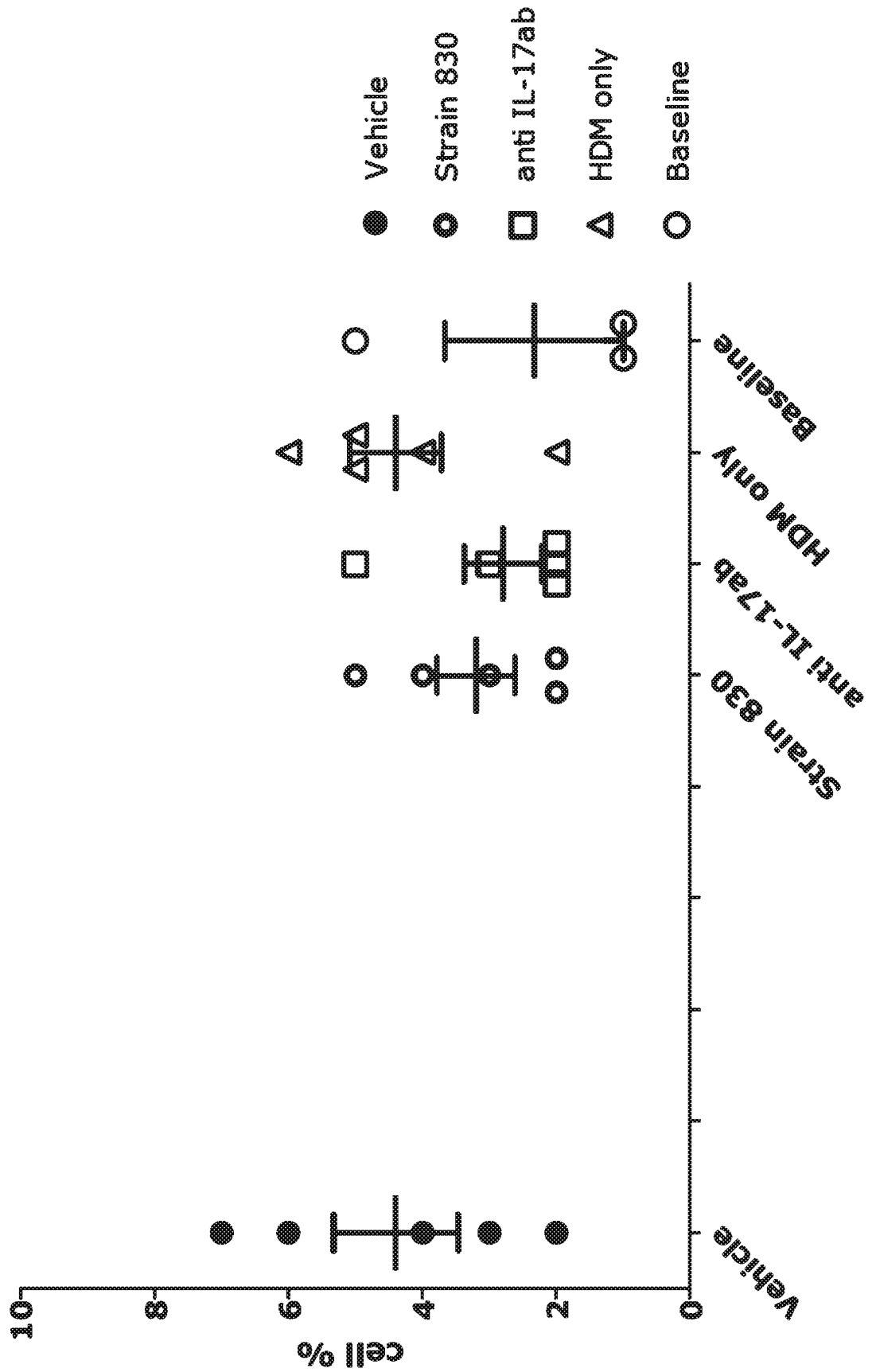


FIG. 19
Bodyweights

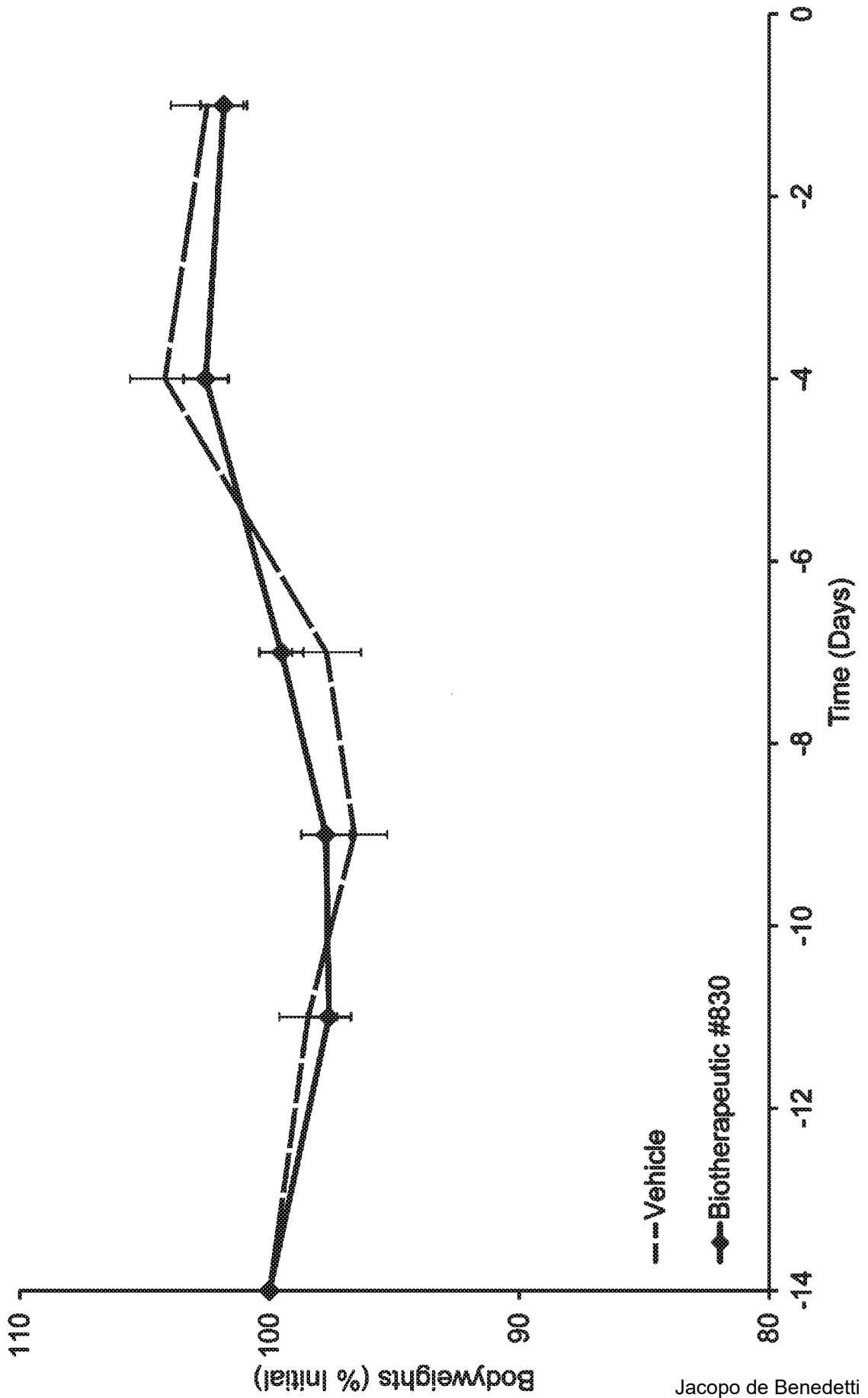


FIG. 20
Bodyweights

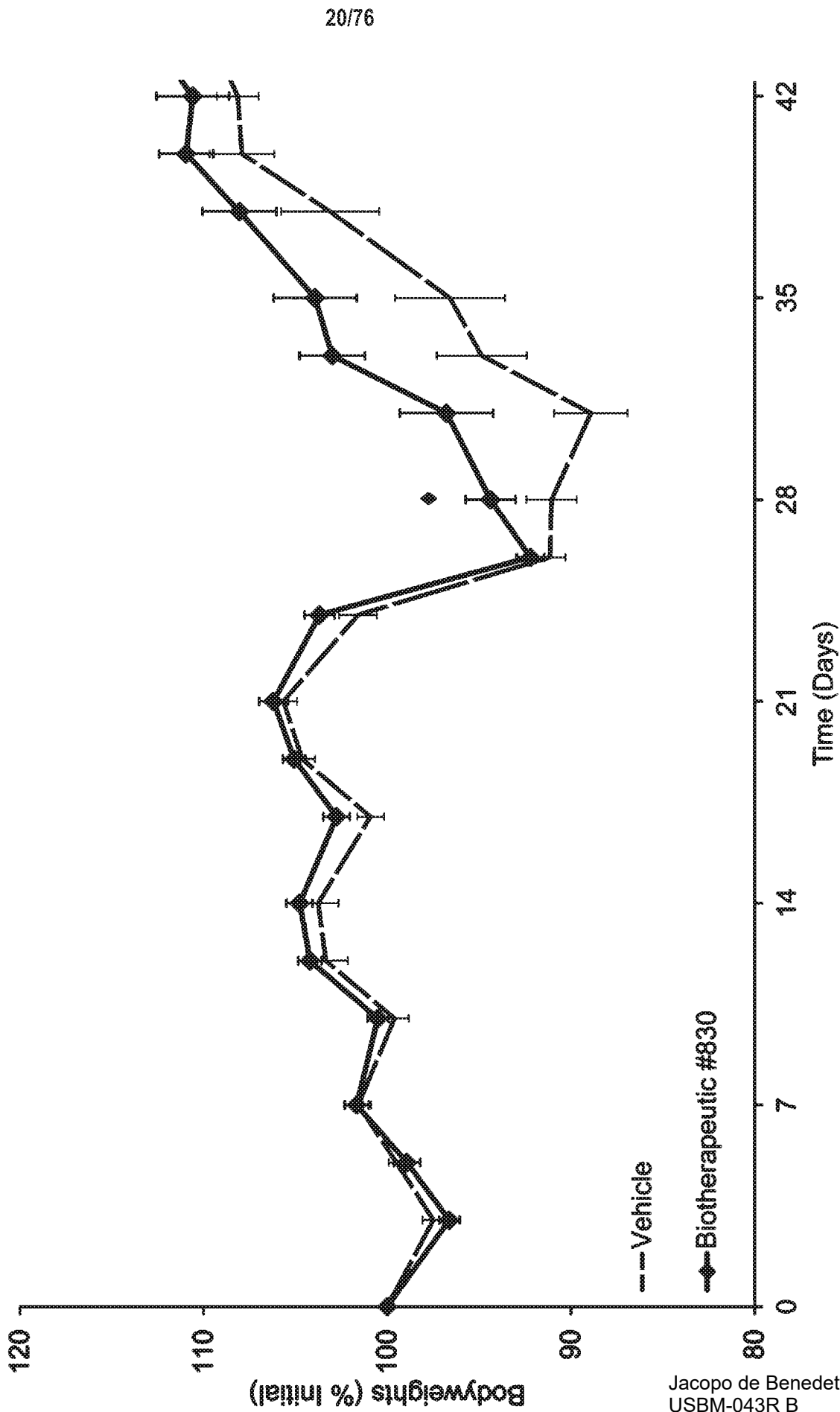


FIG. 21
Clinical Scores

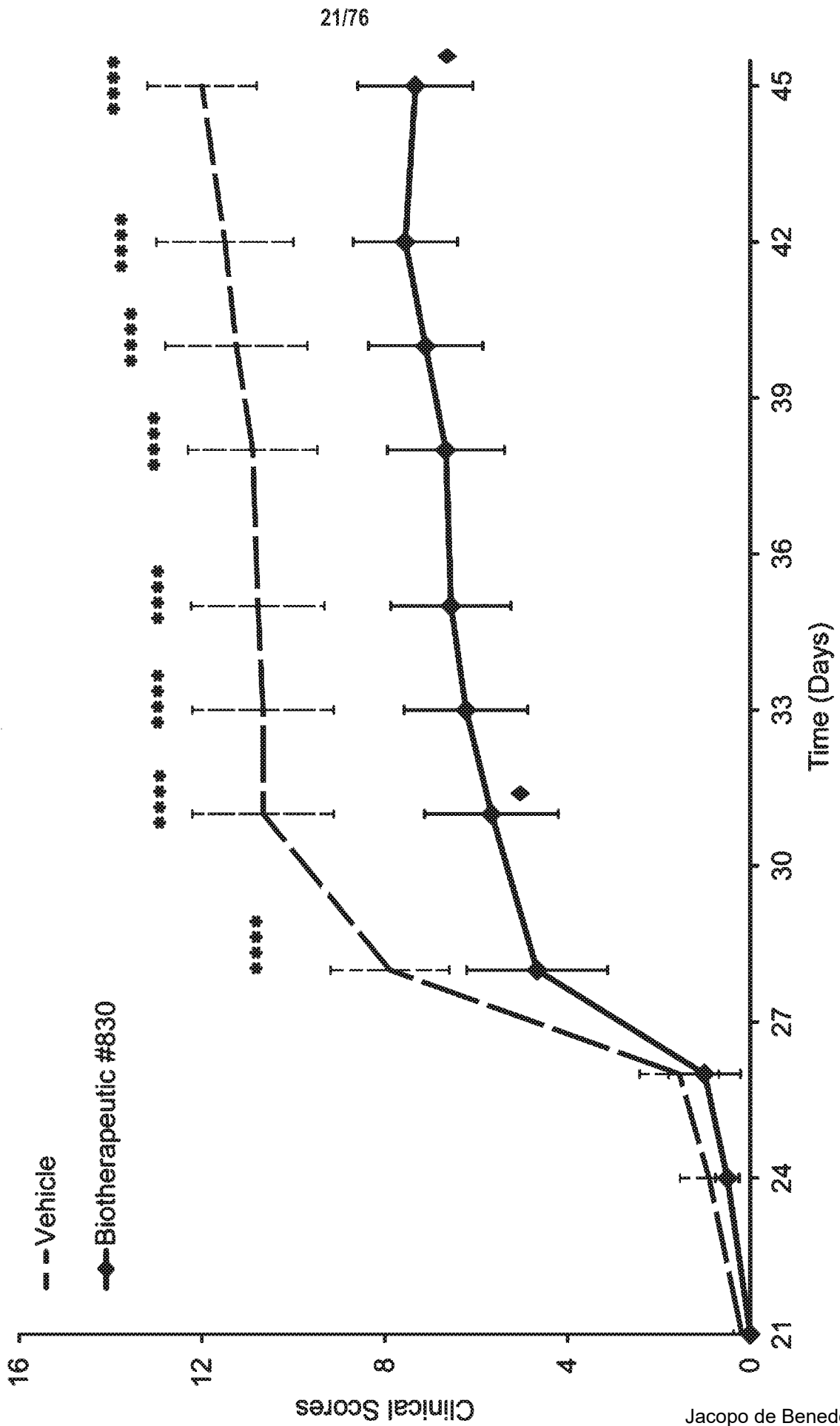


FIG. 23

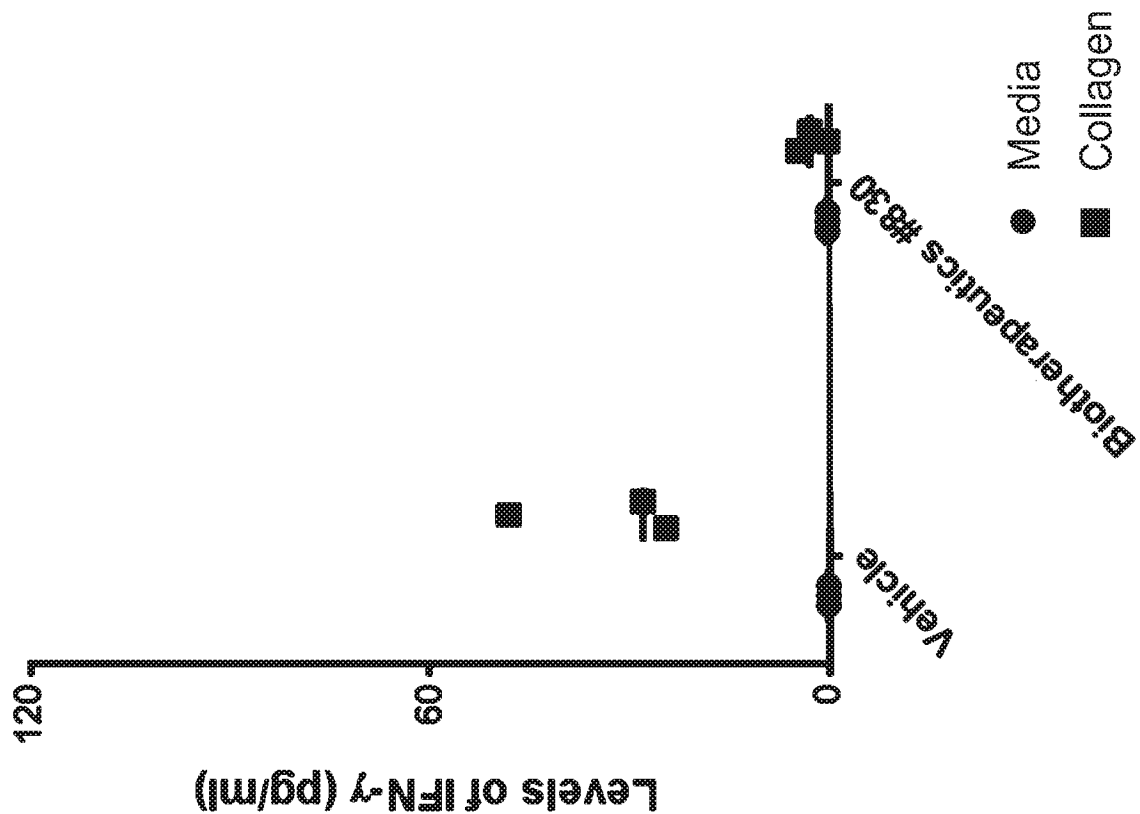


FIG. 22
Splenic proliferation to Collagen II

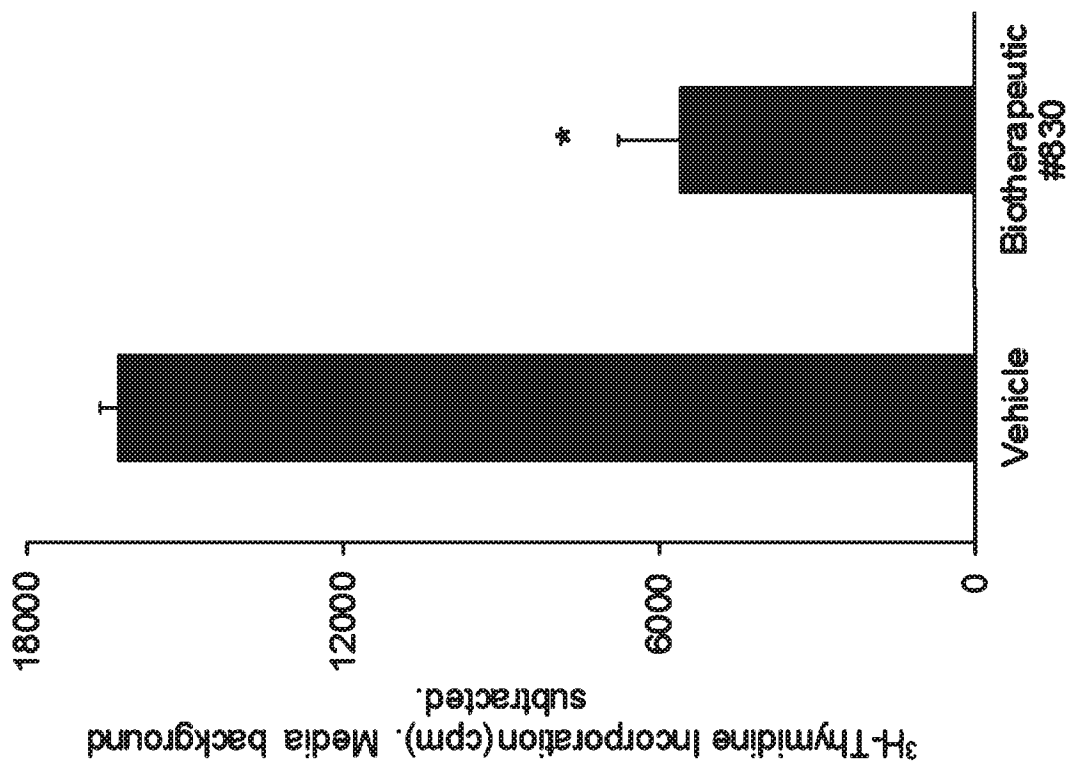


FIG. 25

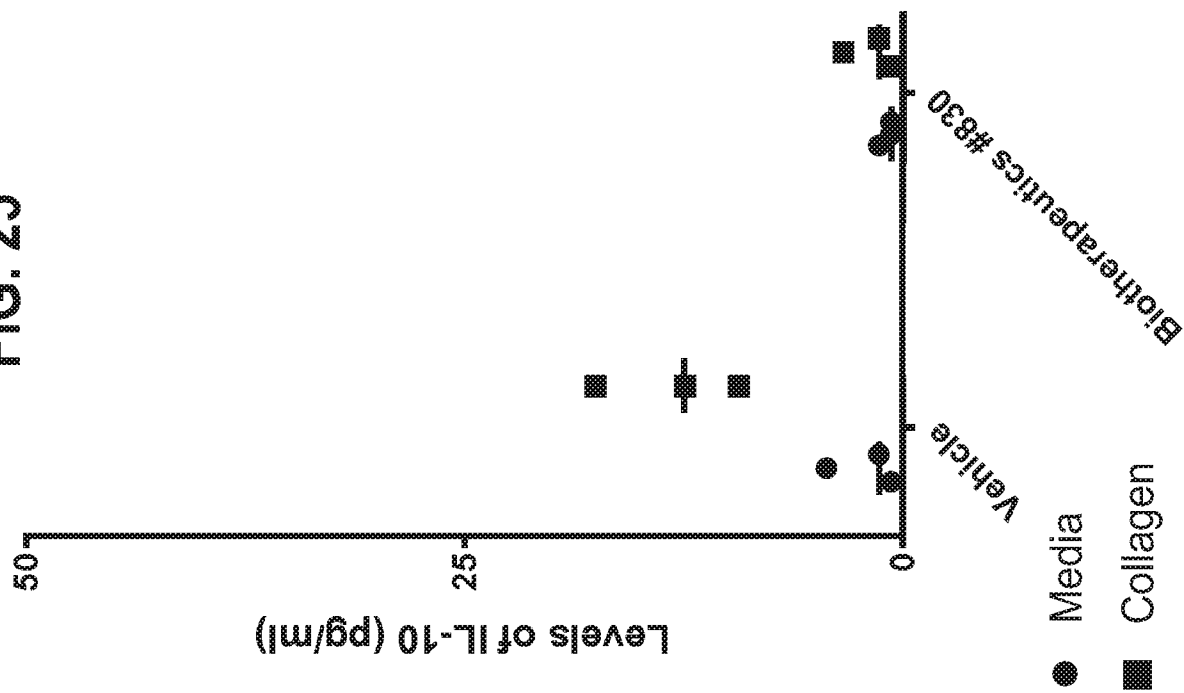


FIG. 24

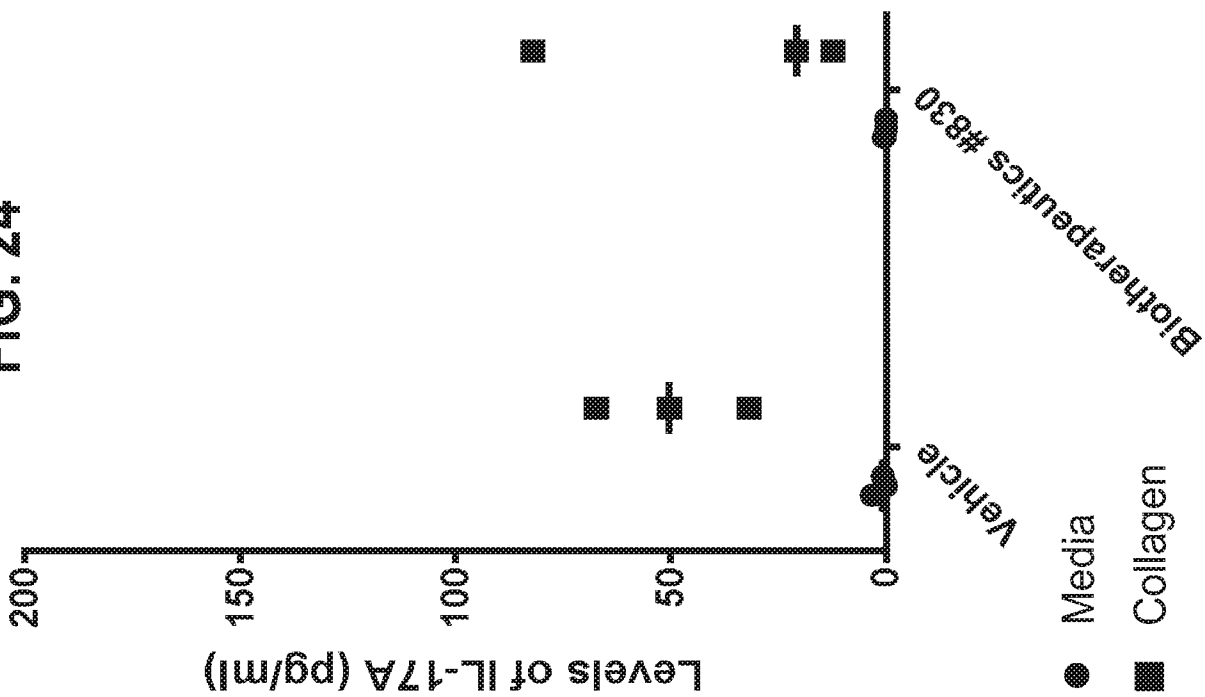


FIG. 26

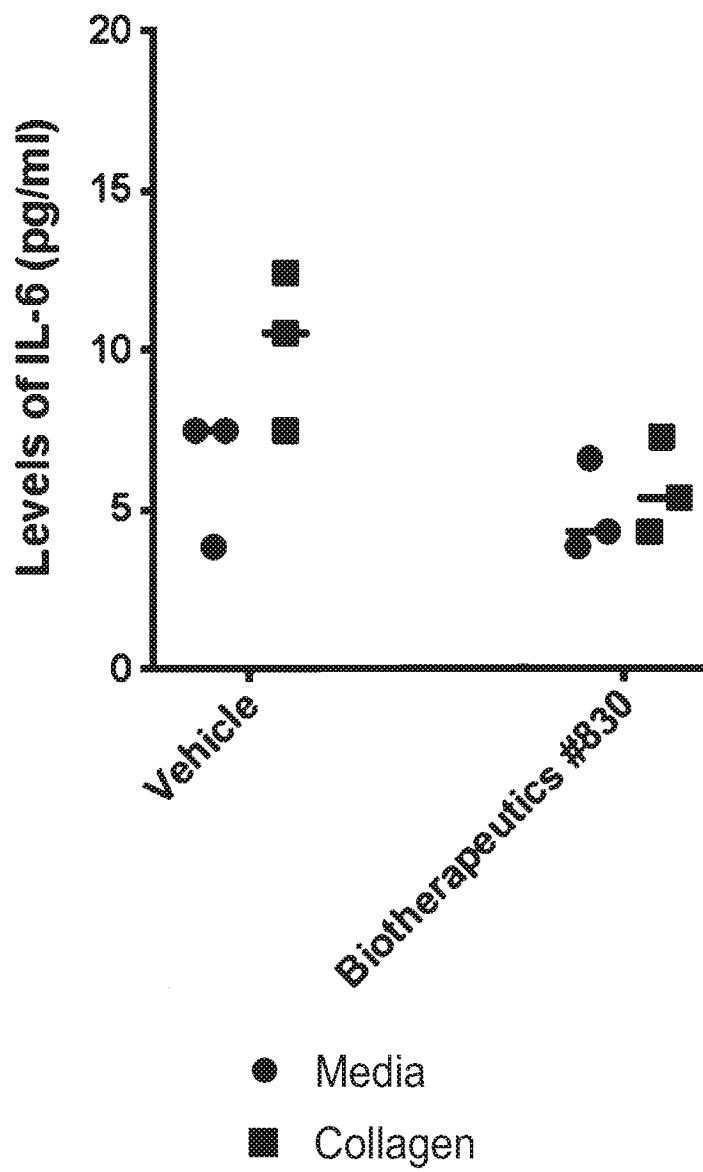


FIG. 27
Total IgE in Serum

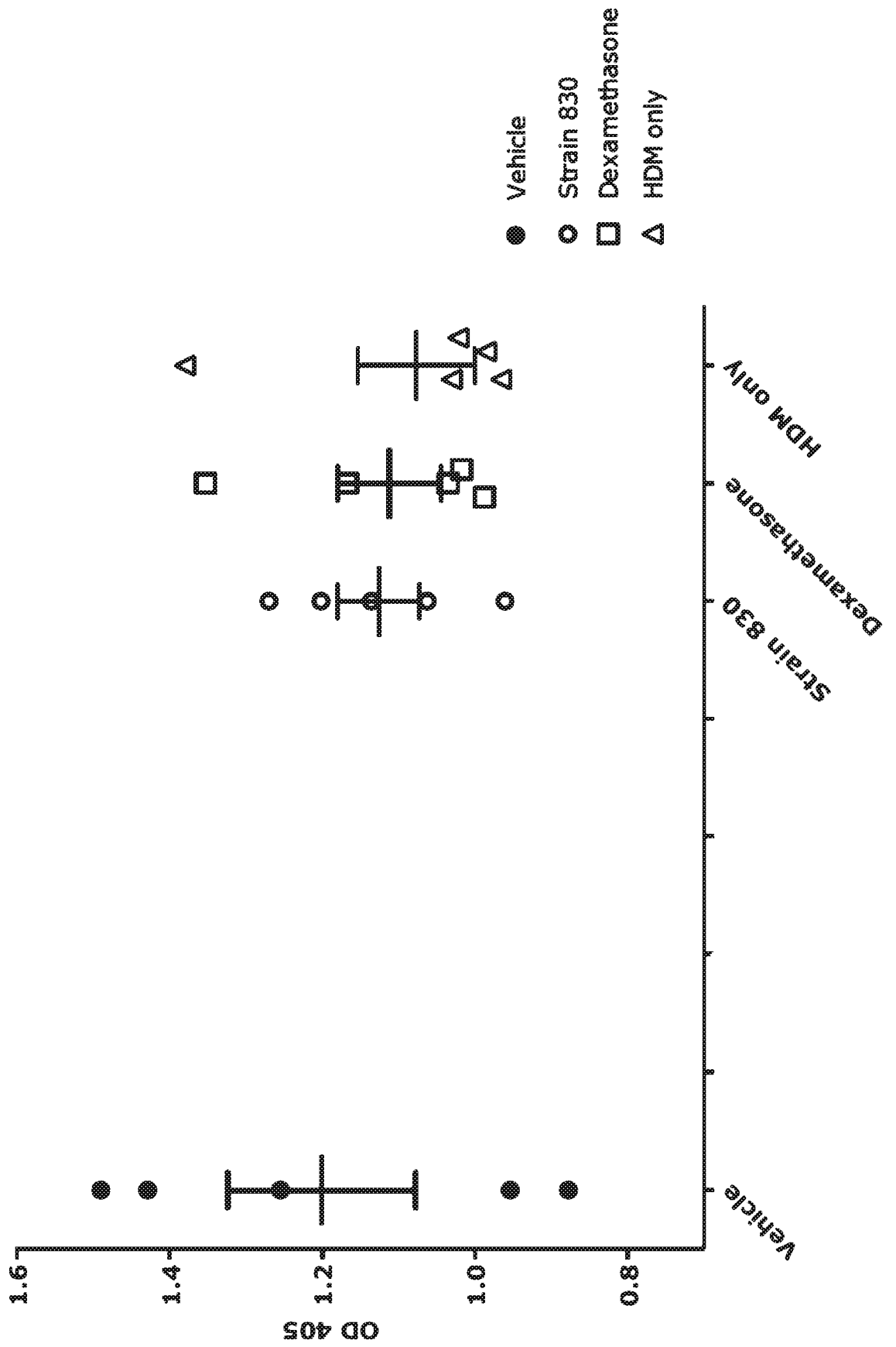


FIG. 28
HDM specific IgG1 in Serum

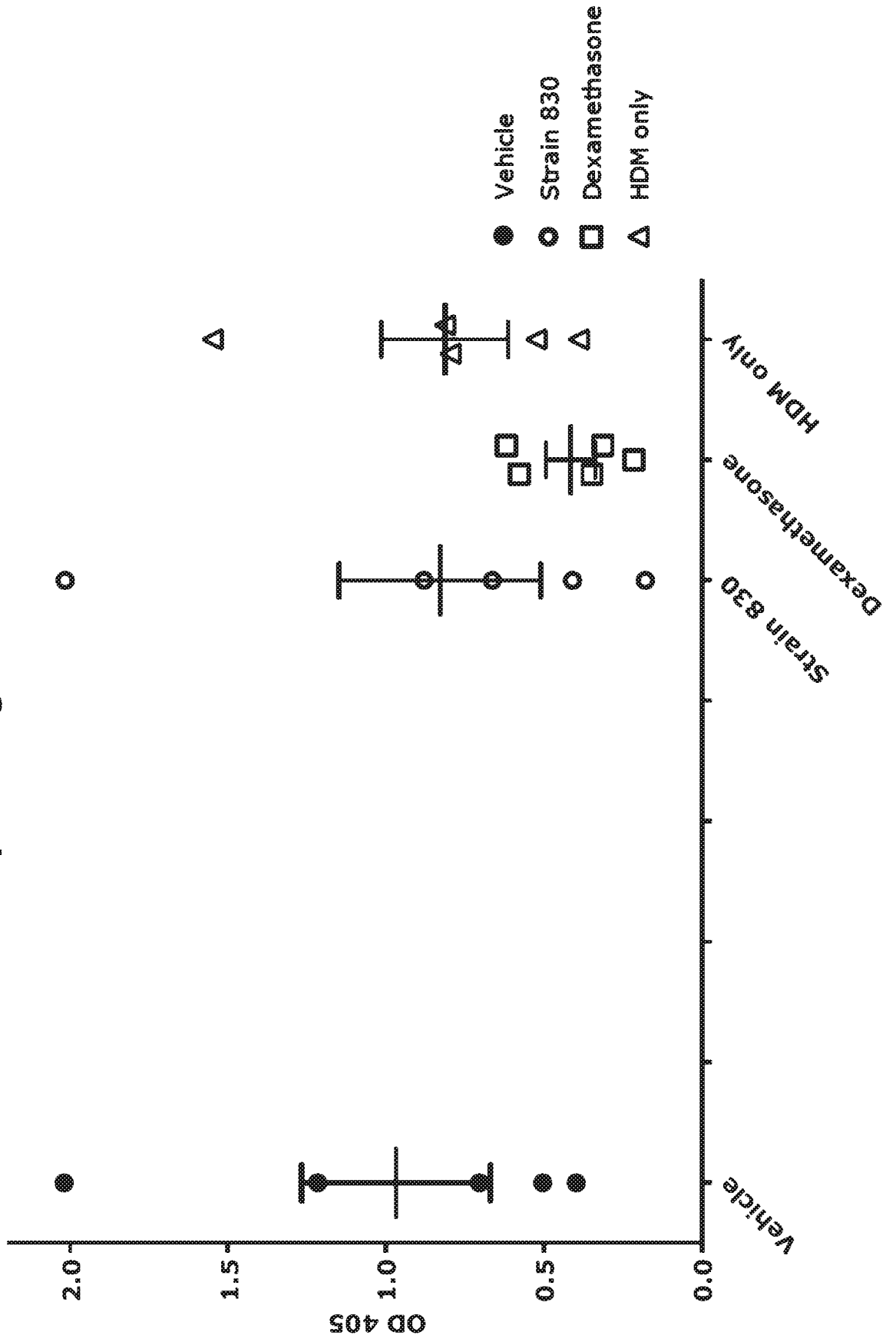


FIG. 29
Total IgE in BALF

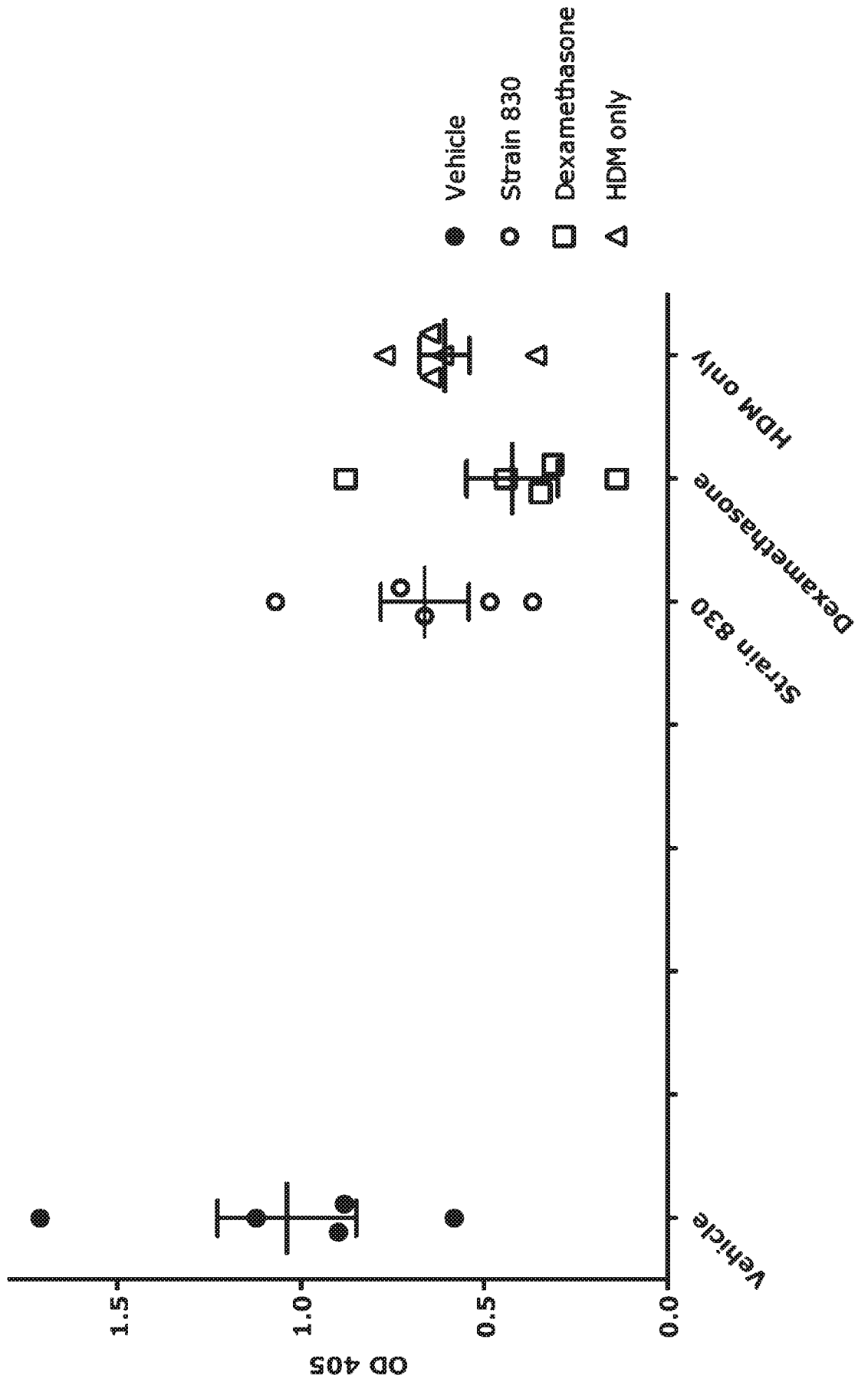


FIG. 30
HDM specific IgG1 in BALF

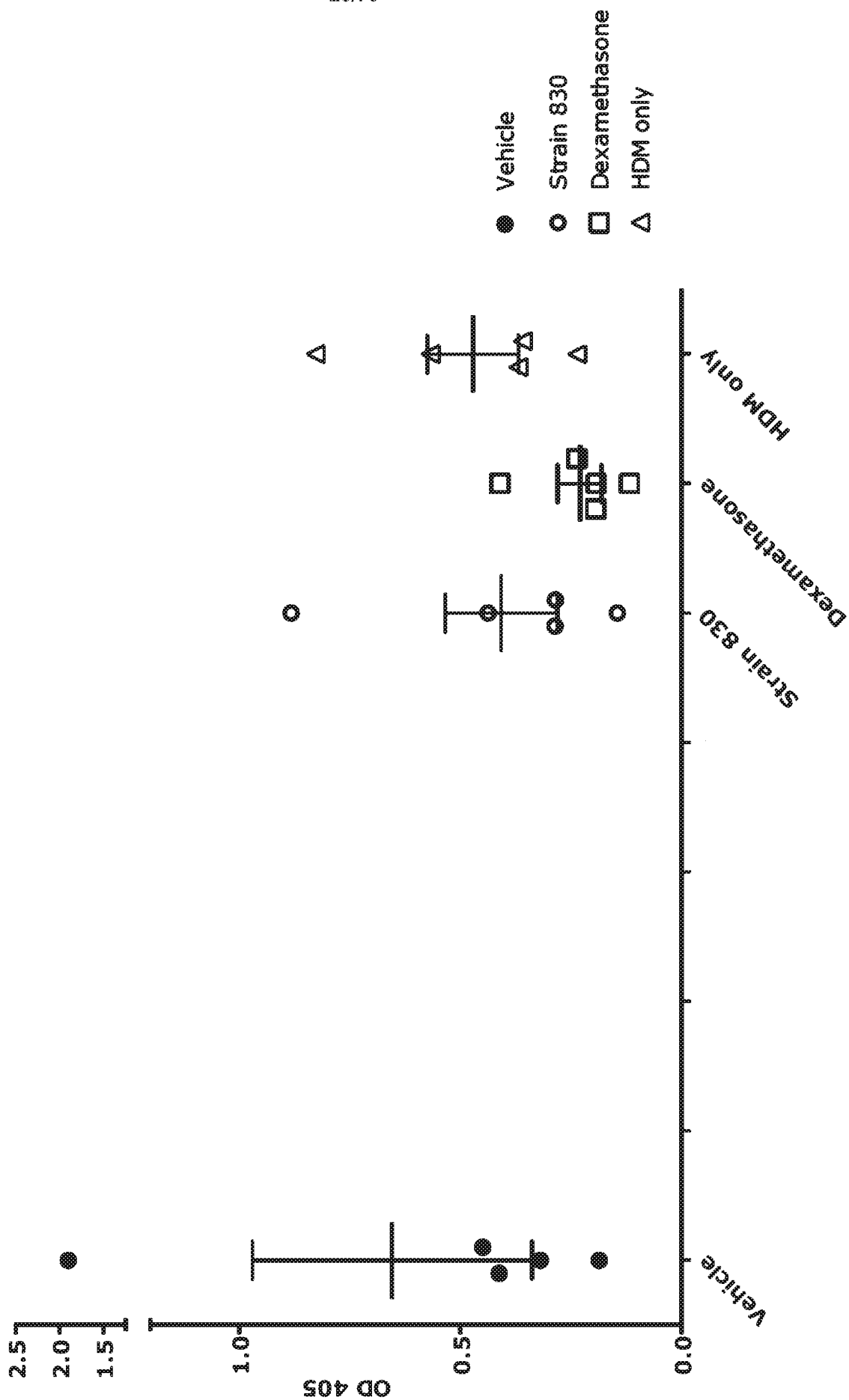


FIG. 31 Histological Analysis – Mean Peribronchiolar Infiltration Score

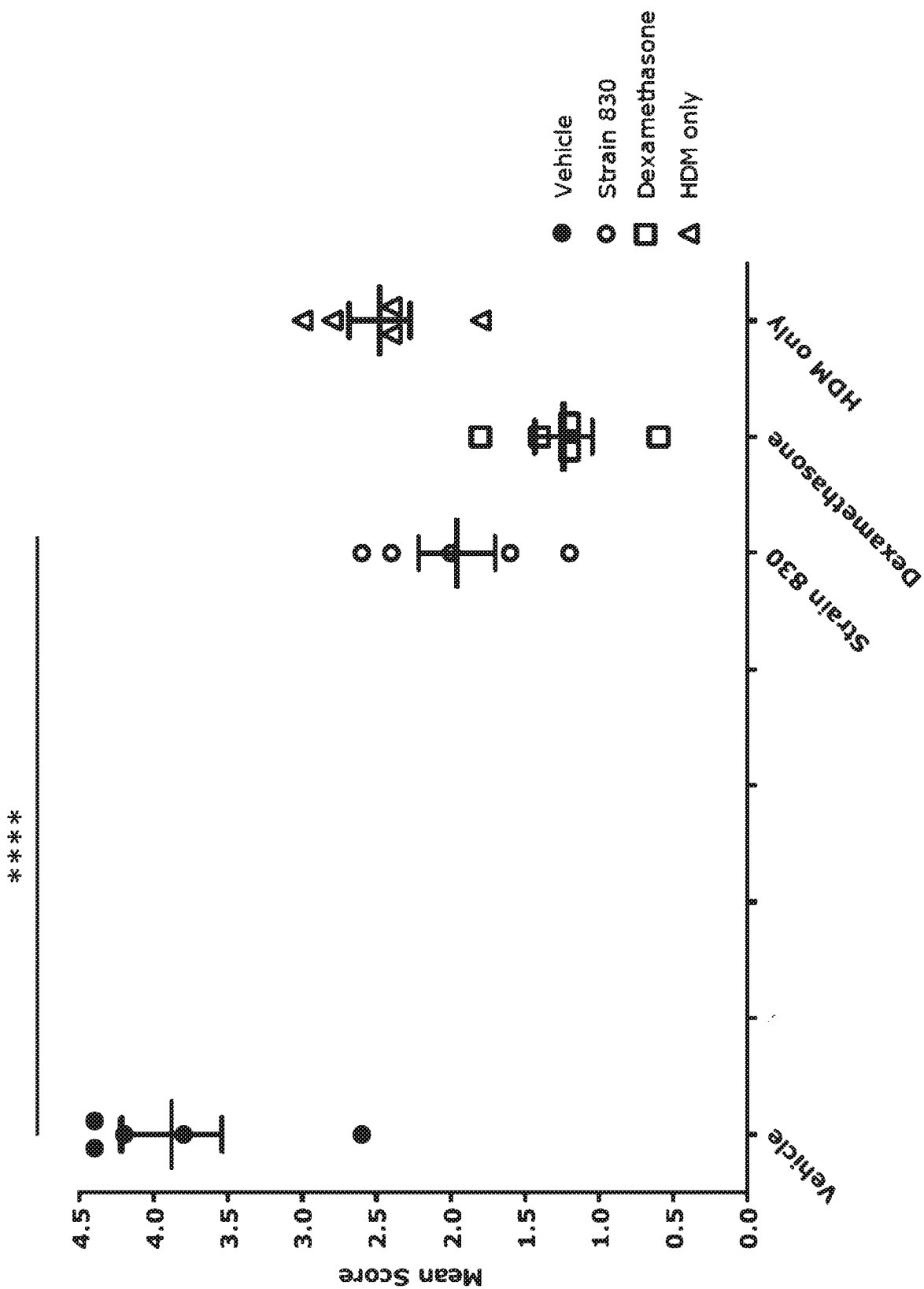


FIG. 32 Histological Analysis – Mean Perivascular Infiltration Score

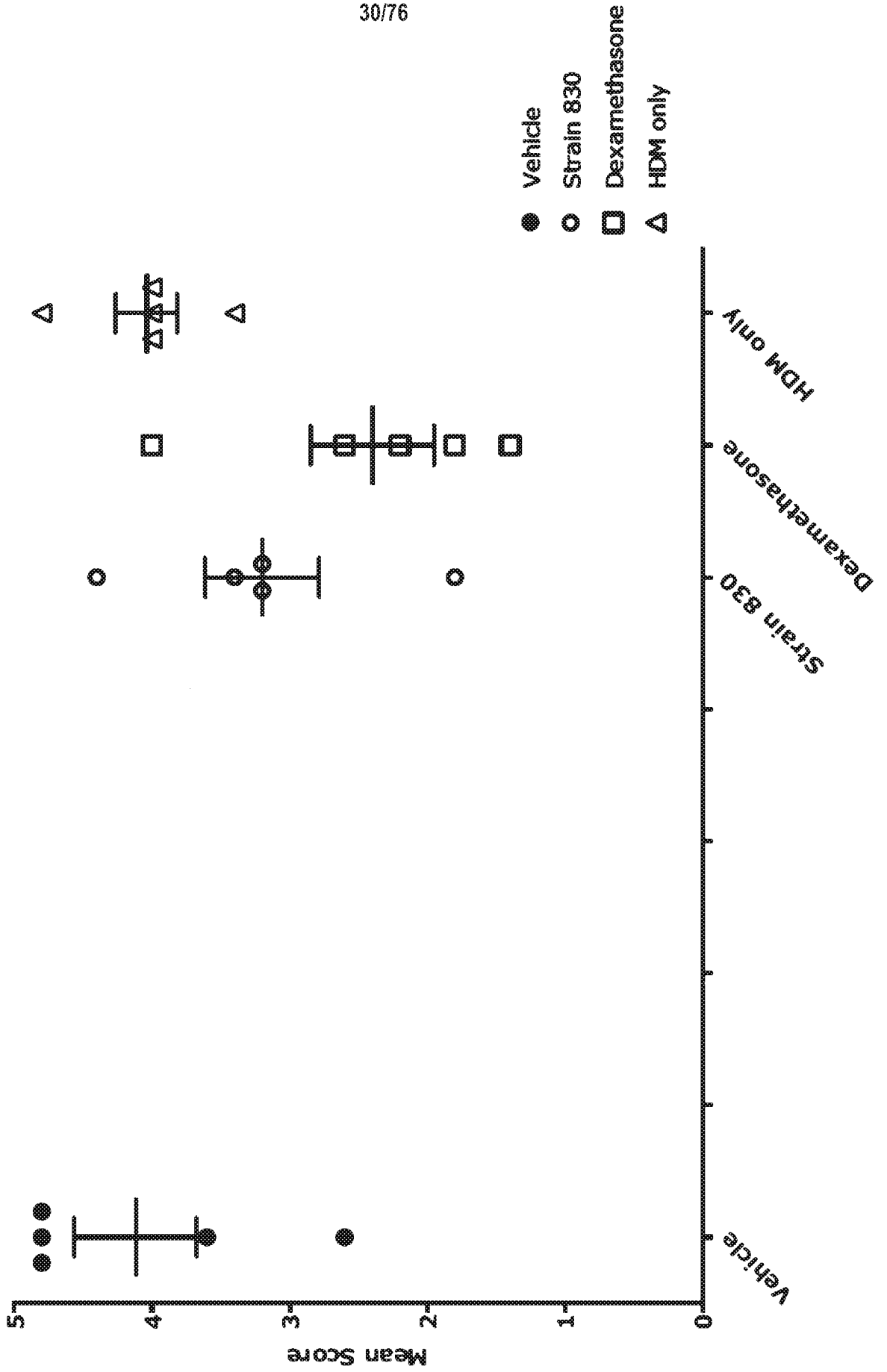


FIG. 33 Histological Analysis – Mean Inflammatory Score (Average of both Peribronchiolar and Perivascular Infiltration Score)

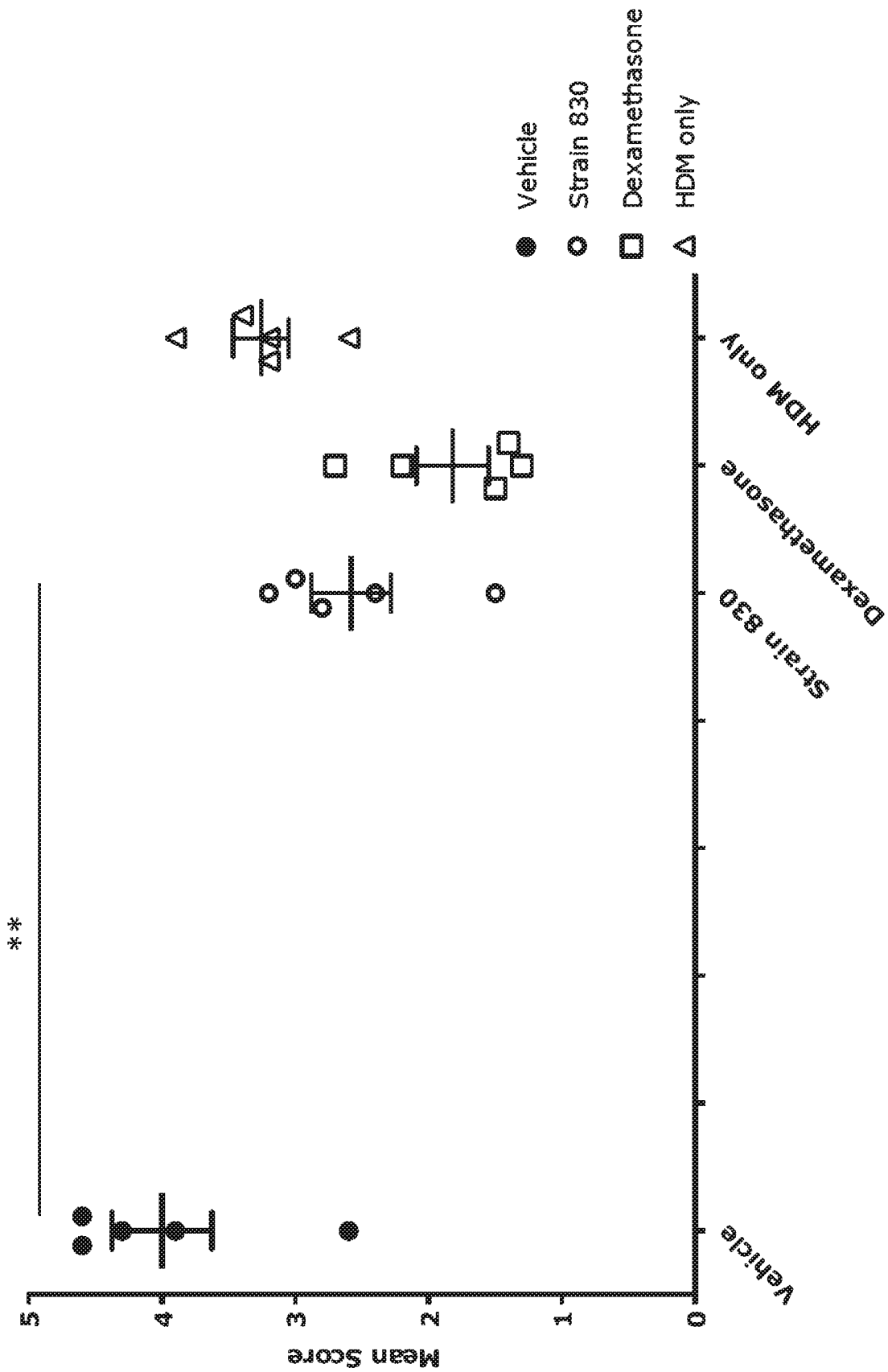


FIG. 34 Histological Analysis – Mucus Score

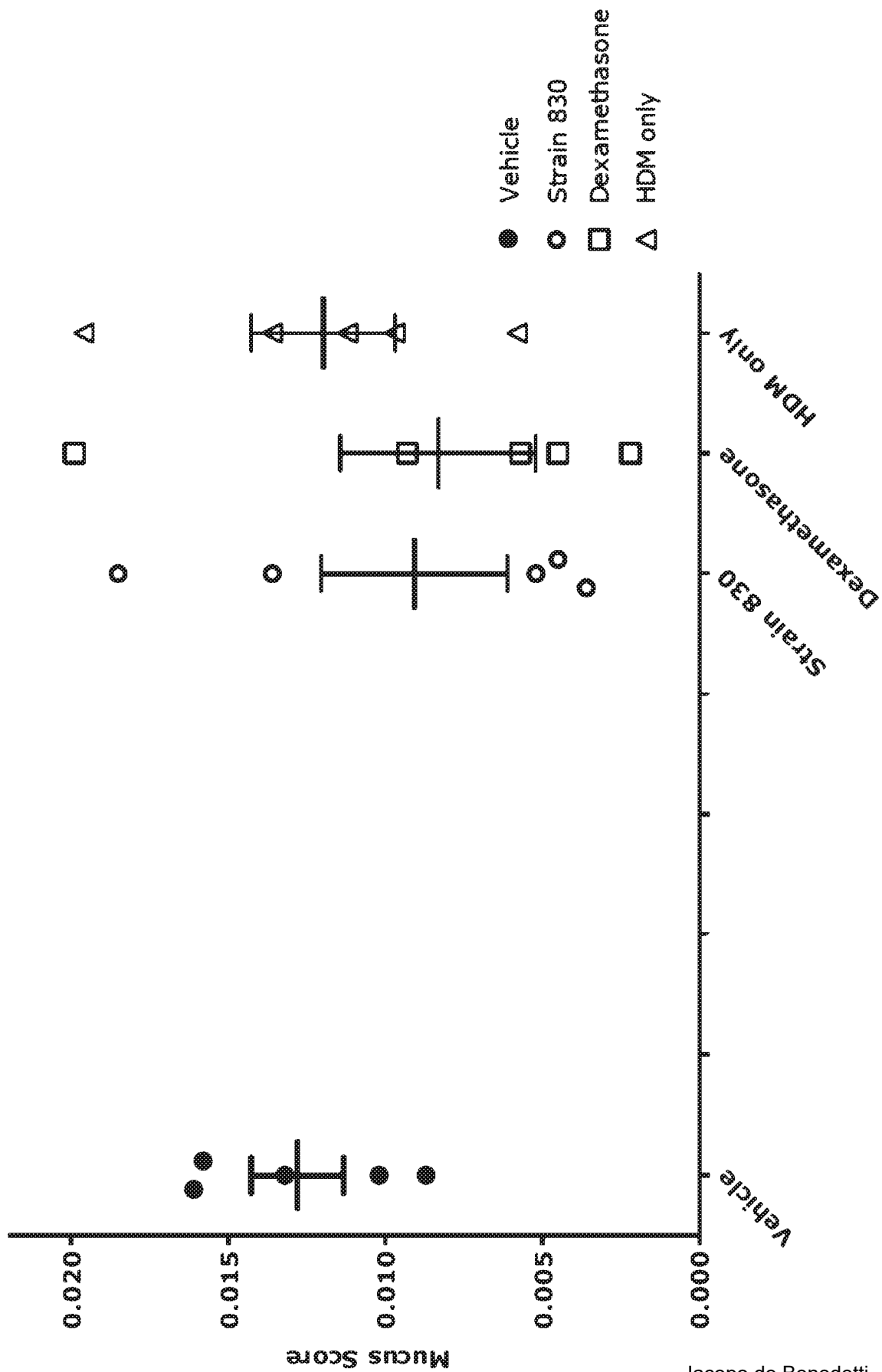


FIG. 35
IL-9 level in lung tissue

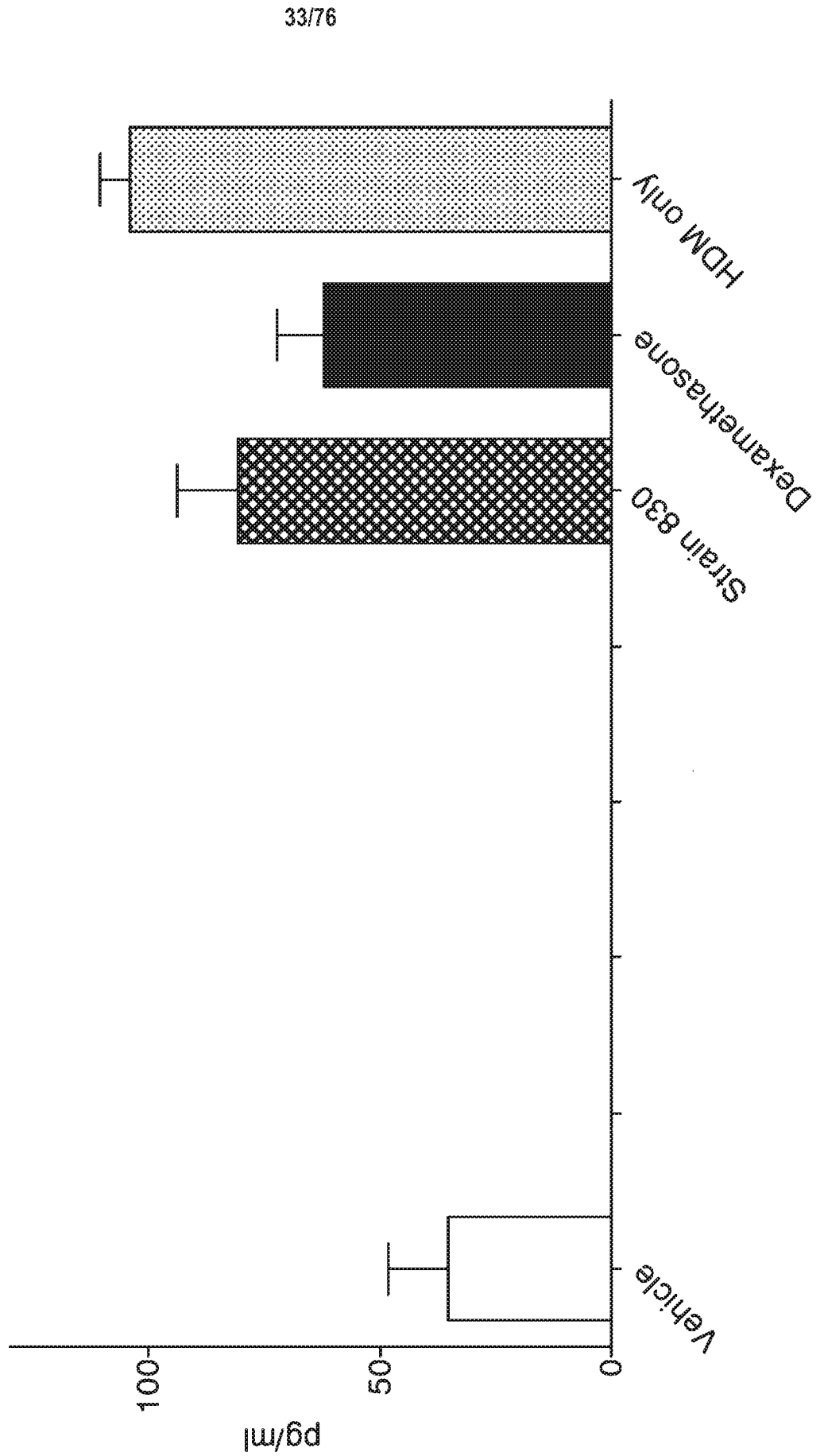


FIG. 36
IL-1a level in lung tissue

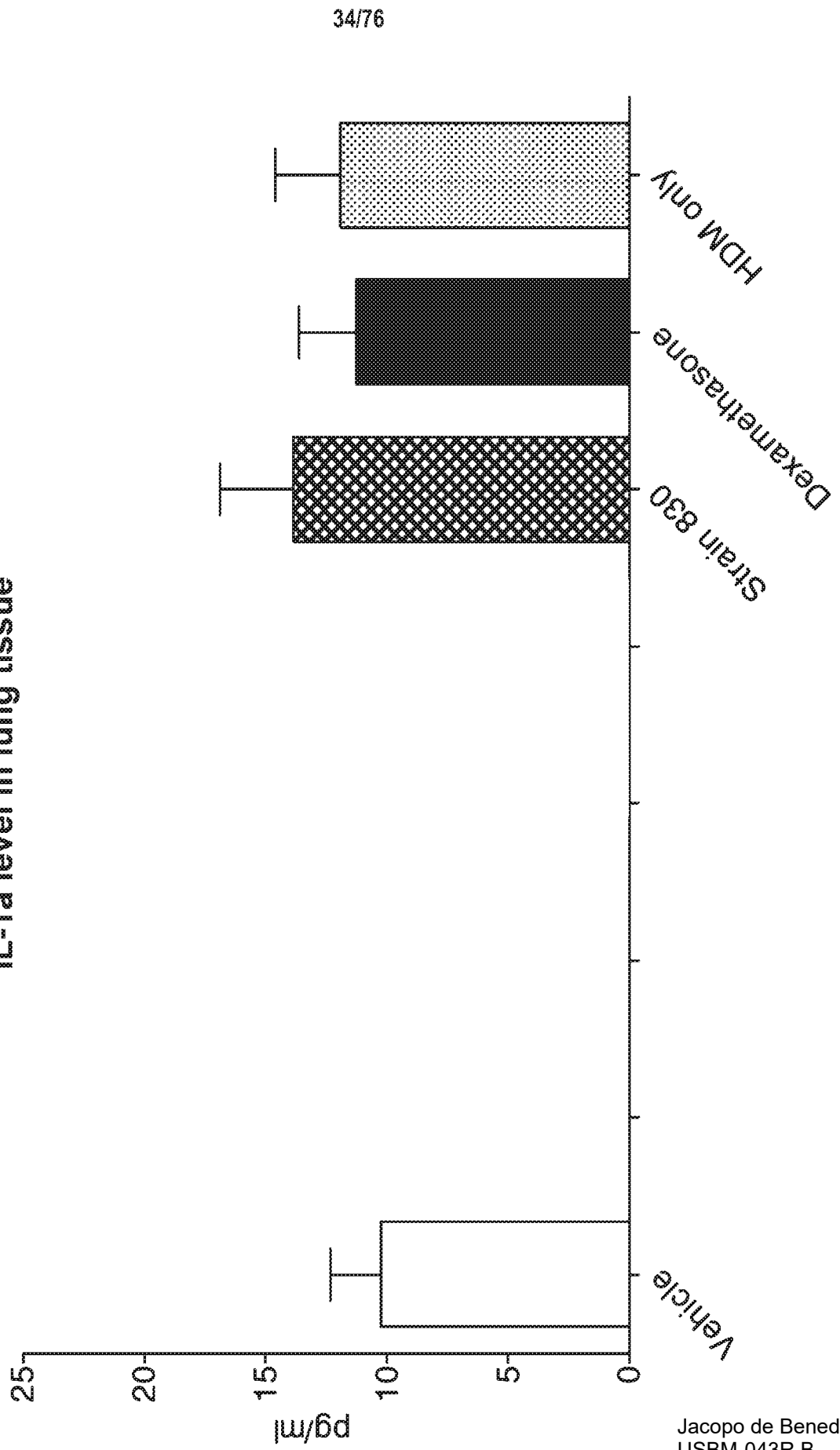


FIG. 37
IFNg level in lung tissue

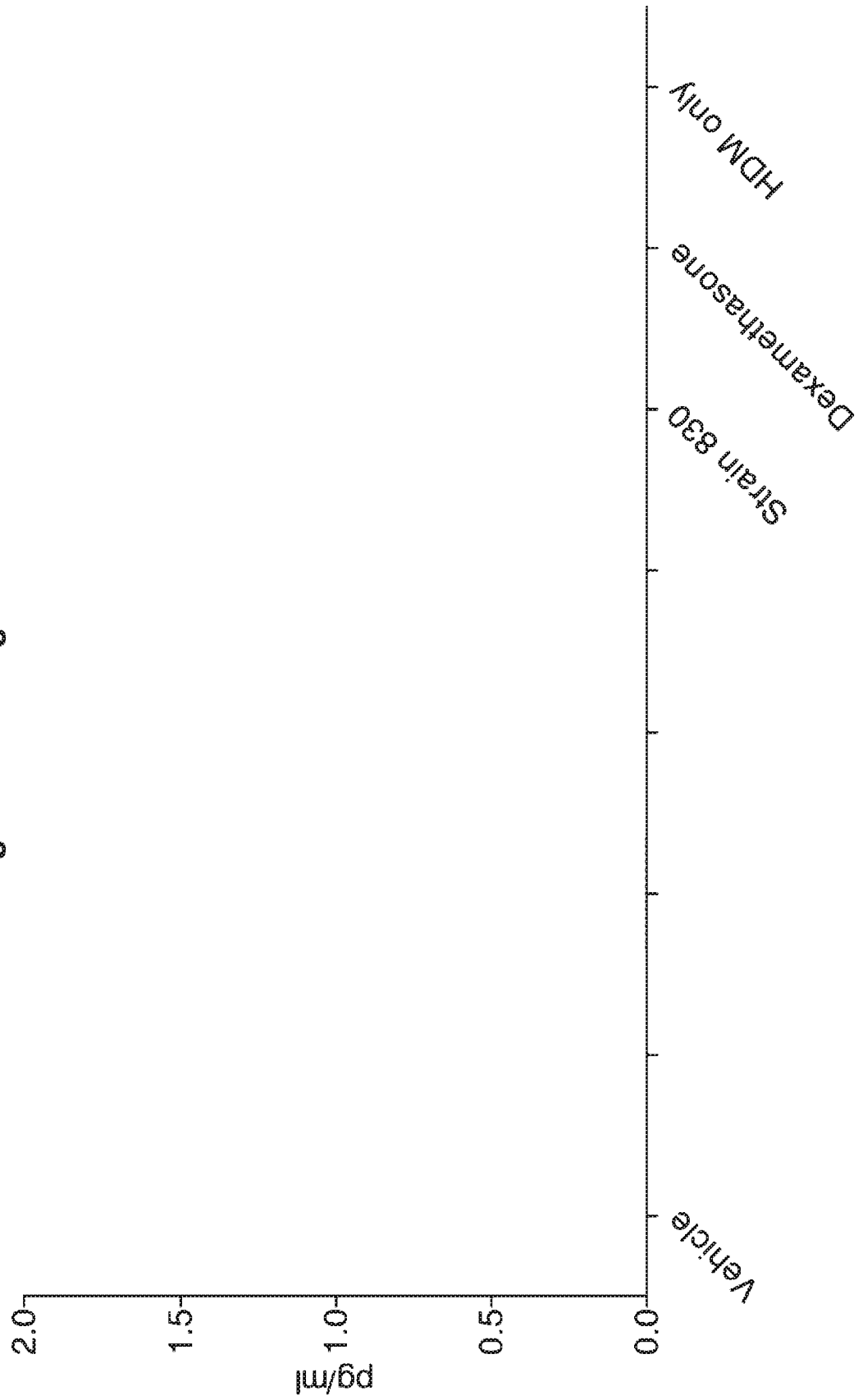


FIG. 38
IL-17A level in lung tissue

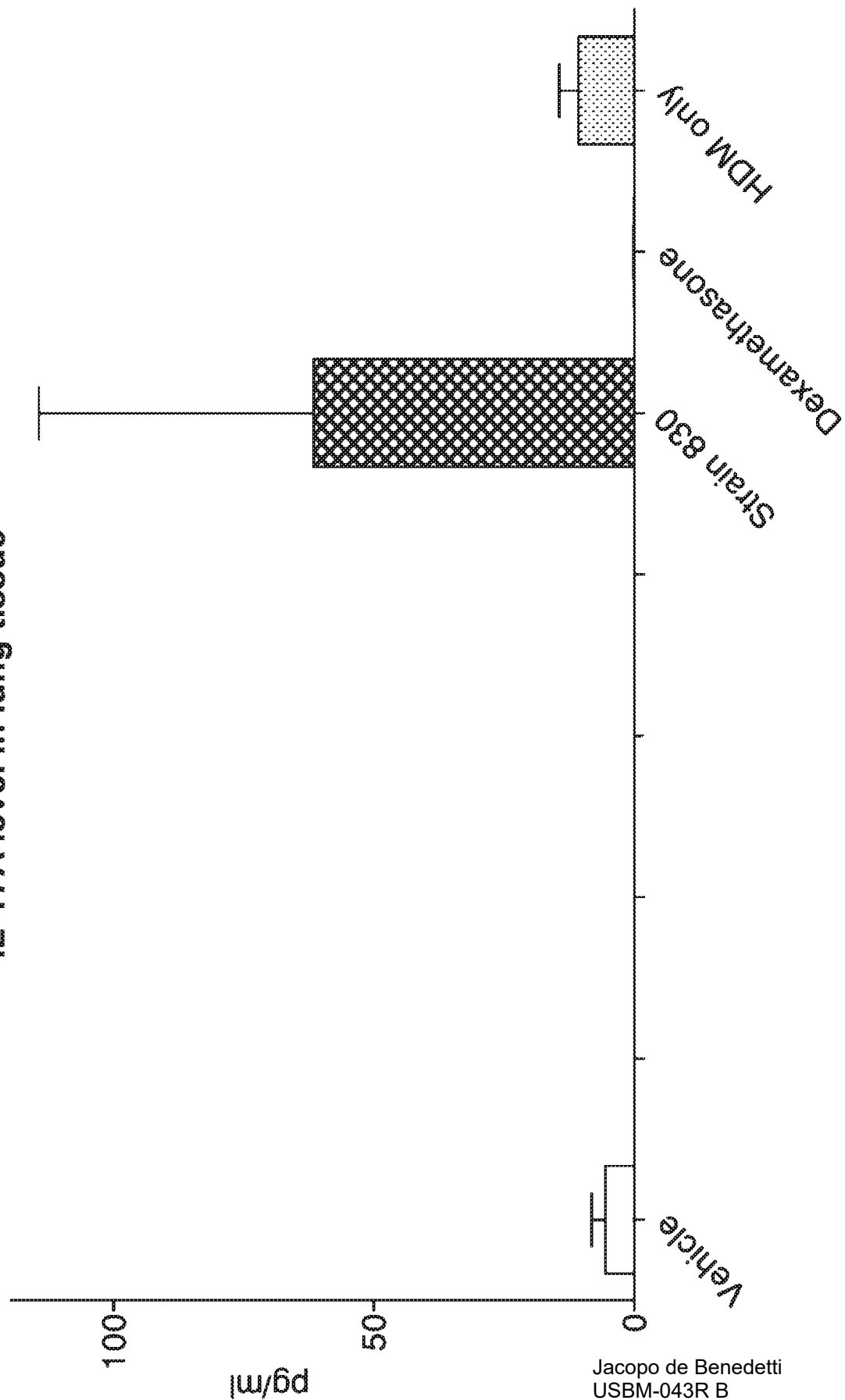


FIG. 39

IL-4 level in lung tissue

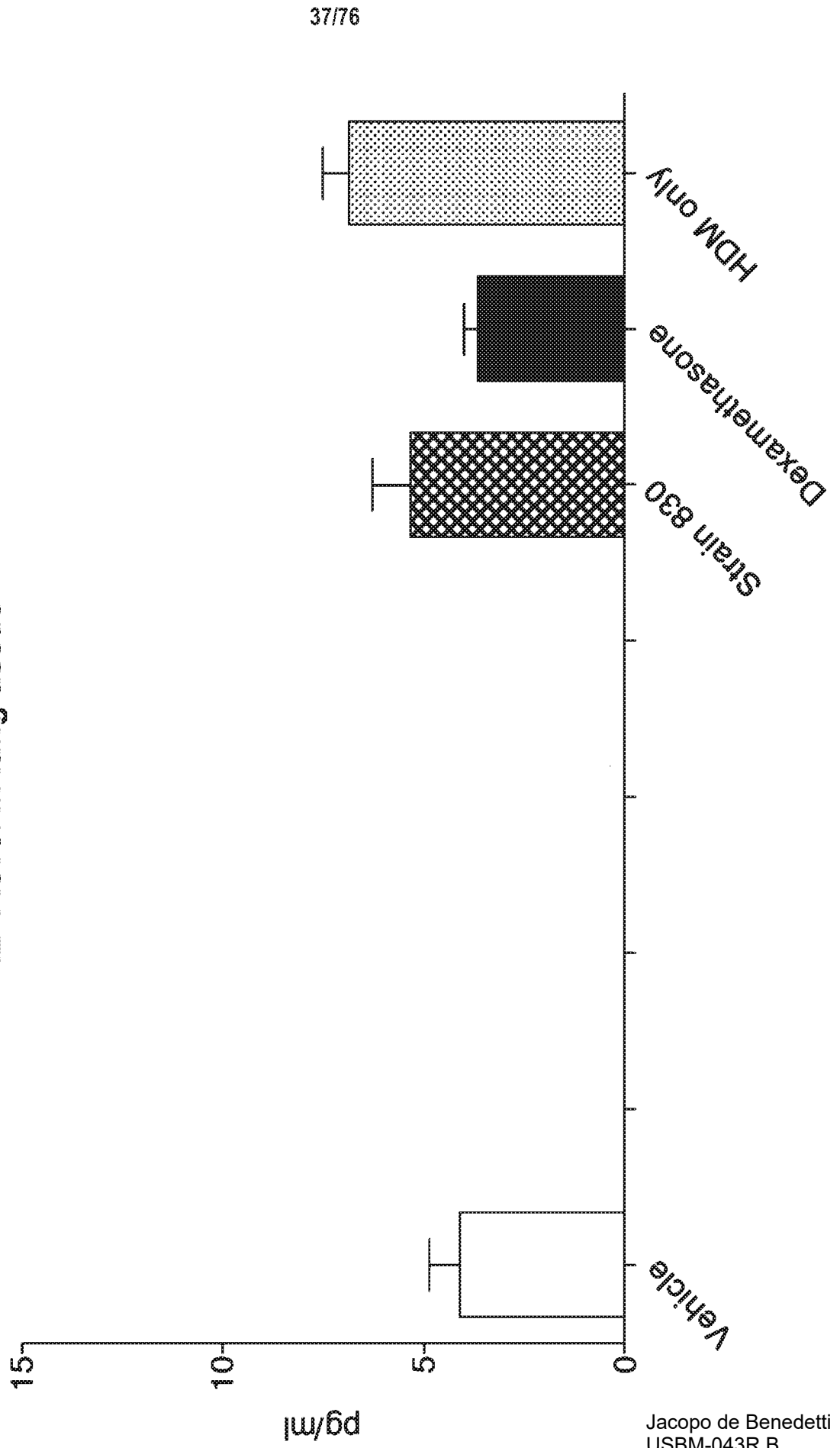


FIG. 40
IL-5 level in lung tissue

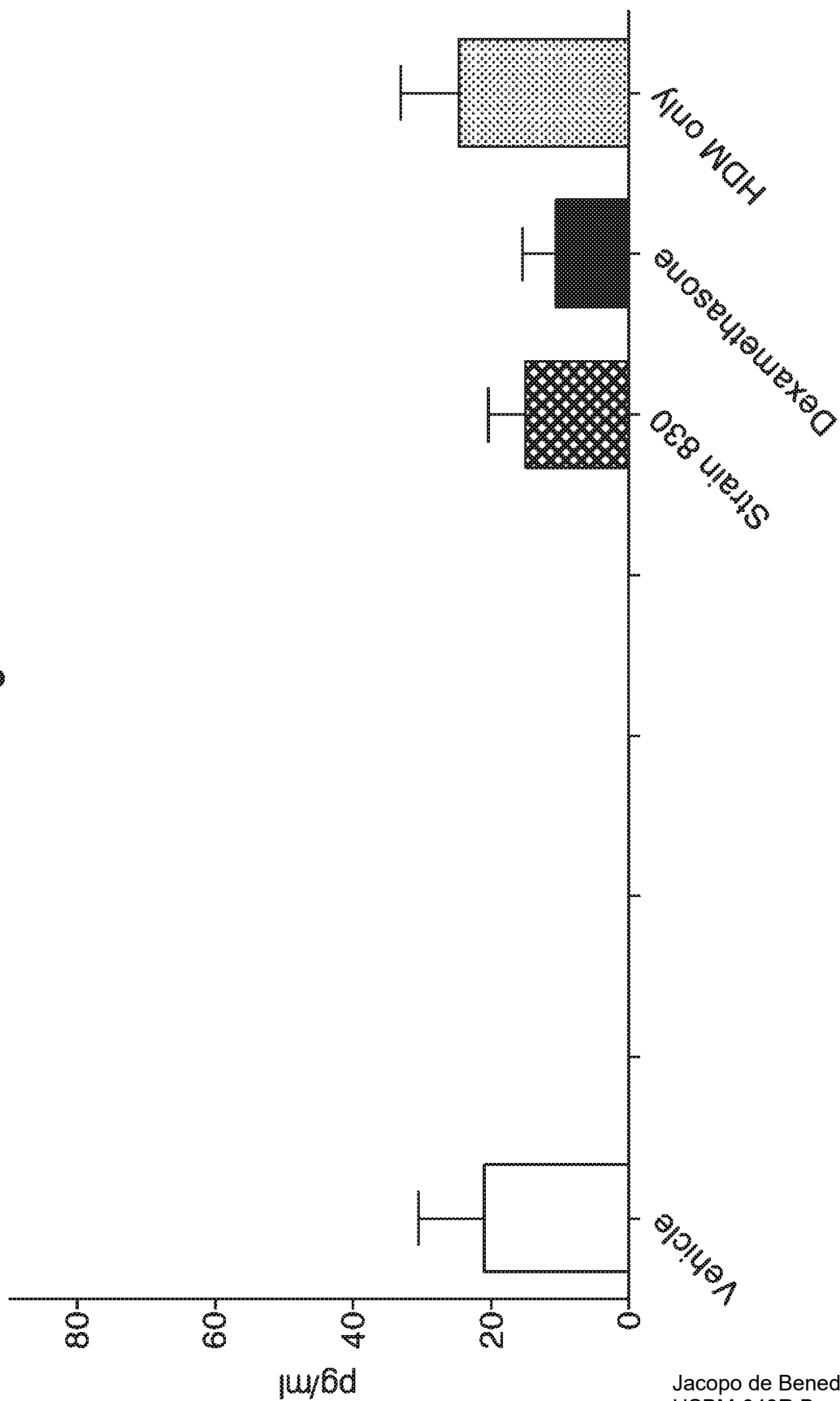


FIG. 41
IL-1b level in lung tissue

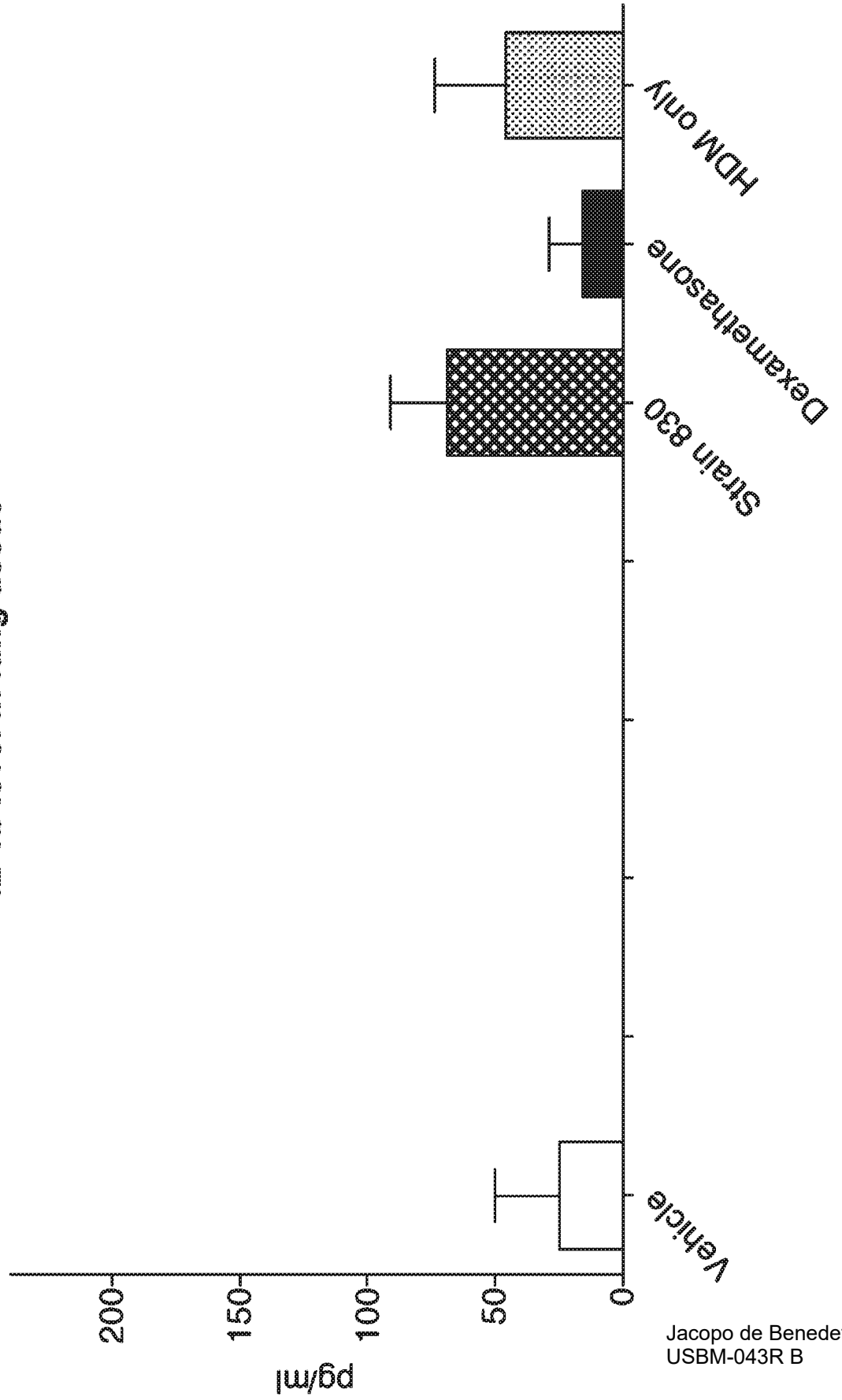


FIG. 42
RANTES level in lung tissue

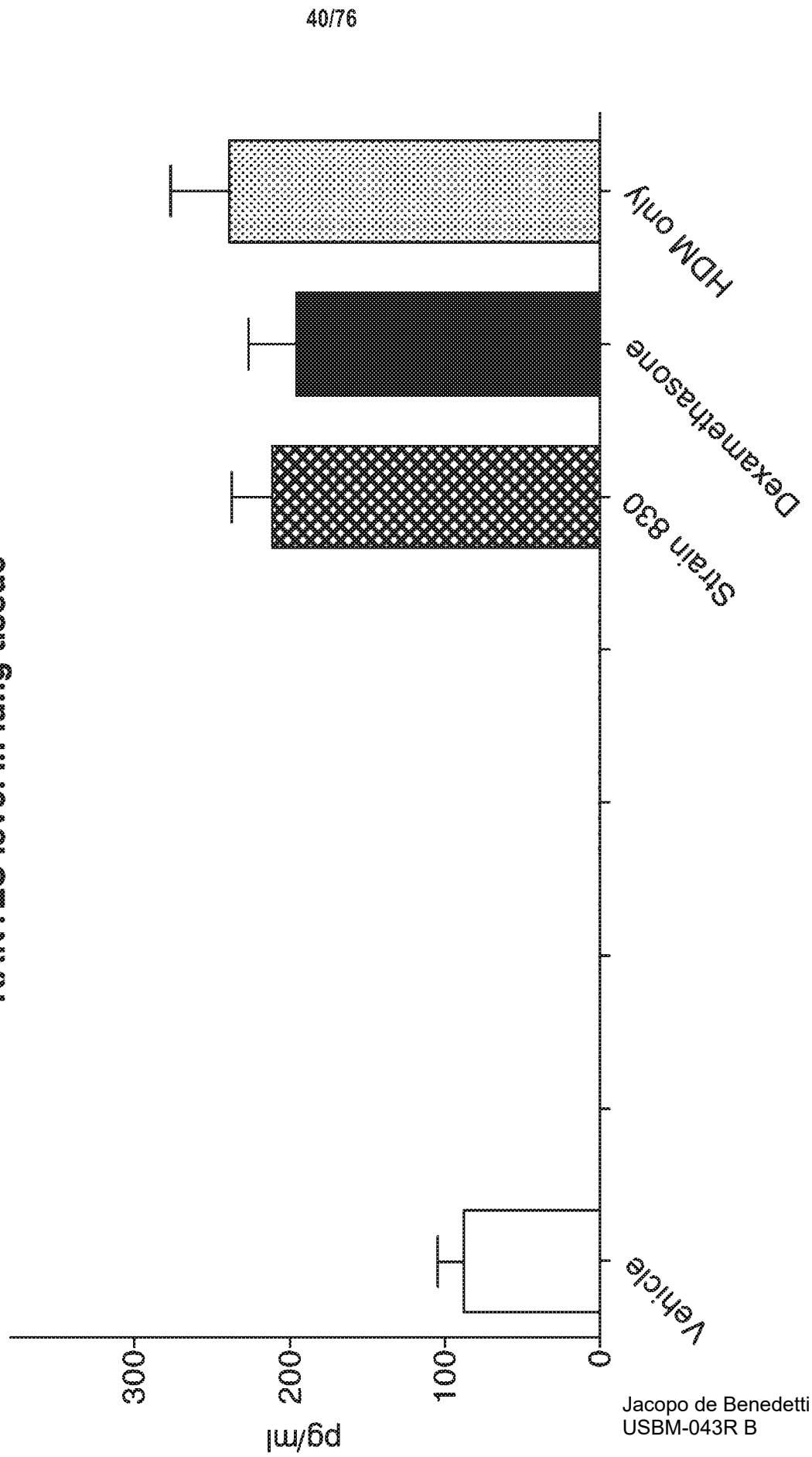


FIG. 43
MIP-1a level in lung tissue

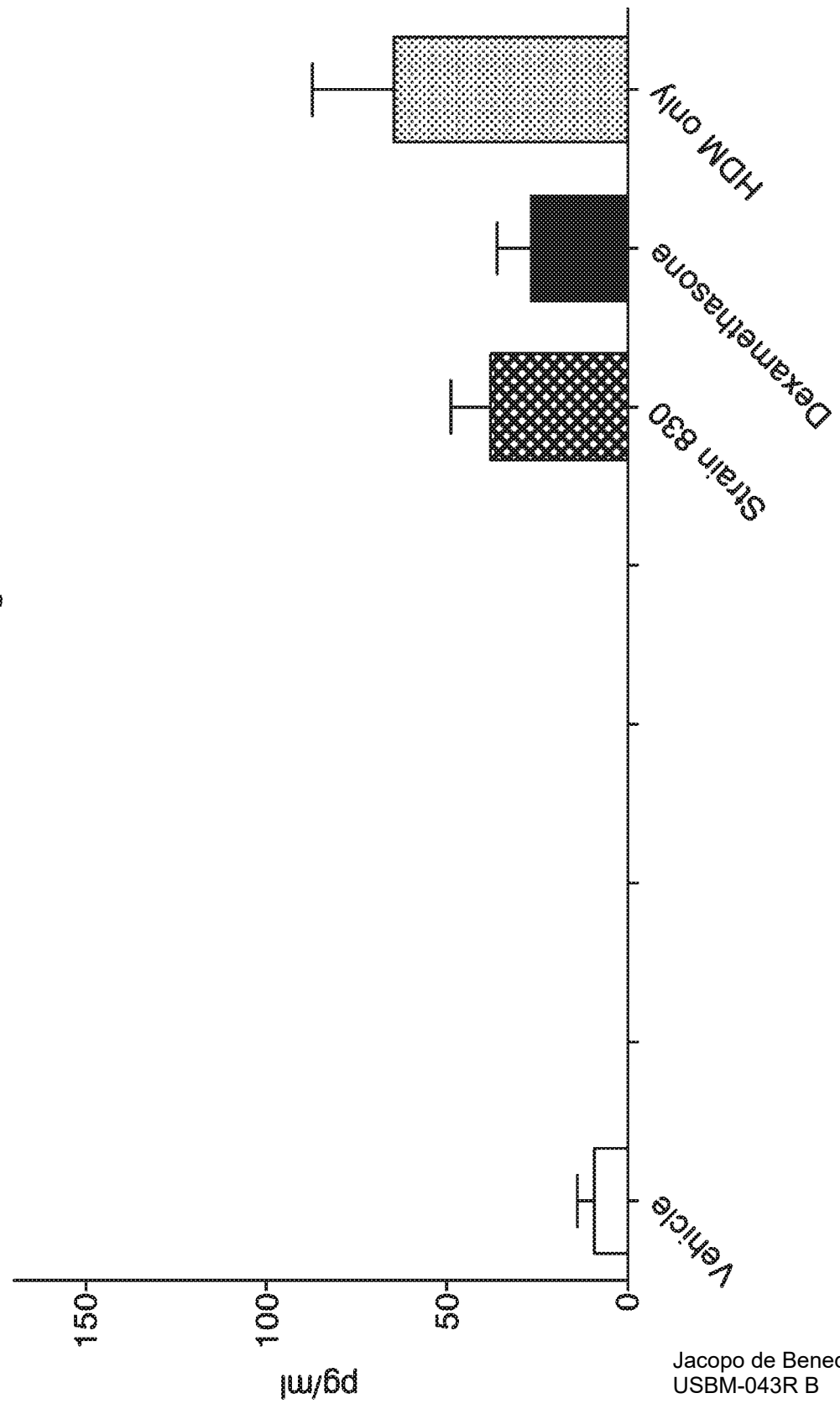


FIG. 44
KC level in lung tissue

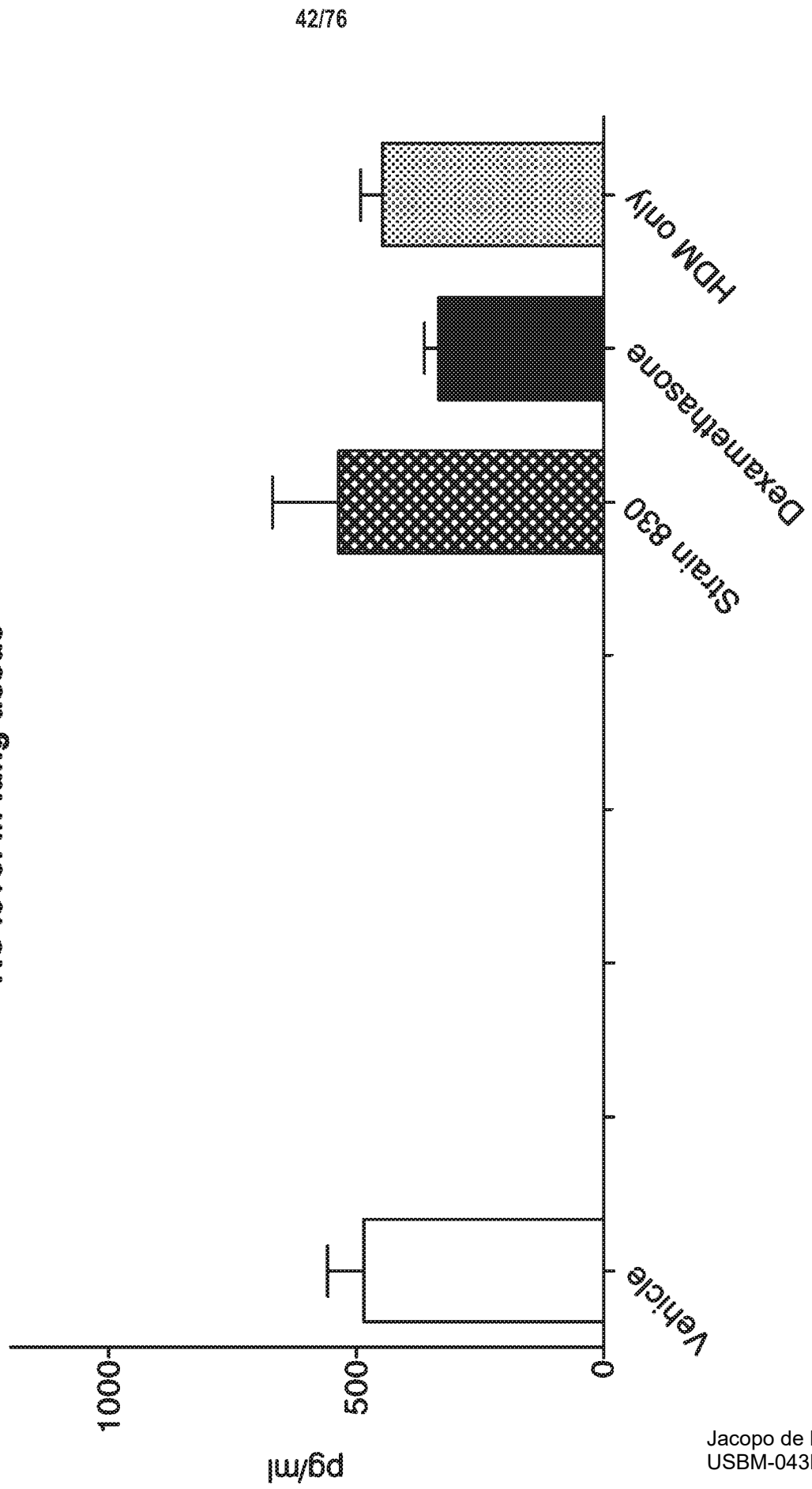


FIG. 45
MIP-2 level in lung tissue

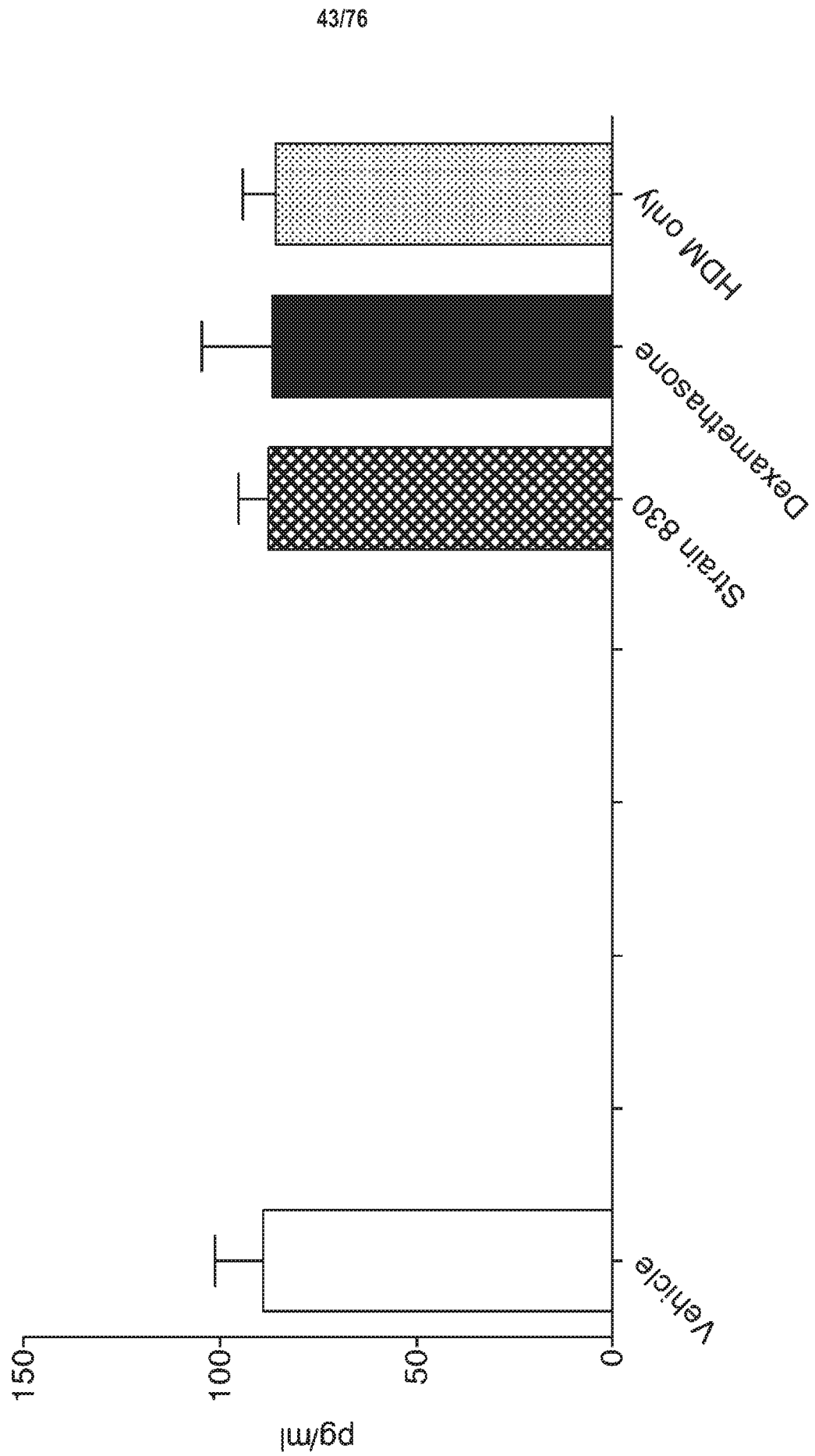


FIG. 46 HDM specific IgG1 in Serum

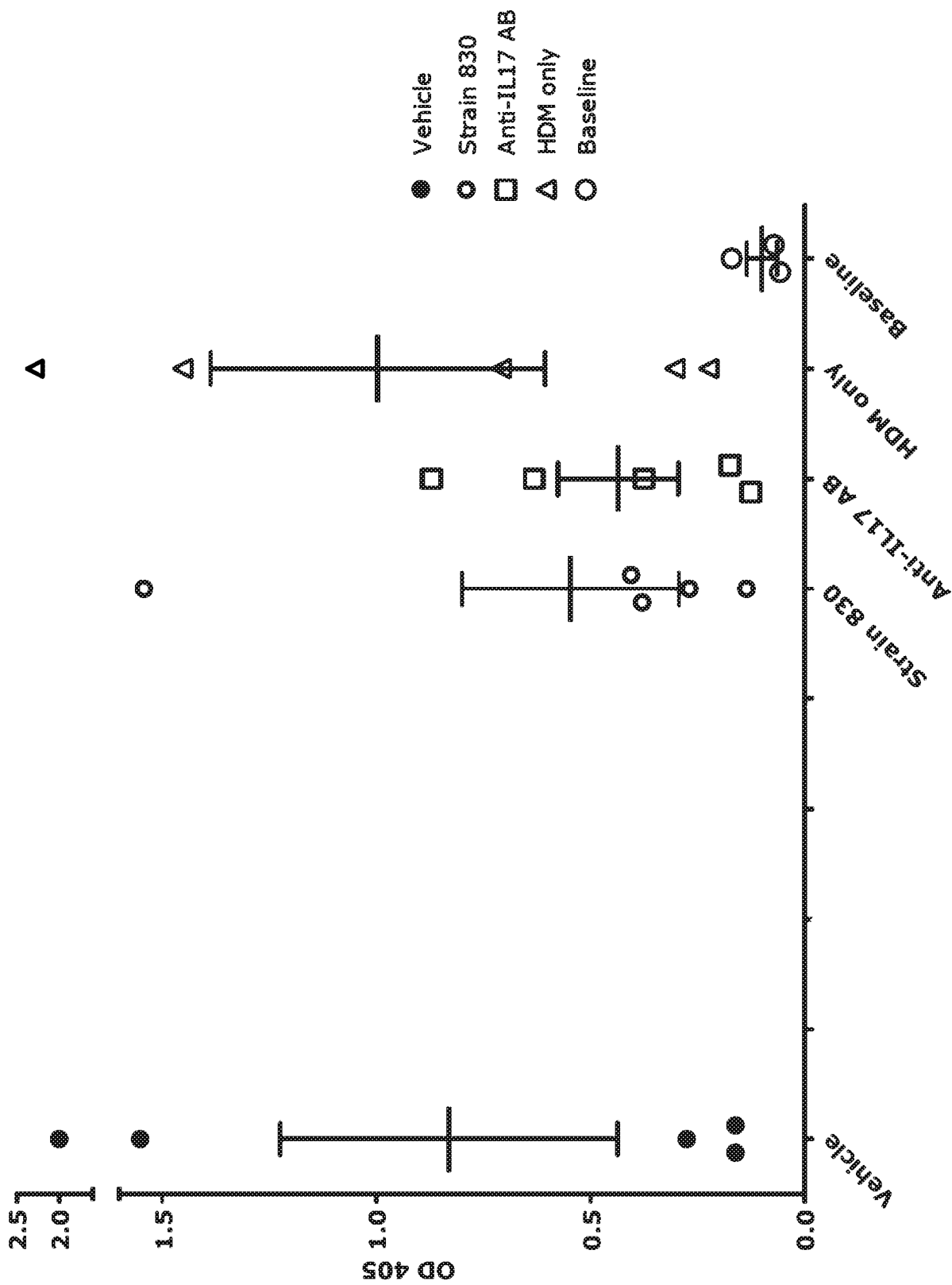


FIG. 47 HDM specific IgG2a in Serum

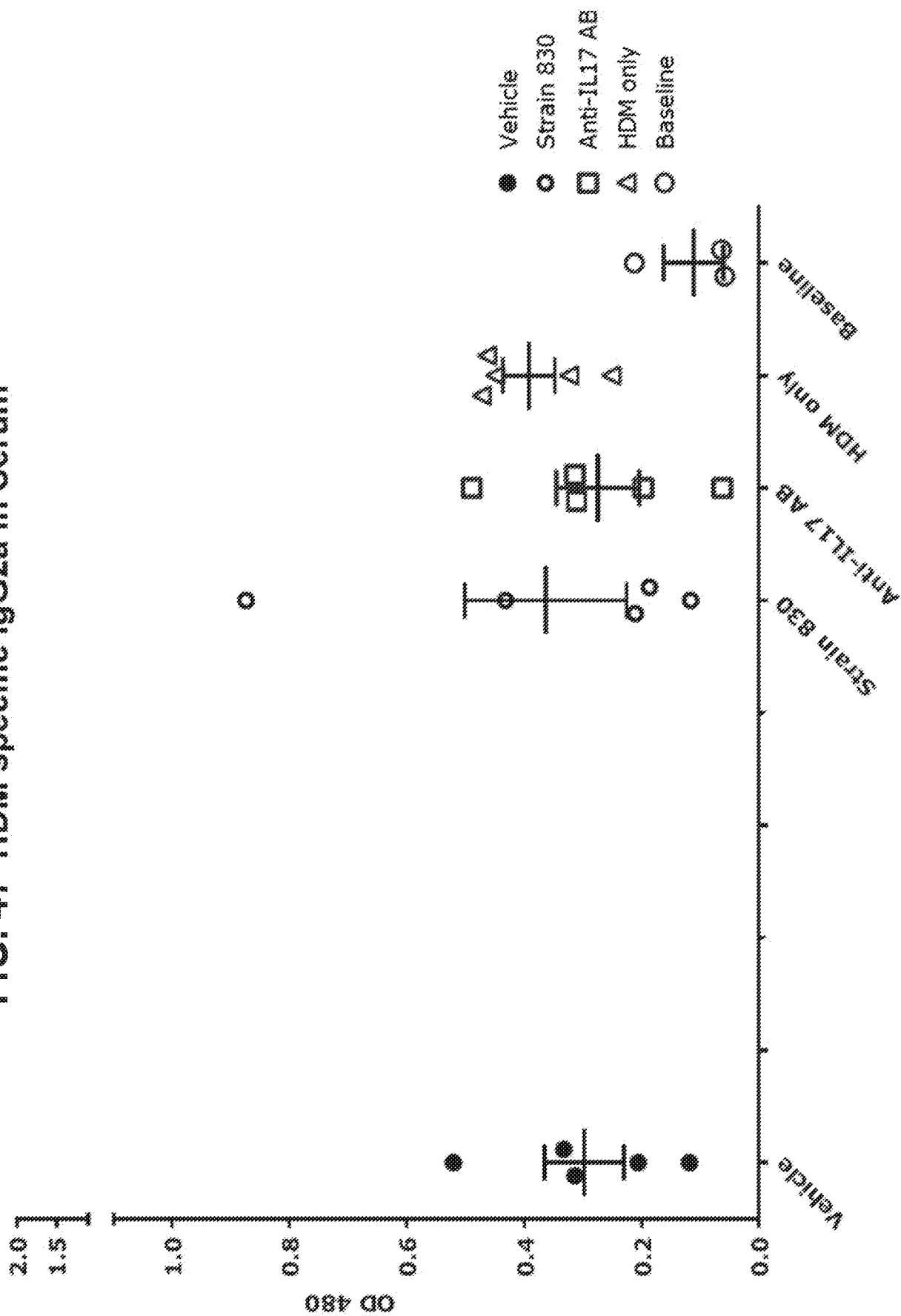


FIG. 48 HDM specific IgG1 in BALF

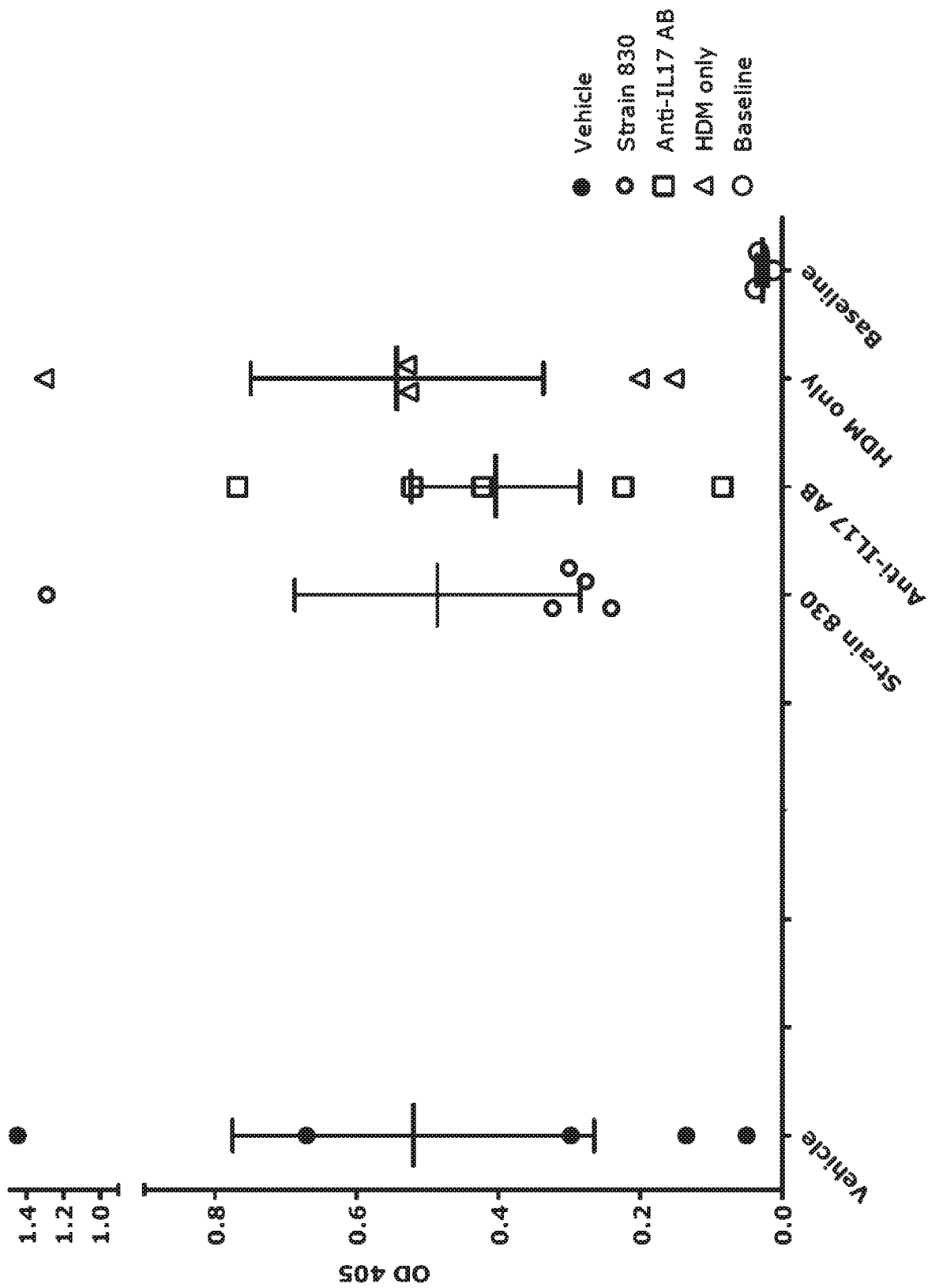


FIG. 49 HDM specific IgG2a in BALF

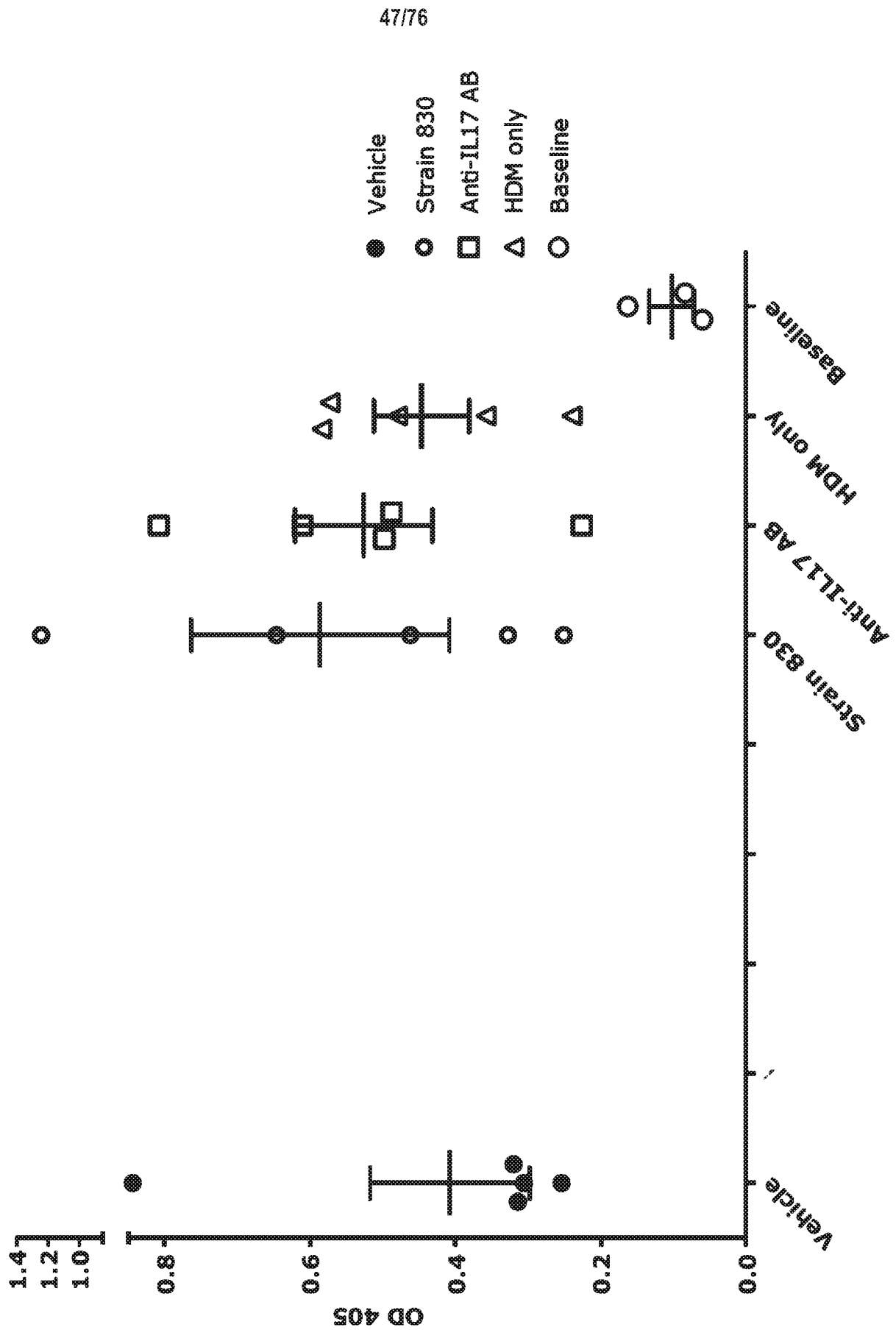
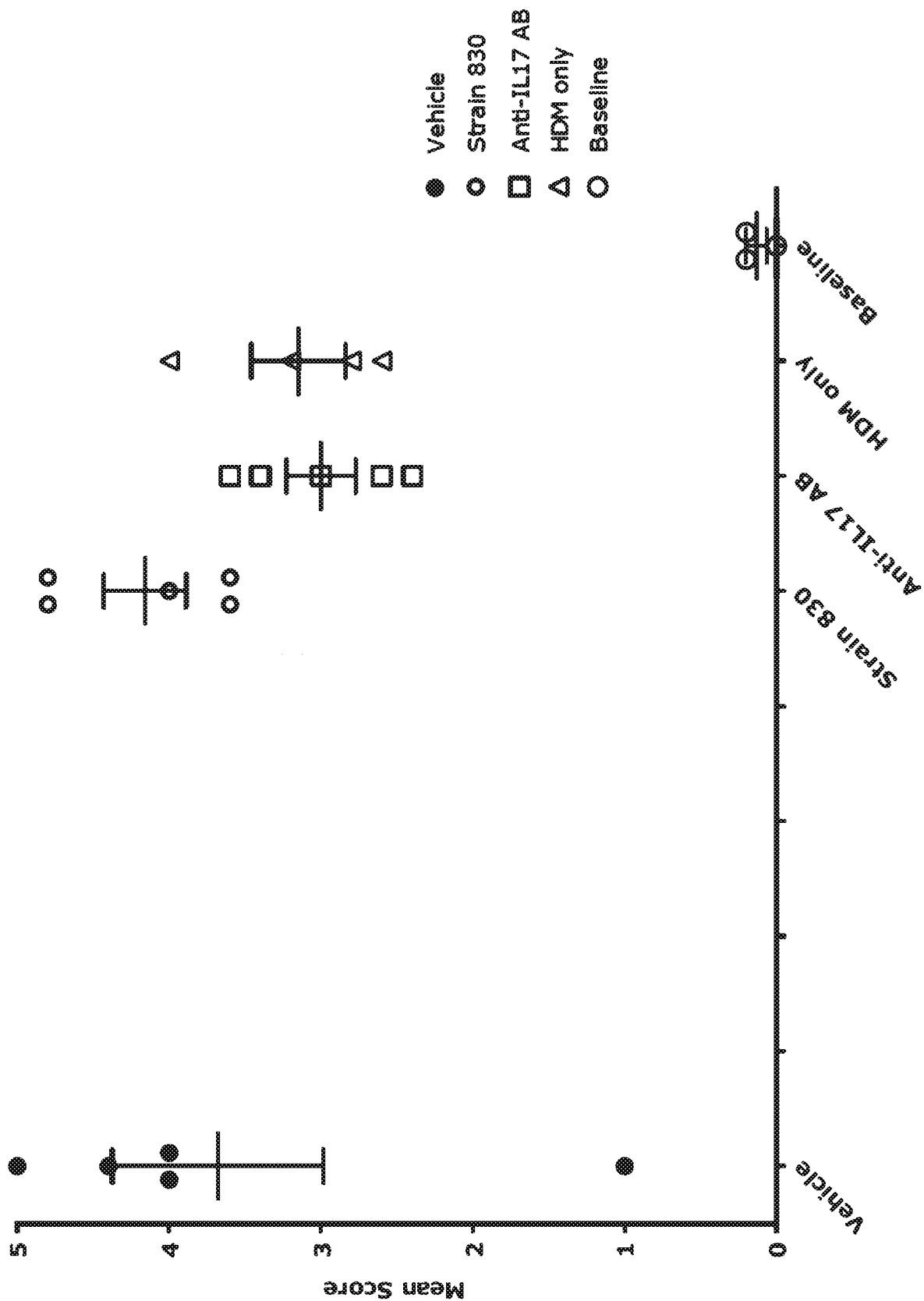


FIG. 50 Histological Analysis – Mean Peribronchiolar Infiltration Score



**FIG. 52 Histological Analysis - Mean Inflammatory Score
(Average of both Peribronchiolar and
Perivascular Infiltration Score)**

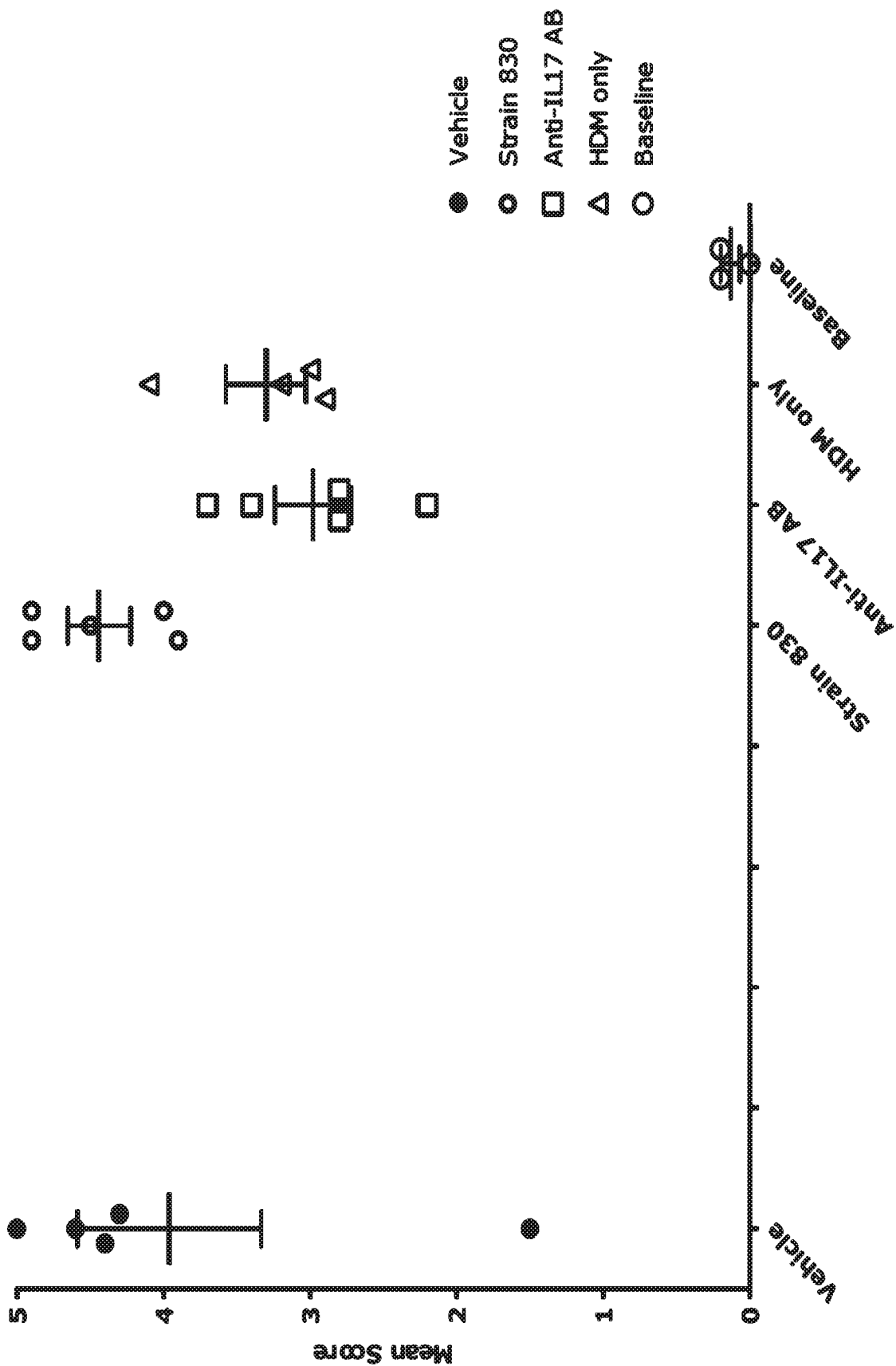


FIG. 53
TNFa level in lung tissue

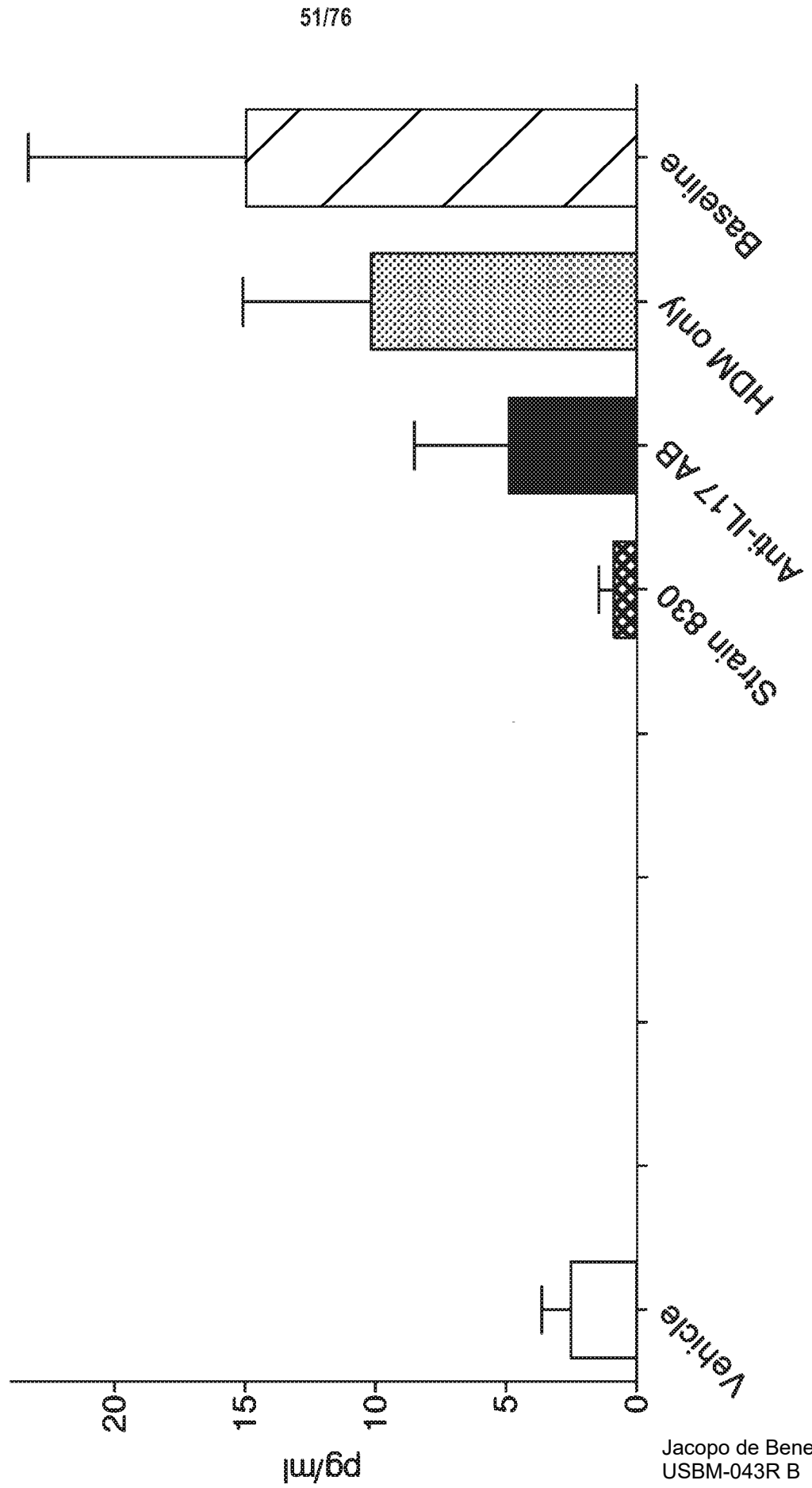


FIG. 54
IL-1a level in lung tissue

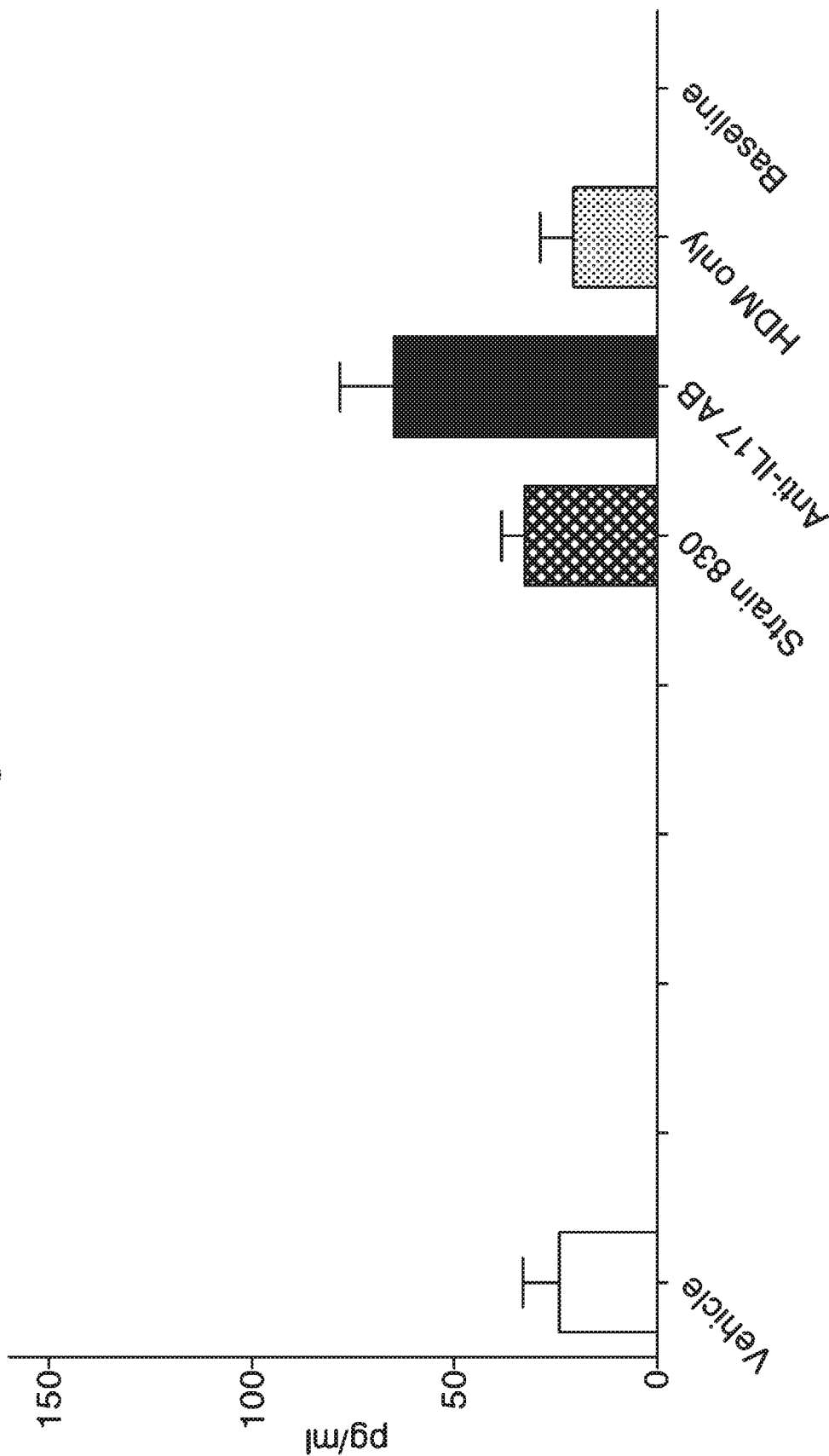


FIG. 55
IFNg level in lung tissue

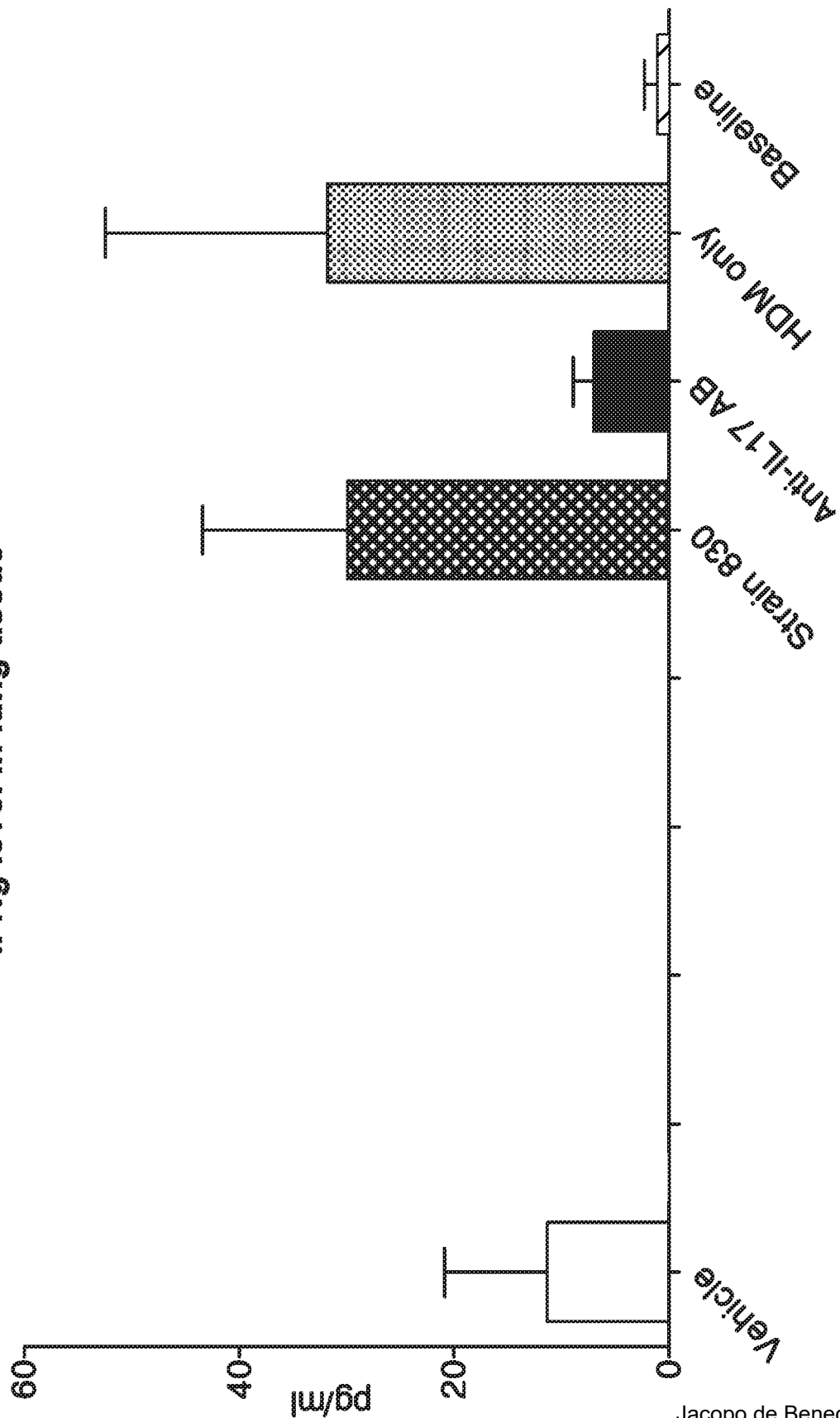


FIG. 56
IL-17F level in lung tissue

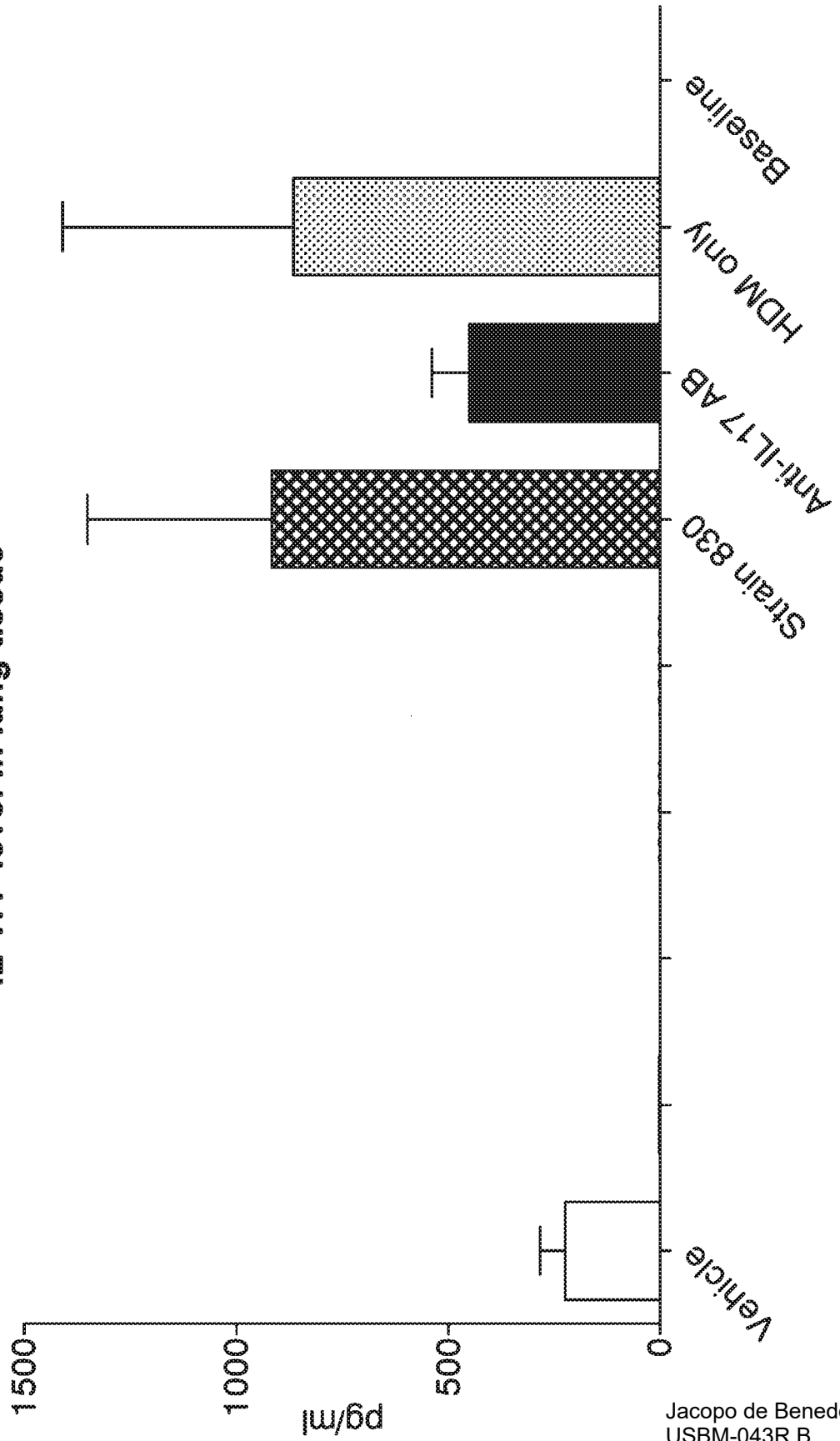


FIG. 57
IL-1b level in lung tissue

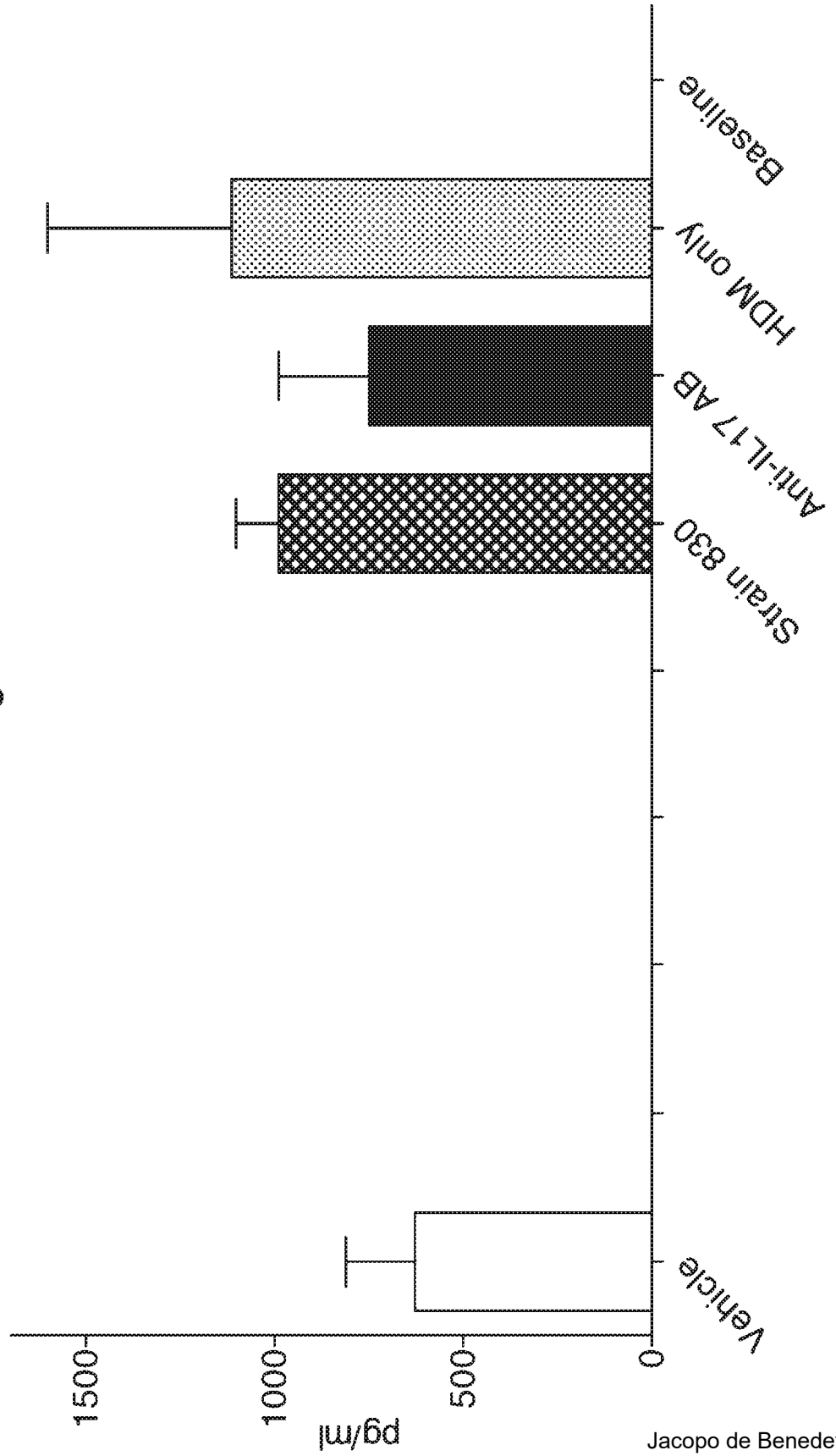


FIG. 58

RANTES level in lung tissue

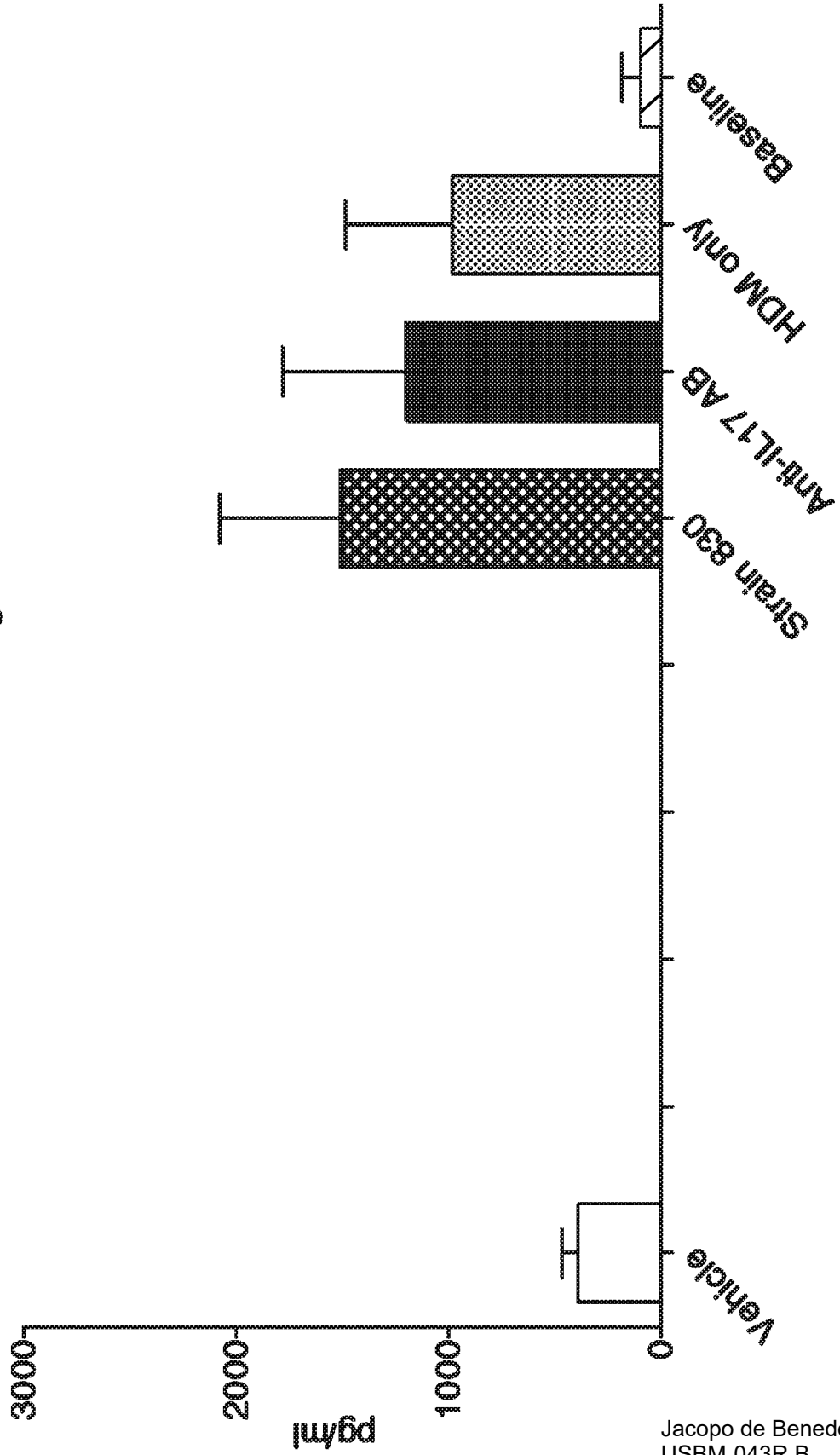


FIG. 59
MIP-2 level in lung tissue

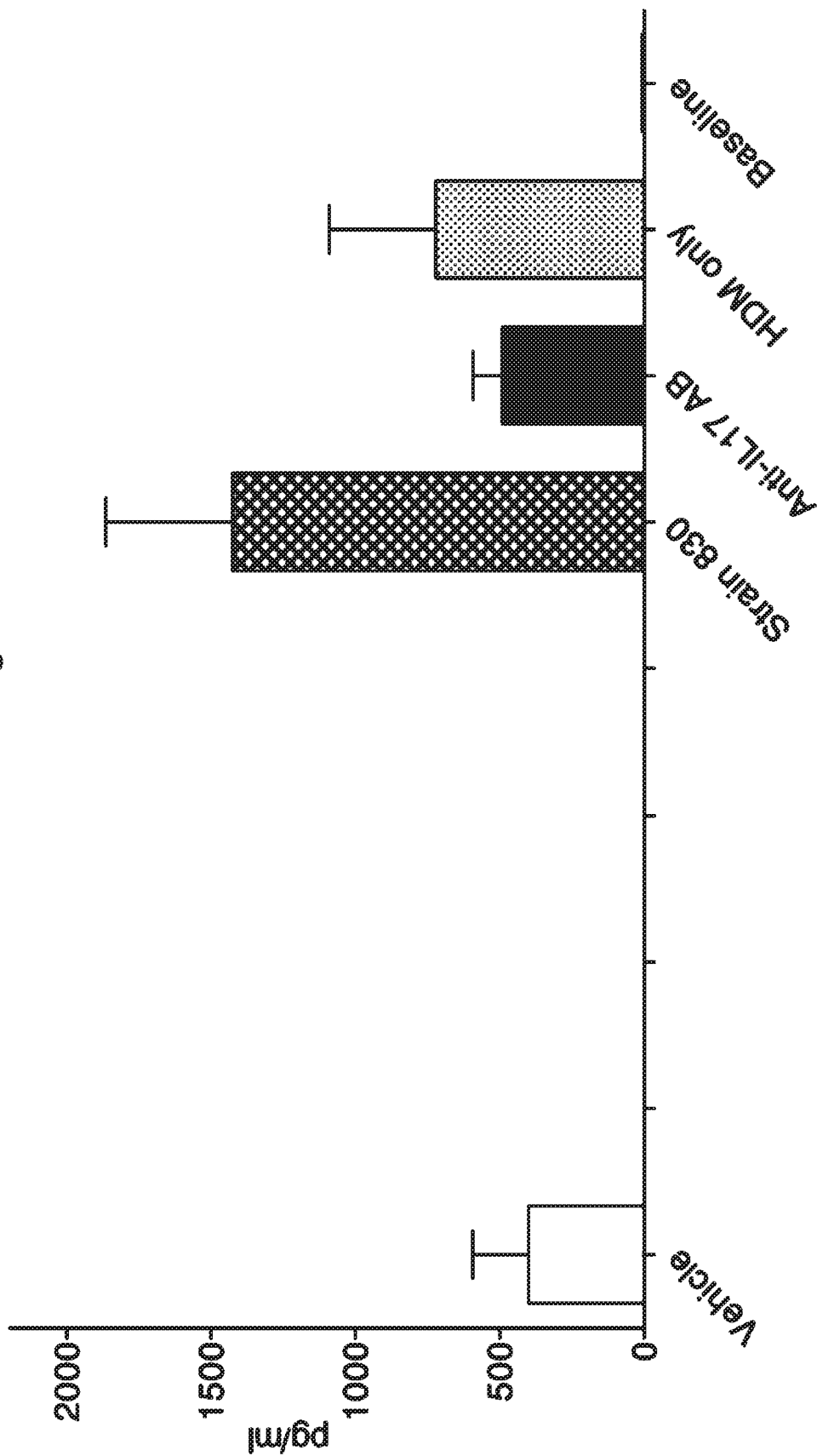


FIG. 60
KC level in lung tissue

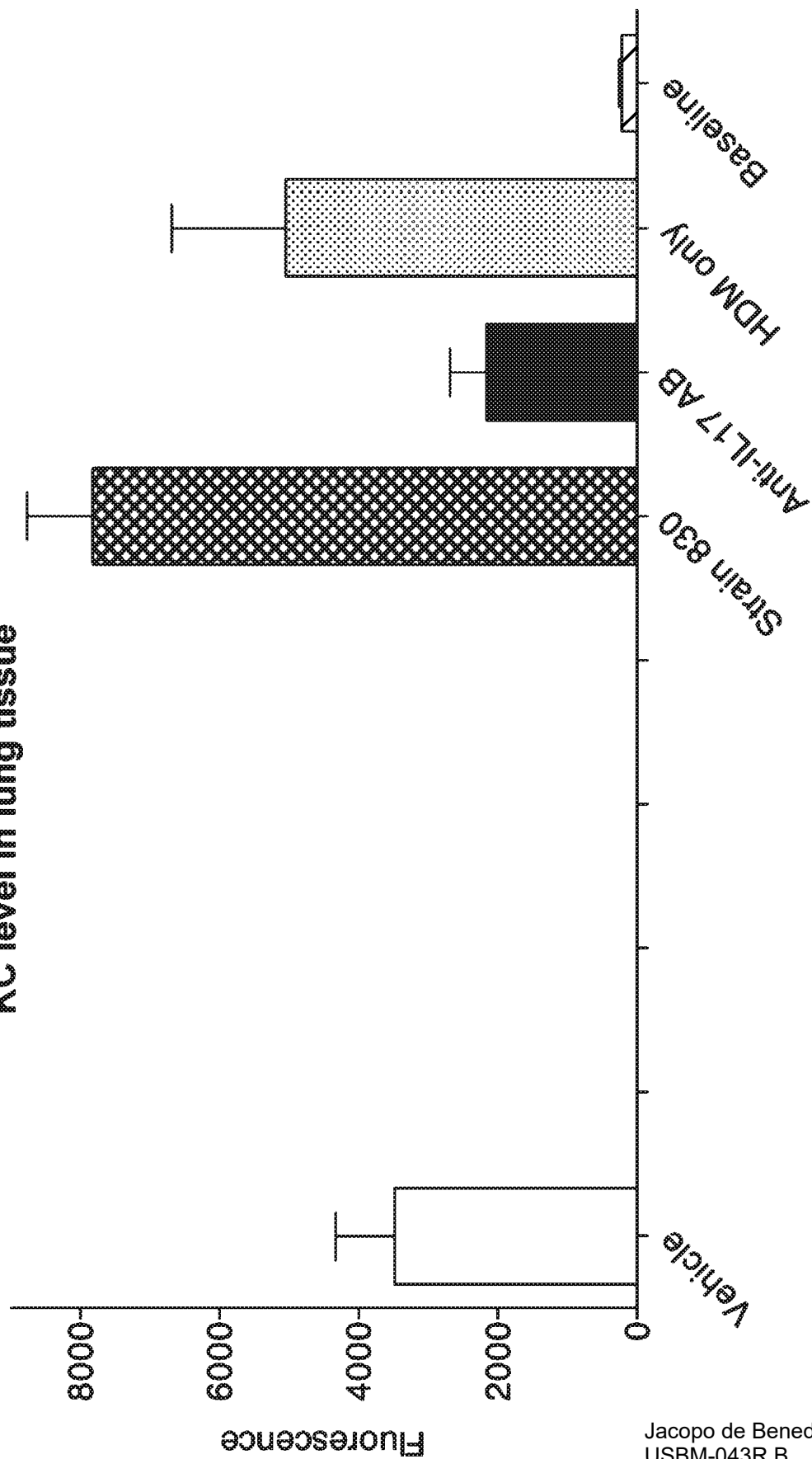


FIG. 61
IL-17A level in lung tissue

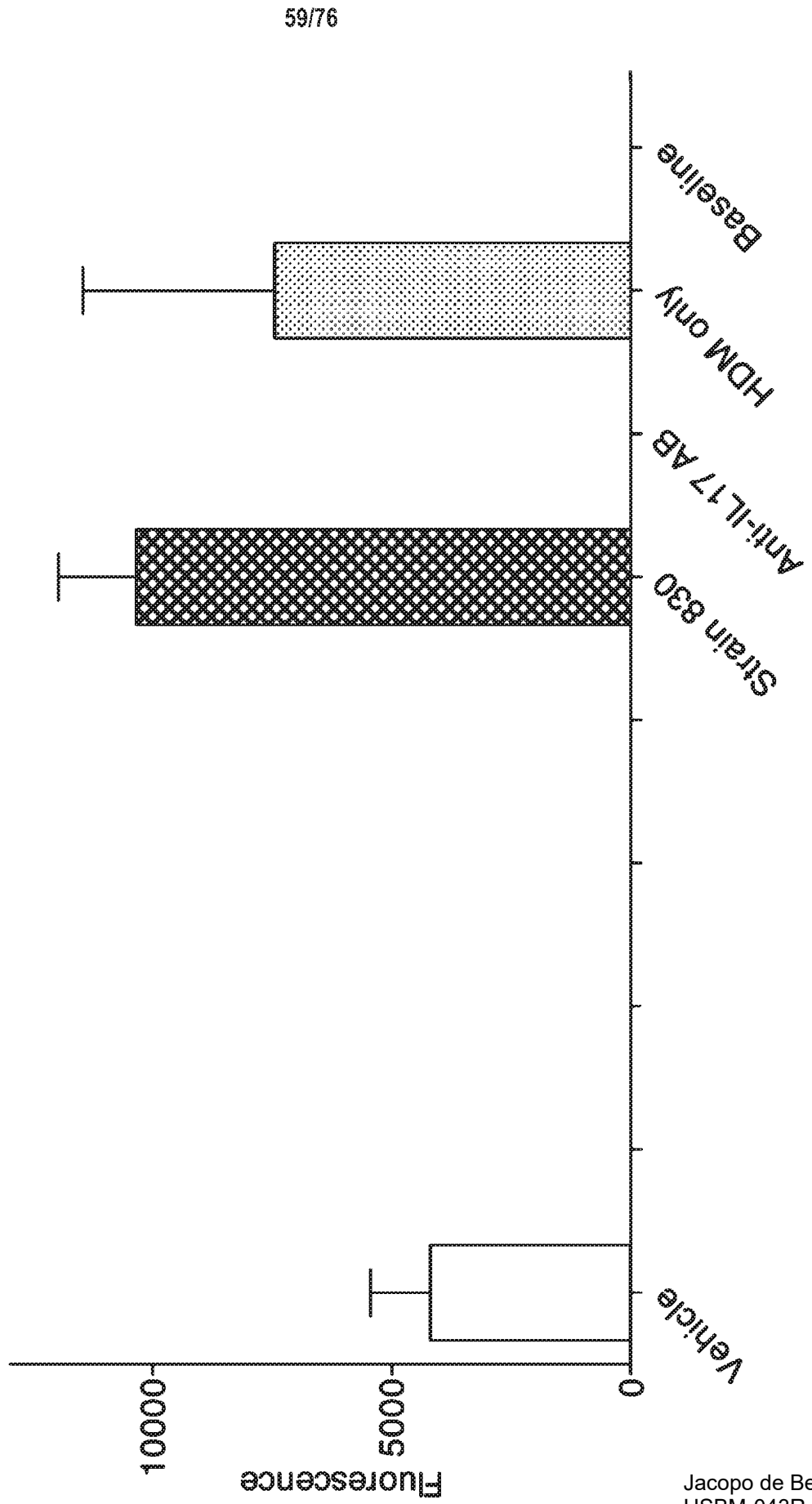


FIG. 62
MIP-1a level in lung tissue

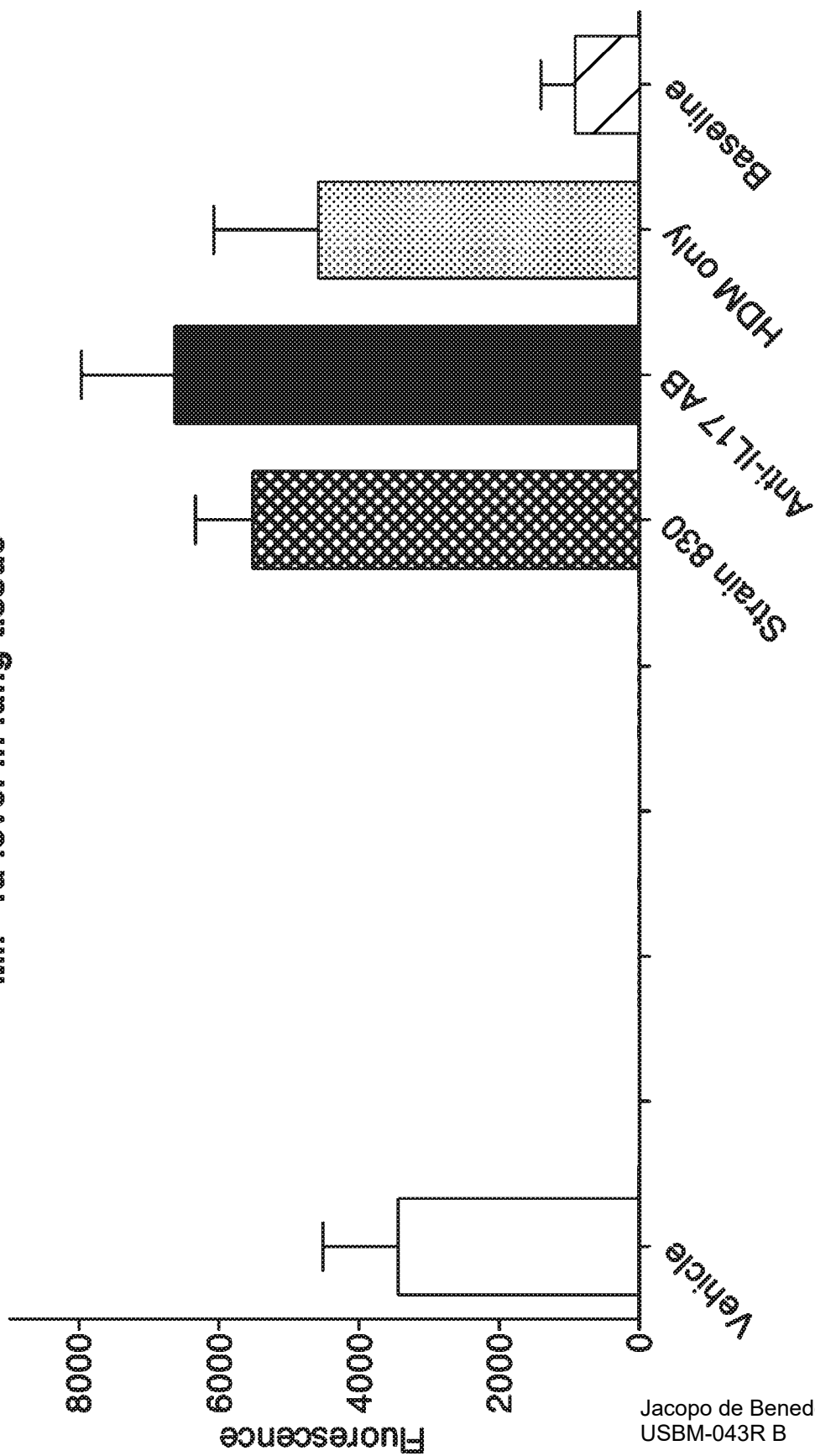


FIG. 63

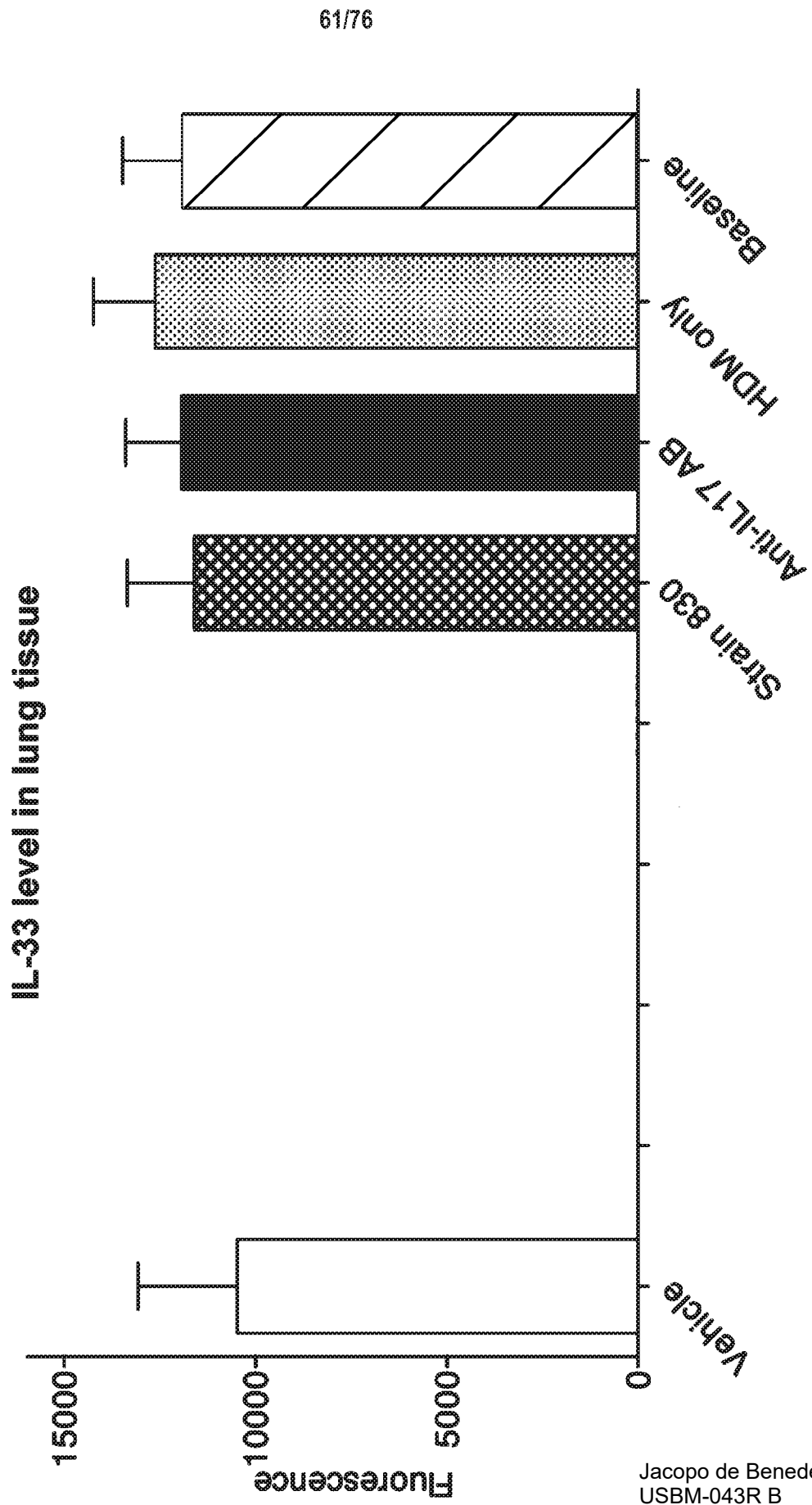
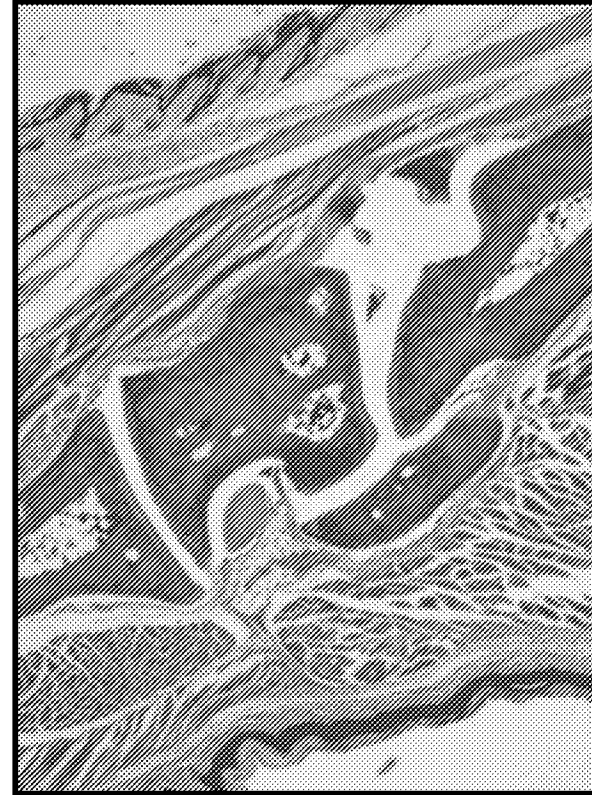
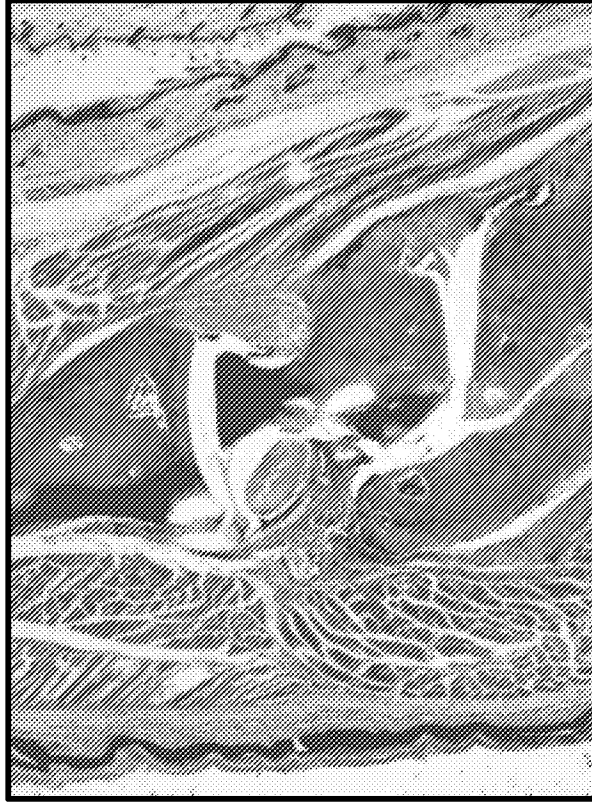


FIG. 64
Visual Template for Histopathology Scoring



Grade 0

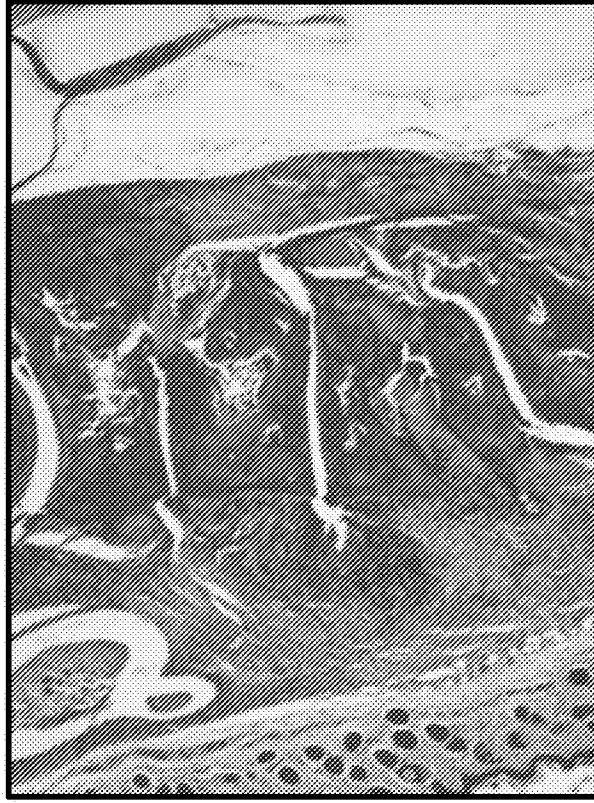


Grade 1

FIG. 64(contd.)



Grade 4



Grade 7



Grade 9

FIG. 64(contd.)

FIG. 65

Histopathology: Inflammation Scores

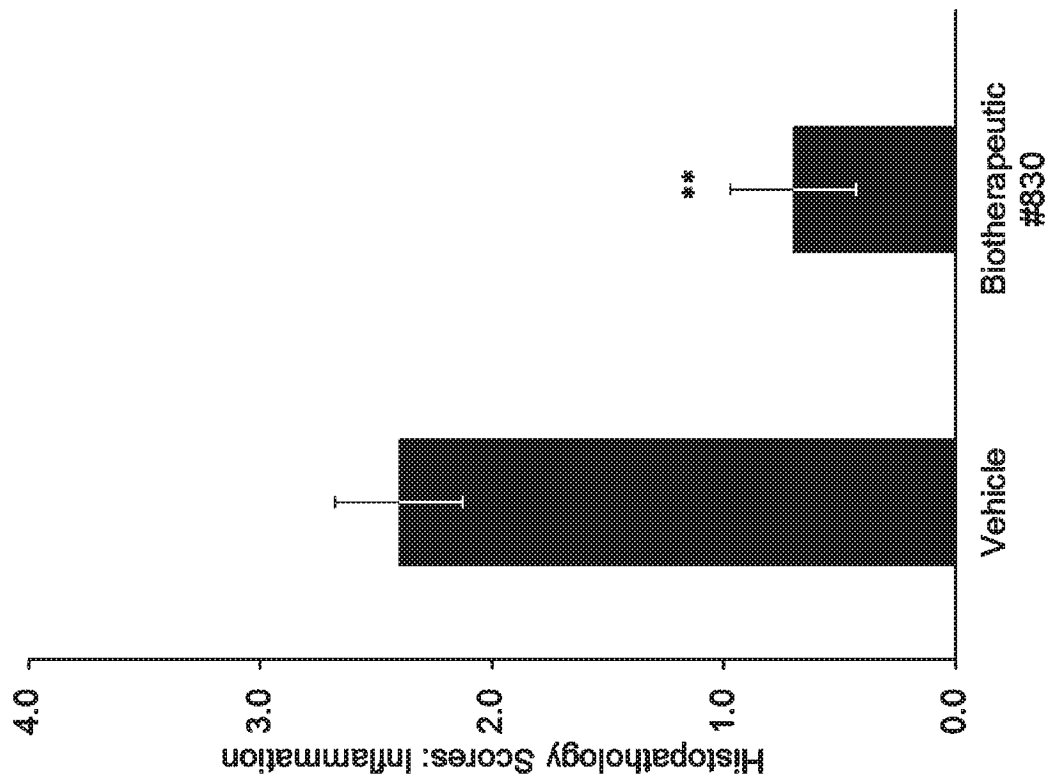


FIG. 66

Histopathology: Cartilage Scores

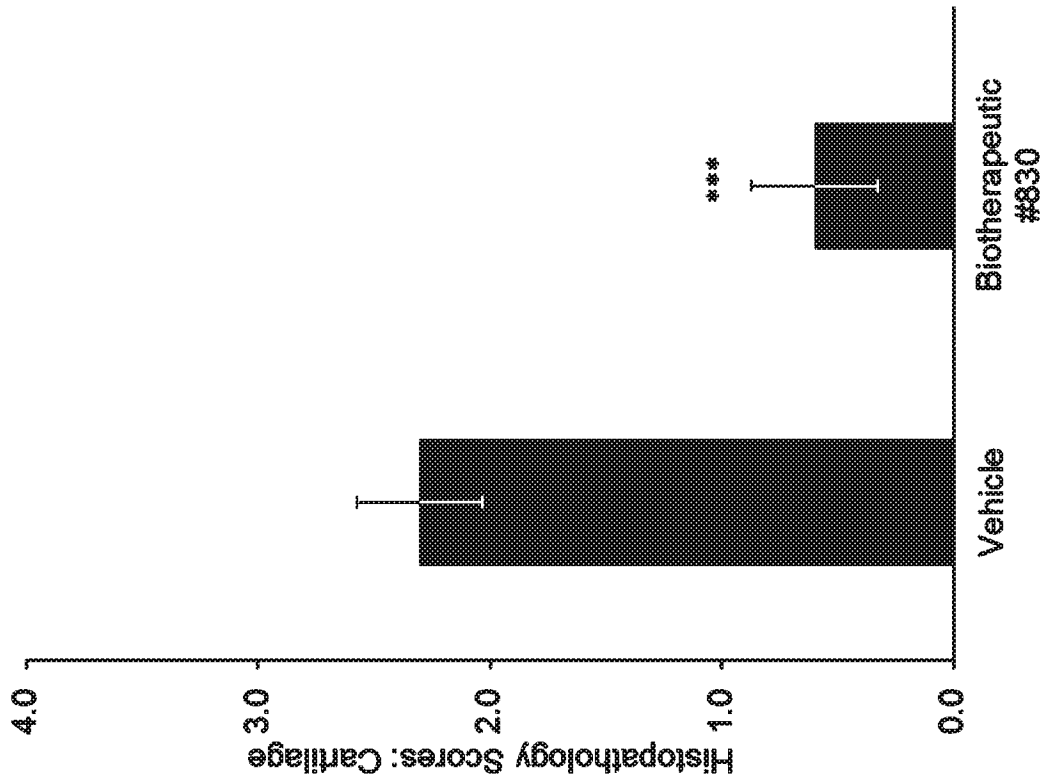


FIG. 67
Histopathology: Bone Scores

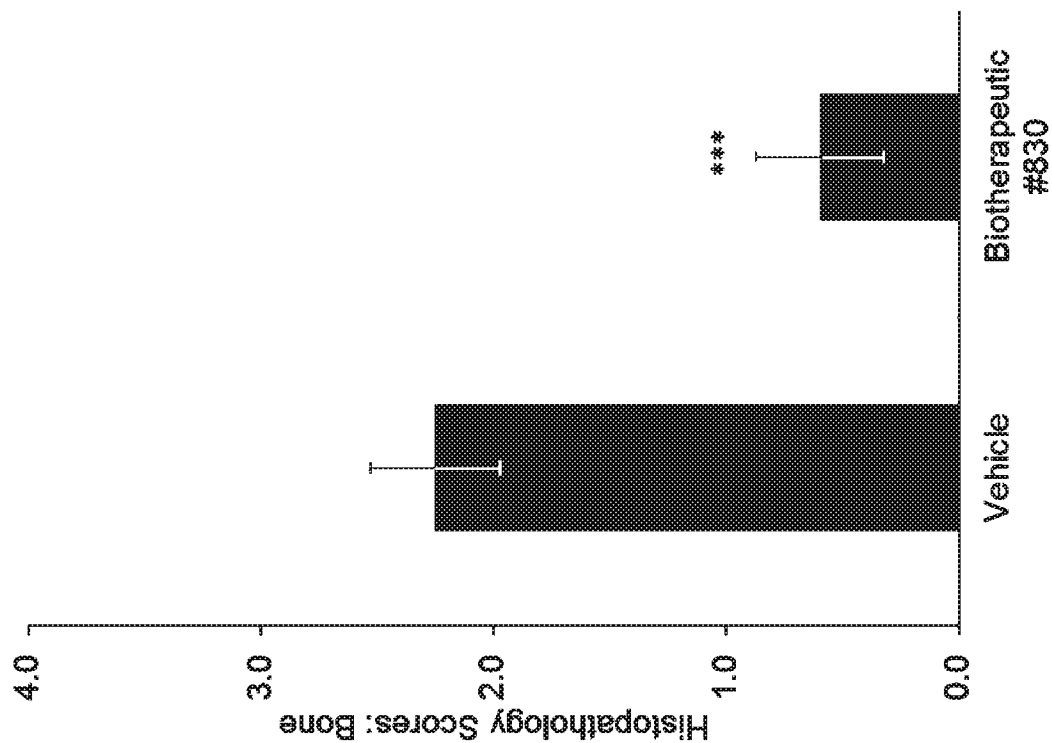


FIG. 68
Histopathology: Total Scores

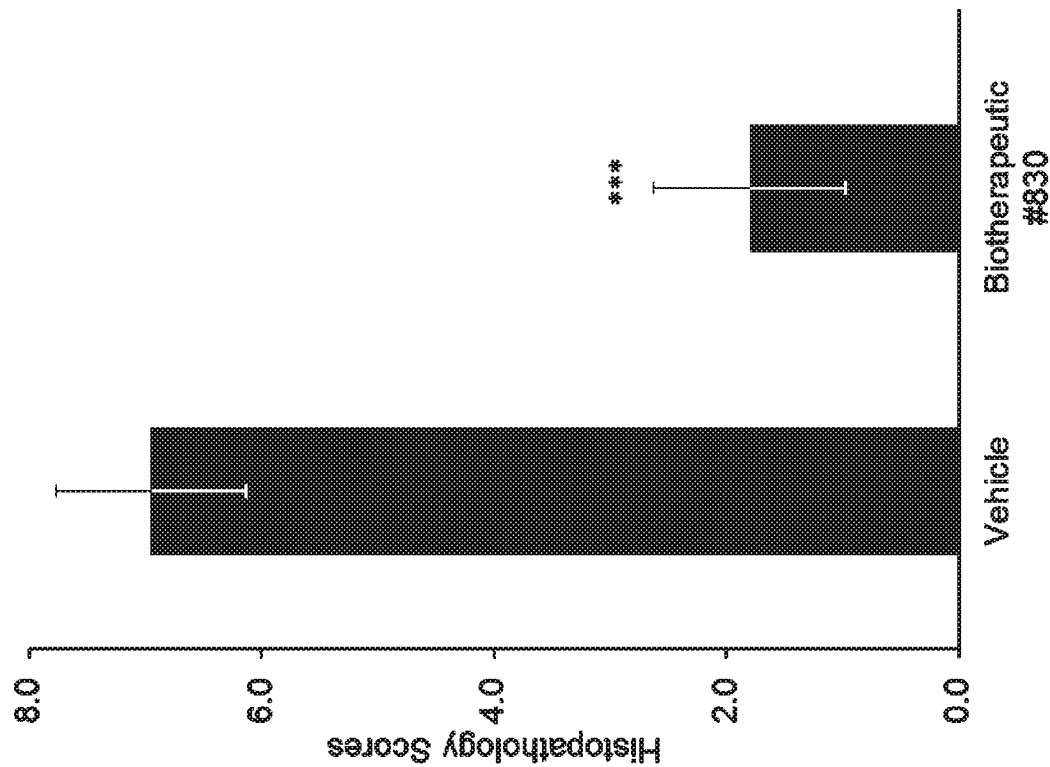
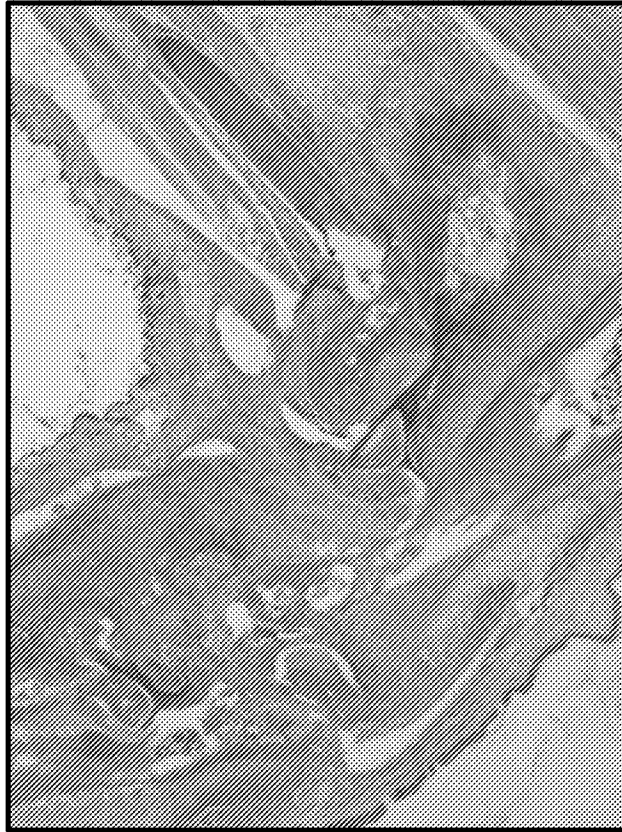


FIG. 69



Vehicle (#1.1 1R, Grade 9)



Strain #830 (#3.2R, Grade 0)

68/76

FIG. 70

Clinical score

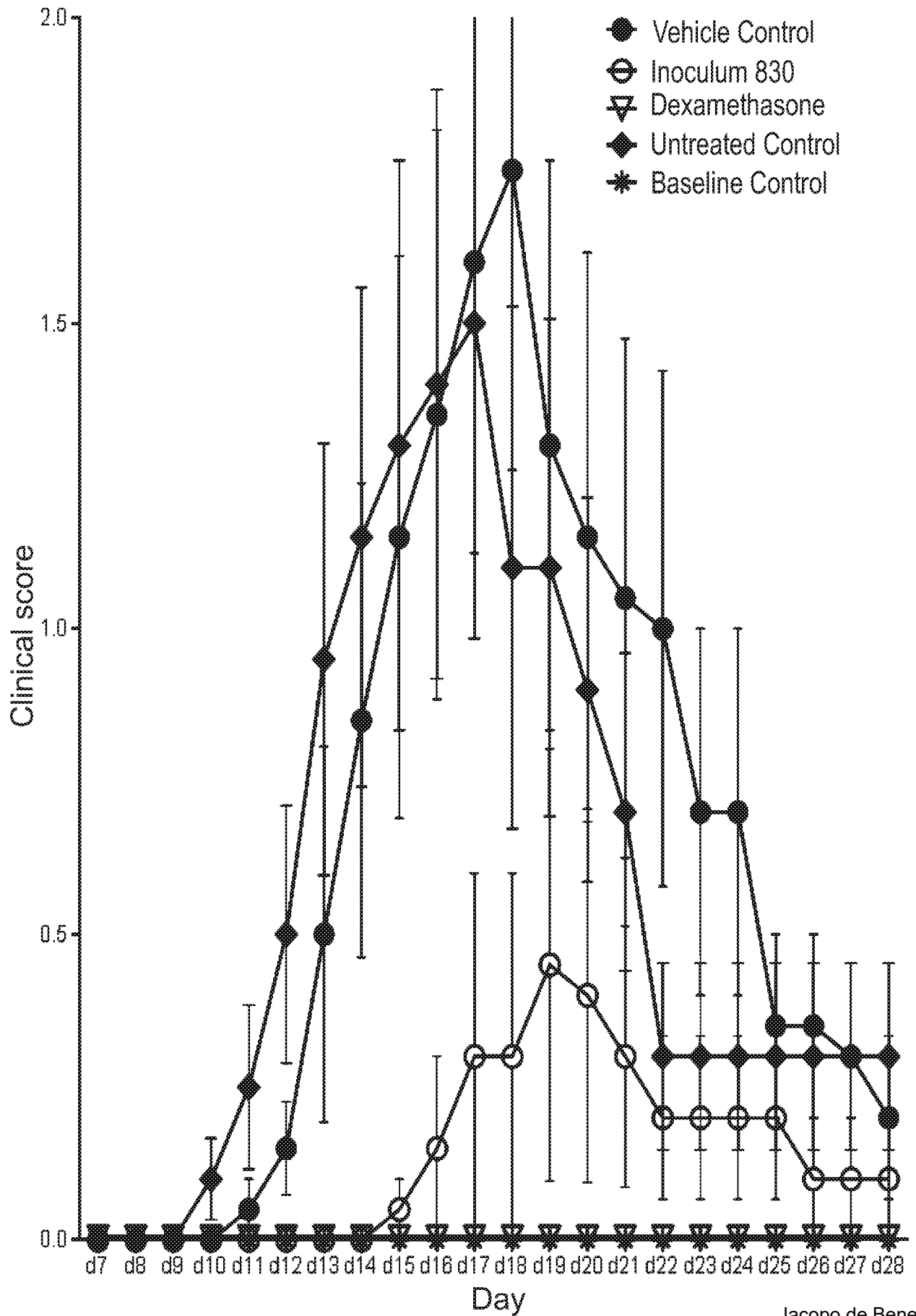


FIG. 71

Disease Incidence

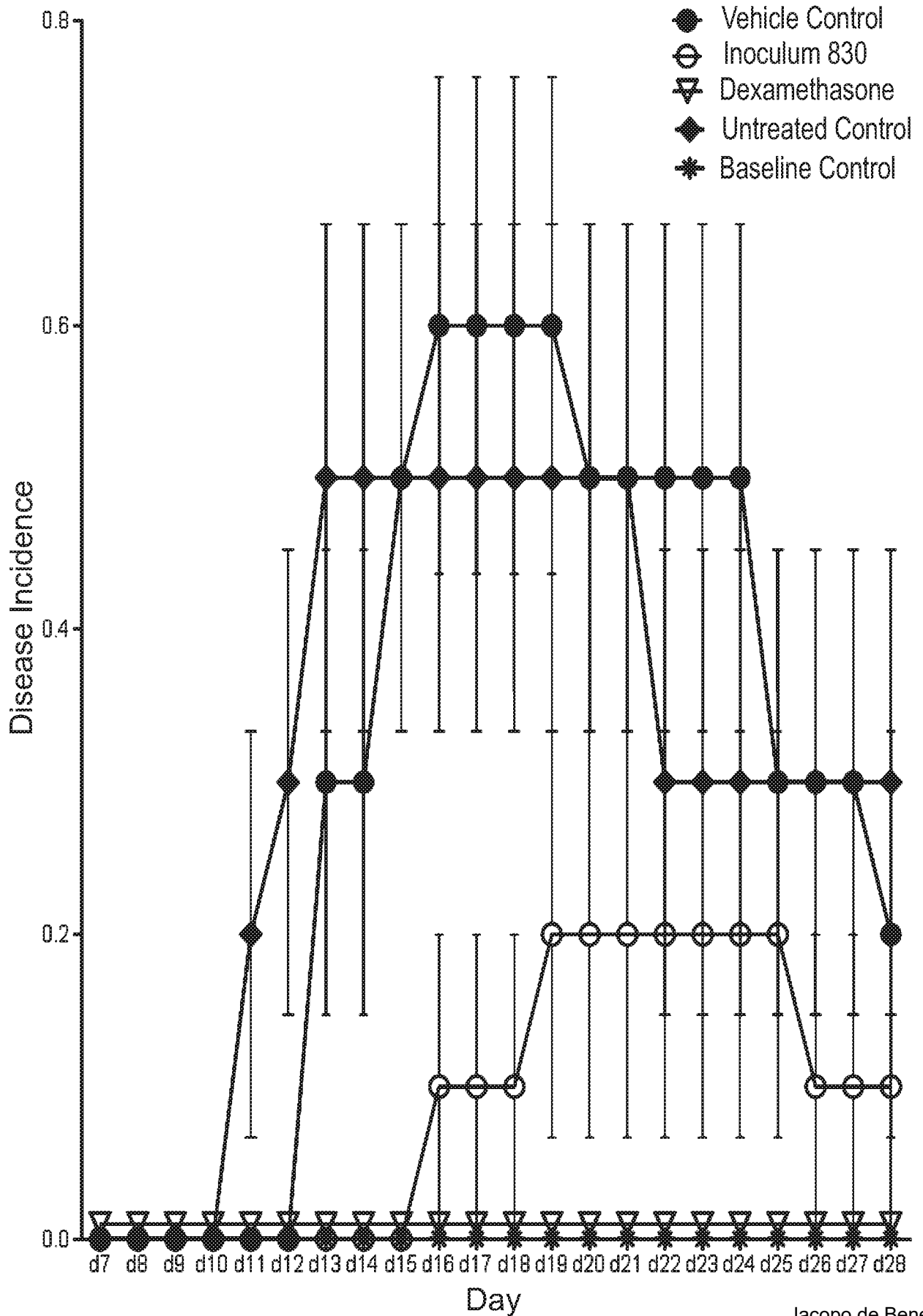


FIG. 72

Lymph Node Proliferative Responses to IRBP, Day 21

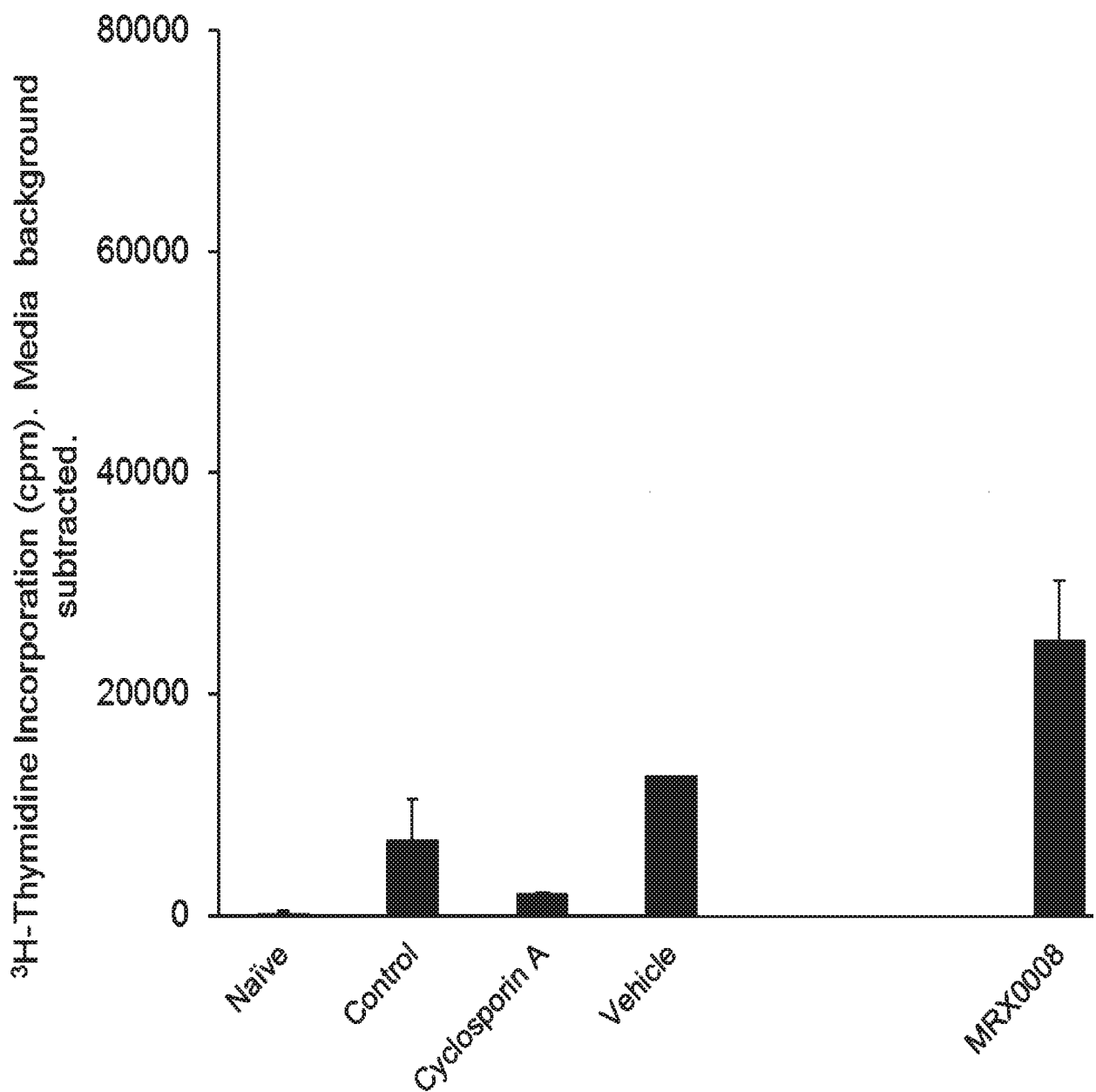
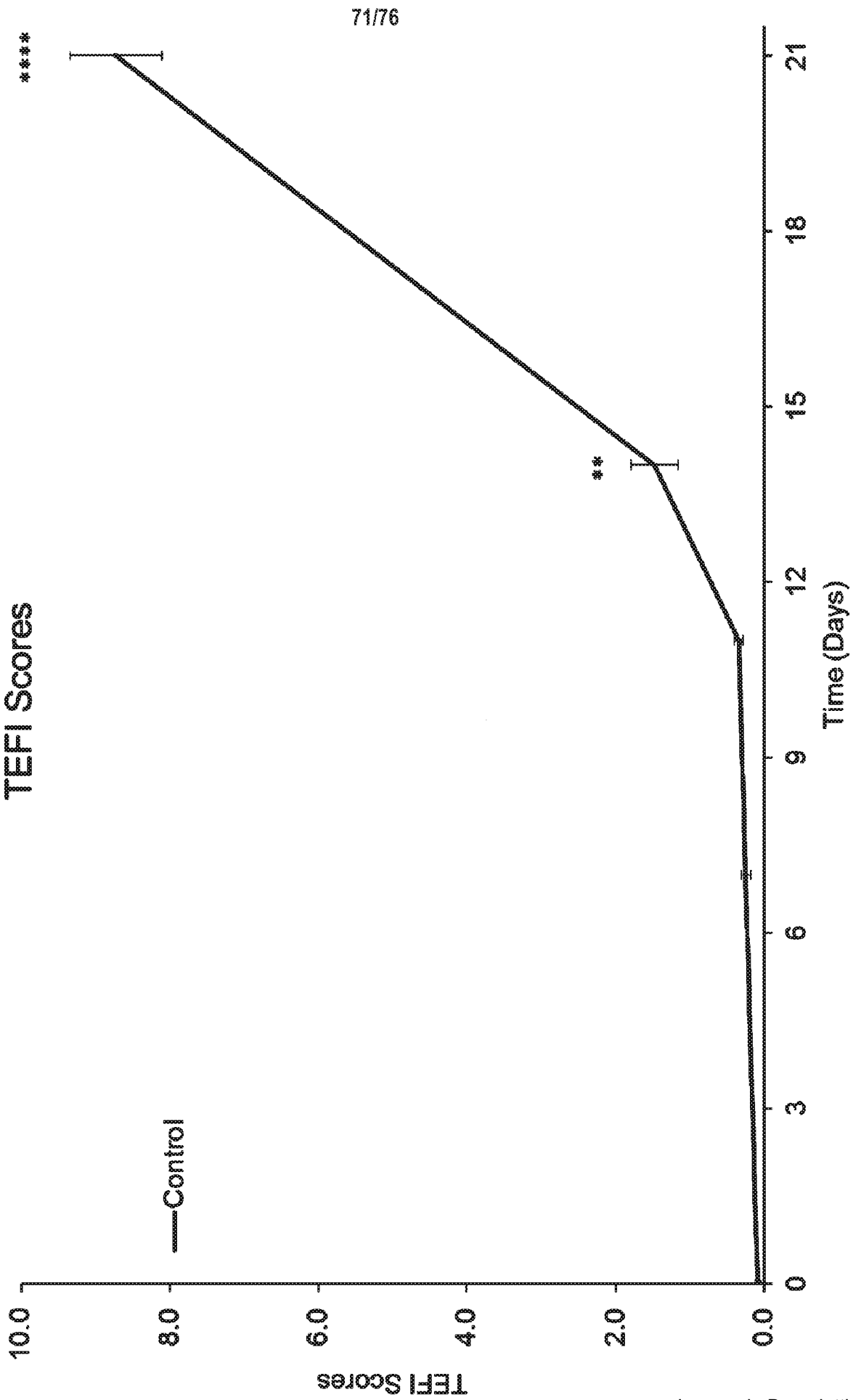


FIG. 73
TEFI Scores



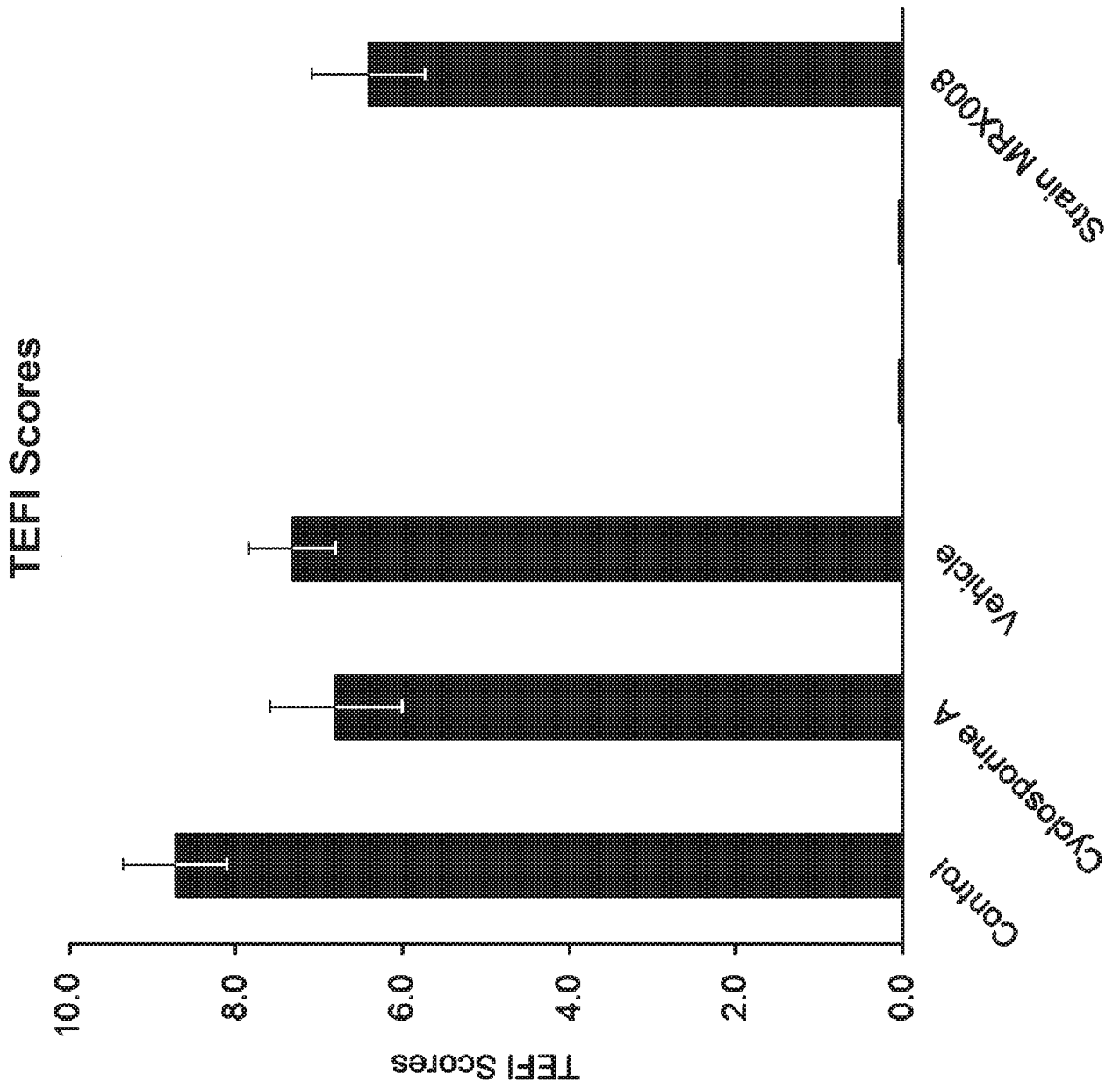


FIG. 74

FIG. 75

IL-6 Concentration

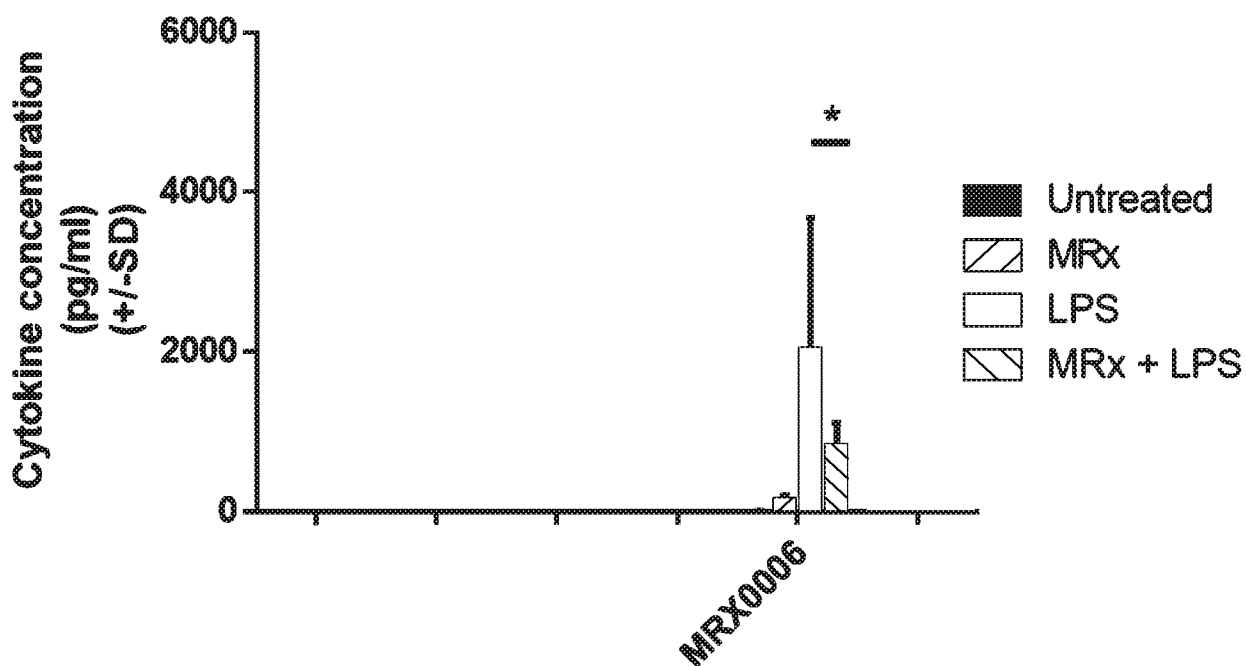


FIG. 76

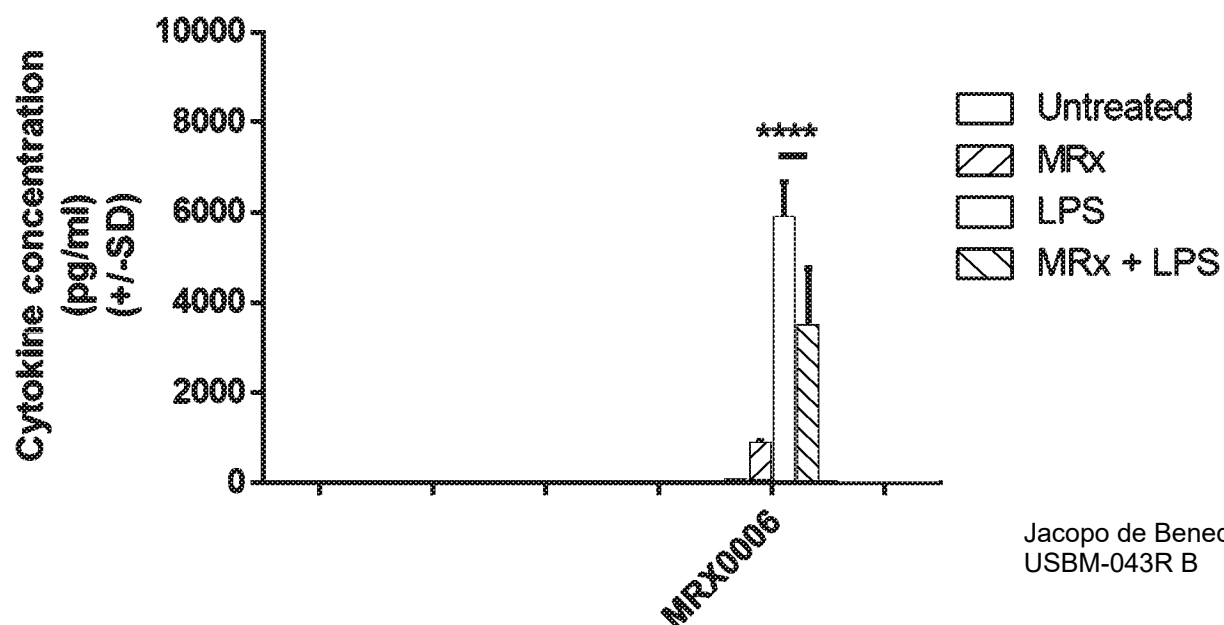
TNF α Concentration

FIG. 77
MoDC (Cd1a+ CD14-) maturation

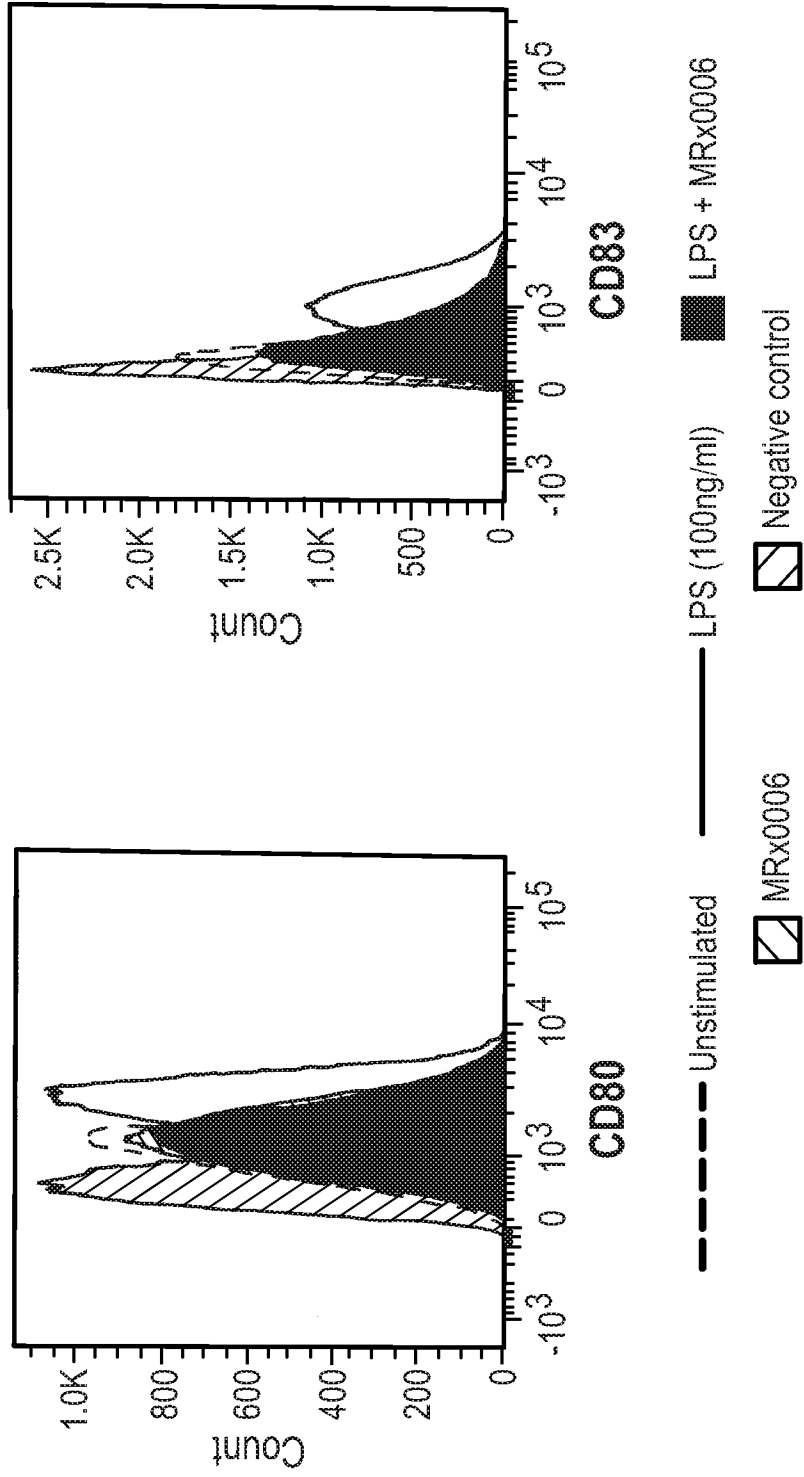


FIG. 77(contd.)
MoDC (Cd1a+ CD14-) maturation

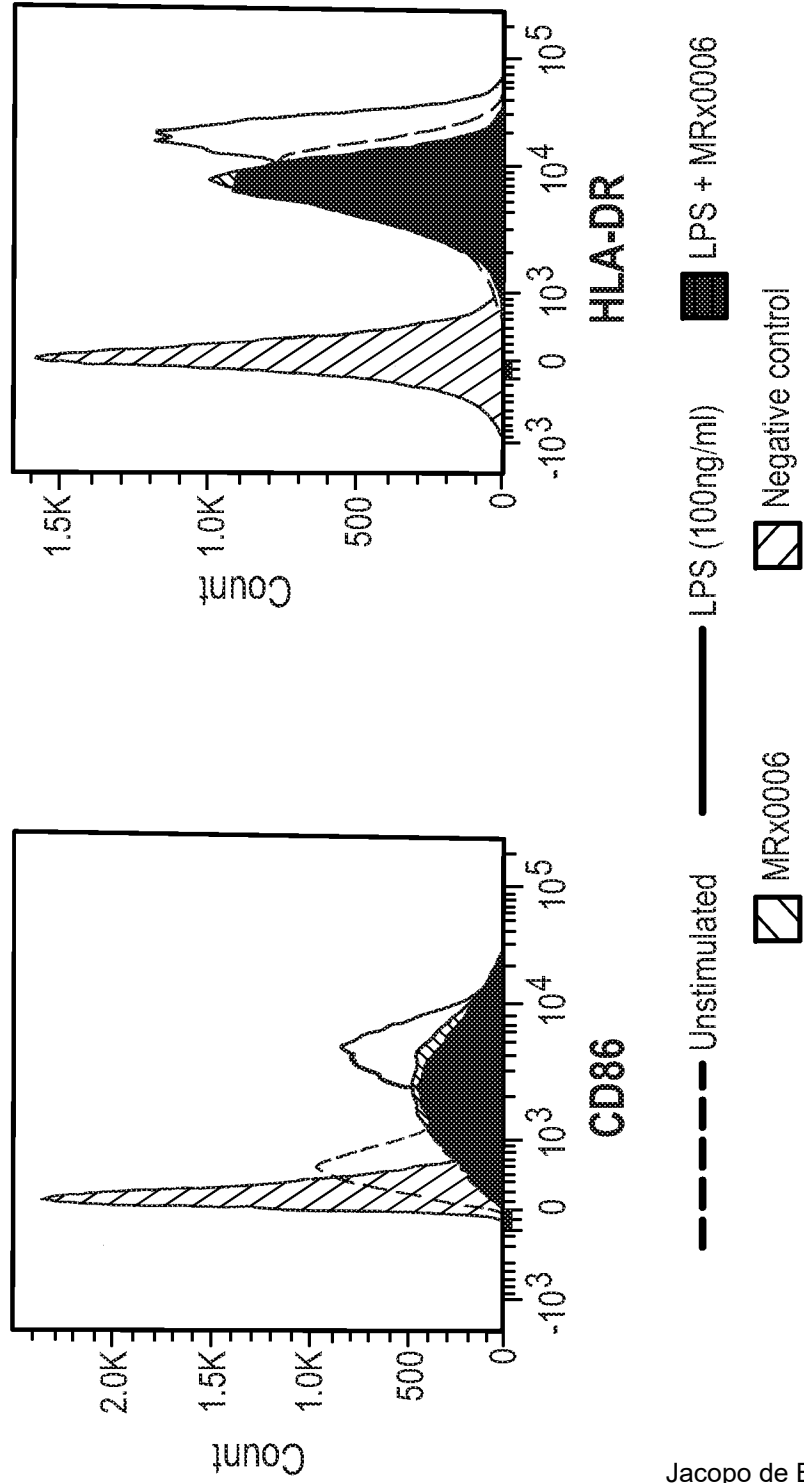


FIG. 78
CD4+ cell levels and divisions

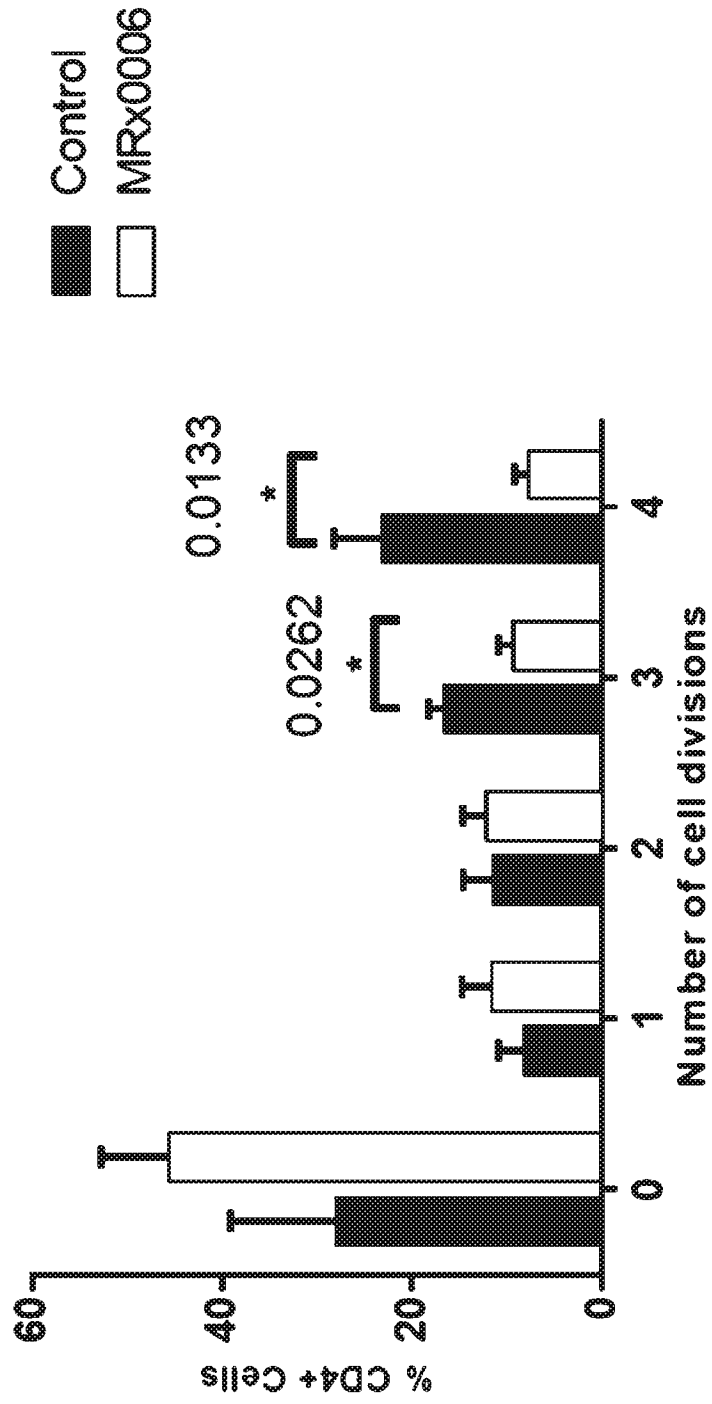


FIG. 1

Total cell counts.	Conte di cellule totali
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 2

Total eosinophils.	Eosinofili totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 3

Eosinophils %.	Eosinofili %.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cell %	Cellule %

FIG. 4

Total macrophages.	Macrofagi totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 5

Macrophages %	% macrofagi
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cell numbers	Numeri di cellule

FIG. 6

Total neutrophils.	Neutrofili totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 7

Neutrophils %.	Neutrofili %.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cell %	Cellule %

FIG. 8

Total lymphocytes.	Linfociti totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 9

Lymphocytes %.	Linfociti % .
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Cell %	Cellule %

FIG. 10

Total cell counts.	Conte di cellule totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 11

Total eosinophils.	Eosinofili totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 12

Eosinophils %.	Eosinofili %.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cell %	Cellule %

FIG. 13

Total macrophages	Totale macrofagi
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 14

Macrophages %.	Macrofagi %.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cell %	Cellule %

FIG. 15

Total neutrophils	Neutrofili totali
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM

Baseline	Valore al basale
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 16

Neutrophils %.	Neutrofili %.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cell %	Cellule %

FIG. 17

Total lymphocytes.	Linfociti totali.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cells/ml	Cellule/ml

FIG. 18

Lymphocytes %.	Linfociti %.
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830

Anti IL-17ab	Ab anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Cell %	% Cellule

FIG. 19-20

Bodyweights	Pesi corporei
Time (days)	Tempo (giorni)
Bodyweights (% initial)	Pesi corporei (% iniziale)
Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830

FIG. 21

Clinical scores	Punteggi clinici
Time (days)	Tempo (giorni)
Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830

FIG. 22

Splenocyte proliferation to Collagen II	Proliferazione di splenociti in risposta a Collagene II
Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830
³ H-Thymidine incorporation (cpm). Media background subtracted.	Incorporazione di ³ H-Timidina (cpm). Sfondo di terreno sottratto.

FIG. 23

Vehicle	Veicolo
Biotherapeutics #830	Agenti bioterapeutici #830
Levels of IFN- γ (pg/ml)	Livelli di IFN- γ (pg/ml)
Media	Terreno
Collagen	Collagene

FIG. 24

Vehicle	Veicolo
Biotherapeutics #830	Agenti bioterapeutici #830
Levels of IL-17A (pg/ml)	Livelli di IL-17A (pg/ml)
Media	Terreno
Collagen	Collagene

FIG. 25

Vehicle	Veicolo
Biotherapeutics #830	Agenti bioterapeutici #830
Levels of IL-10 (pg/ml)	Livelli di IL-10 (pg/ml)
Media	Terreno
Collagen	Collagene

FIG. 26

Vehicle	Veicolo
Biotherapeutics #830	Agenti bioterapeutici #830

Levels of IL-6 (pg/ml)	Livelli di IL-6 (pg/ml)
Media	Terreno
Collagen	Collagene

FIG. 27

Total IgE in serum	IgE totale nel siero
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 28

HDM specific IgG1 in serum	IgG1 specifica per HDM nel siero
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 29

Total IgE in BALF	IgE totale nel BALF
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 30

HDM specific IgG1 in BALF	IgG1 specifica per HDM nel BALF
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 31

Histological analysis – Mean peribronchiolar infiltration score	Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione peribronchiolare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Mean score	Punteggio medio

FIG. 32

Histological analysis – Mean perivascular infiltration score	Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione perivascolare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Mean score	Punteggio medio

FIG. 33

Histological analysis – Mean inflammatory score (Average of both peribronchiolar and perivascular infiltration score)	Analisi istologica – Punteggio infiammatorio medio (media dei punteggi di infiltrazione sia peribronchiolare che perivascolare)
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Mean score	Punteggio medio

FIG. 34

Histological analysis – Mucus score	Analisi istologica – Punteggio di muco
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM
Mucus score	Punteggio di muco

FIG. 35

IL-9 level in lung tissue	Livello di IL-9 nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 36

IL-1a level in lung tissue	Livello di IL-1a nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 37

IFN γ level in lung tissue	Livello di IFN γ nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 38

IL-17 A level in lung tissue	Livello di IL-17 A nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 39

IL-4 level in lung tissue	Livello di IL-4 nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo

Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 40

IL-5 level in lung tissue	Livello di IL-5 nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 41

IL-1b level in lung tissue	Livello di IL-1b nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 42

RANTES level in lung tissue	Livello di RANTES nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 43

MIP-1a level in lung tissue	Livello di MIP-1a nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 44

KC level in lung tissue	Livello di KC nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 45

MIP-2 level in lung tissue	Livello di MIP-2 nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Dexamethasone	Desametasone
HDM only	Solo HDM

FIG. 46

HDM specific IgG1 in serum	IgG1 specifica per HDM nel siero
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830

Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 47

HDM specific IgG2a in serum	IgG2a specifica per HDM nel siero
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 48

HDM specific IgG1 in BALF	IgG1 specifica per HDM nel BALF
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 49

HDM specific IgG2a in BALF	IgG2a specifica per HDM nel BALF
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17

HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 50

Histological analysis – mean peribronchiolar infiltration score	Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione peribronchiolare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Mean score	Punteggio medio

FIG. 51

Histological analysis – mean perivascular infiltration score	Analisi istologica – Punteggio medio di infiltrazione perivascolare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Mean score	Punteggio medio

FIG. 52

Histological analysis – mean inflammatory	Analisi istologica – Punteggio
---	--------------------------------

score (average of both peribronchiolar and perivascular infiltration score)	infiammatorio medio (media dei punteggi di infiltrazione sia peribronchiolare che perivascolare)
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Mean score	Punteggio medio

FIG. 53

TNF α level in lung tissue	Livello di TNF α nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 54

IL-1 α level in lung tissue	Livello di IL-1 α nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 55

IFN γ level in lung tissue	Livello di IFN γ nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 56

IL-17F level in lung tissue	Livello di IL-17F nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 57

IL-1 β level in lung tissue	Livello di IL-1 β nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 58

RANTES level in lung tissue	Livello di RANTES nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 59

MIP-2 level in lung tissue	Livello di MIP-2 nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

FIG. 60

KC level in lung tissue	Livello di KC nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Fluorescence	Fluorescenza

FIG. 61

IL-17A level in lung tissue	Livello di IL-17A nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Fluorescence	Fluorescenza

FIG. 62

MIP-1a level in lung tissue	Livello di MIP-1a nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale
Fluorescence	Fluorescenza

FIG. 63

IL-33 level in lung tissue	Livello di IL-33 nel tessuto polmonare
Vehicle	Veicolo
Strain 830	Ceppo 830
Anti-IL17 AB	AB anti-IL-17
HDM only	Solo HDM
Baseline	Valore al basale

Fluorescence	Fluorescenza
--------------	--------------

FIG. 64

Visual template for histopathology scoring	Modello visivo per il punteggio istopatologico
Grade 0	Grado 0
Grade 1	Grado 1
Grade 4	Grado 4
Grade 7	Grado 7
Grade 9	Grado 9

FIG. 65

Histopathology: inflammation scores	Istopatologia: punteggi di infiammazione
Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830
Histopathology scores: inflammation	Punteggi di istopatologia: infiammazione

FIG. 66

Histopathology: cartilage scores	Istopatologia: punteggi di cartilagine
Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830
Histopathology scores: cartilage	Punteggi di istopatologia: cartilagine

FIG. 67

Histopathology: bone scores	Istopatologia: punteggi ossei
-----------------------------	-------------------------------

Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830
Histopathology scores: bone	Punteggi di istopatologia: osso

FIG. 68

Histopathology: total scores	Istopatologia: punteggi totali
Vehicle	Veicolo
Biotherapeutic #830	Agente bioterapeutico #830
Histopathology scores	Punteggi di istopatologia

FIG. 69

Vehicle (#1.1, Grade 9)	Veicolo (#1.1, Grado 9)
Strain #830(#3.2 R, Grade 0)	Ceppo #830(#3.2 R, Grado 0)

FIG. 70

Clinical score	Punteggio clinico
Day	Giorno
Vehicle control	Controllo con veicolo
Inoculum 830	Inoculo di 830
Dexamethasone	Desametasone
Untreated control	Controllo non trattato
Baseline control	Controllo al basale

FIG. 71

Disease incidence	Incidenza della malattia
-------------------	--------------------------

Day	Giorno
Vehicle control	Controllo con veicolo
Inoculum 830	Inoculo di 830
Dexamethasone	Desametasone
Untreated control	Controllo non trattato
Baseline control	Controllo al basale

FIG. 72

Lymph node proliferative response to IRBP, Day 21	Risposte proliferative dei linfonodi a IRBP, Giorno 21
Naïve	Mai trattato
Control	Controllo
Cyclosporin A	Ciclosporina A
Vehicle	Veicolo
³ H-Thymidine incorporation (cpm). Media background subtracted.	Incorporazione di ³ H-Timidina (cpm). Sfondo di terreno sottratto.

FIG. 73

TEFI scores	Punteggi di TEFI
Time (days)	Tempo (giorni)
Control	Controllo

FIG. 74

TEFI scores	Punteggi di TEFI
Control	Controllo

Cyclosporine A	Ciclosporina A
Vehicle	Veicolo
Strain MRX008	Ceppo MRX008

FIG. 75

IL-6 concentration	Concentrazione di IL-6
Cytokine concentration (pg/ml) (+/-SD)	Concentrazione di citochine (pg/ml) (+/- D.S.)
Untreated	Non trattato

FIG. 76

TNF α concentration	Concentrazione di TNF α
Cytokine concentration (pg/ml) (+/-SD)	Concentrazione di citochine (pg/ml) (+/- D.S.)
Untreated	Non trattato

FIG. 77

MoDC (CD1a+ CD14-) maturation	Maturazione di MoDC (CD1a+ CD14-)
Count	Conta
Unstimulated	Non stimulate
Negative control	Controllo negativo

FIG. 78

CD4+ cell levels and divisions	Livelli e divisioni di cellule CD4+
Number of cell divisions	Numero di divisioni cellulari

% CD4+ cells	% di cellule CD4+
Control	Controllo