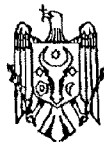




MD/EP 3313423 T2 2019.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3313423 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 35/741 (2015.01.01)
A61K 9/00 (2006.01.01)
A61P 1/14 (2006.01.01)
A61P 29/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0469 (22) Data de depozit: 2017.03.06 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17709911.6, 2017.03.06 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3313423, 2019.04.24 (31) Numărul cererii prioritare: 201603817; 201612191; 201616022 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.03.04; 2016.07.13; 2016.09.20 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2019, 2019.10.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 17/2019, 2019.04.24 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 08/2018, 2018.08.31
(71) Solicitant: 4D PHARMA PLC, GB (72) Inventatori: BERNALIER-DONADILLE Annick, FR; CROUZET Laureen, GB; HABOUZIT Chloe, FR (73) Titular: 4D PHARMA PLC, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții care conțin tulpini bacteriene de *Blautia* pentru tratamentul hipersensibilității viscerale

(57) Rezumat:

1

Invenția furnizează compoziții care cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene pentru tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale.

2

Secvențe: 5
Revendicări: 14
Figuri: 23

MD/EP 3313423 T2 2019.10.31

(54) Compositions comprising bacterial Blautia strains for treating visceral hypersensitivity

(57) Abstract:

1
The invention provides compositions comprising one or more bacterial strains for treating or preventing visceral hypersensitivity.

2
Sequences: 5
Claims: 14
Fig.: 23

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)****DOMENIUL TEHNIC**

- 5 Această invenție este în domeniul compozițiilor care cuprind tulpini bacteriene izolate din tractul digestiv de mamifer și utilizarea unor astfel de compoziții în tratamentul bolii.

FUNDALUL INVENȚIEI

- Se crede că intestinul uman este steril *in utero*, dar este expus la o varietate largă de microbi maternali și din mediu imediat după naștere. Apoi, are loc o perioadă dinamică de colonizare și succesiune microbiană, care este influențată de factori cum ar fi modul de livrare, mediul, dieta și genotipul gazdă, toate acestea impactând asupra compoziției microbiotei intestinale, în special în timpul vieții timpurii. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine adultă [1]. Microbiota intestinului uman conține mai mult de 1500 de filotipuri diferite, dominate în niveluri de abundență de două diviziuni bacteriene majore (*phyla*), Bacteroidetes și Firmicutes [2-3]. Relațiile simbiotice de succes care apar din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat a largă varietate de funcții metabolice, structurale, protectoare și alte funcții benefice. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură că alte componente alimentare nedigerabile sunt degradate prin eliberarea de produse secundare, asigură o importantă sursă de nutrienți pentru gazdă și beneficii suplimentare pentru sănătate. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine recunoscută și este exemplificată la animalele fără germeni care au un sistem imunitar alterat care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriei comensale [4-6].

- Modificări dramatice în compoziția microbiotei au fost documentate în tulburările gastrointestinale cum ar fi boala inflamatorie intestinală (IBD). De exemplu, nivelurile de bacterii ale grupului *Clostridium* XIVa și ale grupului *Clostridium* XI (*F. prausnitzii*) sunt reduse la pacienții cu IBD în timp ce numărul de *E. coli* a crescut, sugerând o deviație în echilibrul de simbioză și patobioză în intestin [7-11].

- În recunoașterea efectului potențial pozitiv pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea pe intestinul animal, au fost propuse diferite tulpini pentru utilizare în tratamentul diferitelor boli (vezi, de exemplu, [12-15]). Un număr de tulpini, incluzând mai ales tulpini *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor tulburări intestinale (vezi [16] pentru o revizuire). Tulpinile de genul *Blautia* au fost de asemenea propuse pentru utilizare în modularea echilibrului microbian al ecosistemului digestiv (WO 01/85187). Totuși, relația între diferite tulpini bacteriene și diferite boli, și efectele precise ale anumitor tulpini bacteriene asupra intestinului și la un nivel sistemic și asupra oricăror tipuri specifice de boli, sunt slab caracterizate.

Există o cerință pentru ca efectele potențiale ale bacteriei intestinale să fie caracterizate, astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii utilizând bacteria intestinală.

REZUMATUL INVENȚIEI

- 40 Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea hipersensibilității viscerale. În particular, inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene de la speciile *Blautia hydrogenotrophica* pot fi eficiente pentru reducerea hipersensibilității viscerale. Cum s-a descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor care cuprind *Blautia hydrogenotrophica* poate reduce hipersensibilitatea viscerală la modelele pe șobolan de hipersensibilitate viscerală și sindromul de colon iritabil (IBS). Prin urmare, într-o primă realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a hipersensibilității viscerale.

- În realizări preferate, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu boala Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională sau, mai preferabil, IBS. În alte realizări preferate, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu boala Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională, colică infantilă sau, mai preferabil, IBS.

- 55 În alte realizări preferate, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale în abdomen, preferabil în tractul gastrointestinal, și cel mai preferabil

în tractul gastrointestinal inferior. În alte realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale în cecum, colon sau rect.

În alte realizări, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica* cum s-a definit în revendicările în care compoziția este pentru

5 utilizare în:

(i) reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către bacterii care reduc sulfat (SRB) în tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale; sau

(ii) scăderea nivelurilor de H₂S sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S în tractul gastrointestinal în tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale; sau

10 (iii) tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale la un pacient care suferă de distensiunea dureroasă a tractului gastrointestinal, în special în colon sau rect.

Compoziția cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*. Preferabil, tulpina bacteriană are o secvență rARN16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5. În alte realizări, tulpina bacteriană din

15 compoziție este tulpina *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

În anumite realizări, compoziția cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare în:

20 (i) o metodă de tratare sau prevenire a hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu IBS; sau

(ii) reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către bacterii care reduc sulfat (SRB), scăderea nivelurilor de H₂S sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S în tractul gastrointestinal în tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale.

În anumite realizări, compoziția invenției este pentru administrare orală. Administrarea orală a tulpinilor invenției poate fi eficientă pentru tratarea hipersensibilității viscerale. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite administrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

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

30 În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă pentru prepararea compozițiilor stabile care permit administrarea bacteriei, și este prezentată pentru a furniza compoziții eficiente în exemple.

În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde o singură tulpină din specii *Blautia hydrogenotrophica*. În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde tulpina bacteriană *Blautia hydrogenotrophica* ca parte a unui consorțiu microbial.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

40 **Figura 1:** Măsurarea populației BH prin qPCR, prezentând o creștere în BH în zilele 14 și 28 pentru animalele care primesc liofilizatul BH.

Figura 2: Impactul culturii BH și liofilizatului asupra răspunsului animalelor la distensiune, prezentand o reducere în contracții la animalele care au primit compoziții BH.

45 **Figura 3:** Impactul culturii BH asupra microbiotei, prezentând o scădere 1 log în SRB la șobolani care primesc o doză zilnică de cultură BH.

Figura 4: Impactul liofilizatului BH asupra microbiotei.

Figura 5: Impactul liofilizatului BH asupra fermentării microbiotei - acizi grași cu catenă scurtă, care prezintă o creștere în producția de acetat la șobolani tratați cu BH.

50 **Figura 6:** Impactul liofilizatului BH asupra fermentării microbiotei - sulfuri, care prezintă o scădere în producția de sulfuri.

Figura 7: Impactul liofilizatului BH asupra răspunsului animalelor la distensiune. Șobolani MIH IBS + BH: test CRD.

Figura 8: Impactul liofilizatului BH asupra răspunsului animalelor la distensiune. Șobolani MIH IBS + BH: Toate datele – test CRD.

55 **Figura 9:** Impactul liofilizatului BH asupra sulfurilor. Șobolani MIH IBS + BH: Concentrații de sulfuri (mg/L). Figura 9a prezintă concentrația cecală de sulfuri pentru fiecare șobolan după tratamentul cu liofilizatul BH sau cu o soluție de control. Figura 9b prezintă media +/- SEM a concentrației cecale de sulfuri măsurată în microbiota IBS asociată șobolanilor după tratamentul cu liofilizatul BH sau cu o soluție de control.

Figura 10: Impactul liofilizatului BH asupra sulfurilor. Șobolani MIH IBS + BH: Toate datele - Concentrații de sulfuri (mg/L). Figura 10a prezintă concentrația cecală de sulfuri pentru fiecare șobolan după tratamentul cu liofilizatul BH sau cu o soluție de control. Figura 10b prezintă media +/- SEM concentrației cecale de sulfuri măsurată în microbiota IBS asociată șobolanilor după tratamentul cu liofilizatul BH sau cu o soluție de control.

Figura 11: Studiu de dozare la șobolani HIM - cuantificarea RT-PCR a *B. hydrogenotrophica* în mostrele din fecale ale șobolanilor HIM sănătoși care primesc diferite concentrații de specii bacteriene.

Figura 12: Timpul de tranzit al *B. hydrogenotrophica* după administrarea orală (10^9 /zi) la șobolani HIM sănătoși.

Figura 13: Compararea nivelurilor de *B. hydrogenotrophica* găsite în mostrele fecale și cecale ale șobolanilor HIM sănătoși (cuantificare RT-PCR) după 14 zile de administrare - *B. hydrogenotrophica* administrată la 10^{10} /zi/șobolan.

Figura 14: Efectul *B. hydrogenotrophica* (10^{10} / zi pentru 14 zile) asupra acizilor grași cu catenă scurtă (RMN ^1H) în conținuturile cecale ale șobolanilor HIM sănătoși.

Figura 15: Impactul administrării de *B. hydrogenotrophica* asupra populației microbice-ne la șobolanii IBS-HIM.

Figura 16: Producția de sulfuri la șobolanii IBS-HIM tratați cu *B. hydrogenotrophica* (10^{10} /zi pentru 14 zile). Șobolanii de control nu au fost tratați.

Figura 17: Modificări în simptomele pacientului în timpul perioadei de dozare (zilele 1-16) a studiului clinic de Fază I.

Figura 18: Modificări în simptomele pacientului în timpul perioadei de eliminare a studiului clinic de Fază I.

Figura 19: Evaluarea qPCR a populației *B. hydrogenotrophica* în mostrele fecale ale șobolanilor IBS-HMA tratați sau nu cu o compoziție care cuprinde *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) pentru 28 de zile.

Figura 20: Răspunsul abdominal la distensiunea colorectală la șobolanii IBS-HMA tratați sau nu cu *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) pentru 28 zile și la șobolanii HMA sănătoși netratați.

Figura 21: Enumerarea bacteriilor în mostrele fecale ale șobolanilor HMA IBS după administrarea *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) versus soluția de control.

Figura 22: Concentrația de sulfură în mostrele cecale ale șobolanilor HMA IBS tratați sau nu cu *B. hydrogenotrophica* (Blautix) pentru 28 zile.

Figura 23: Concentrațiile de acizi grași cu catenă scurtă (SCFA) în mostrele cecale ale șobolanilor HMA IBS tratați sau nu cu *B. hydrogenotrophica* (Blautix) pentru 28 de zile. **Figura 23a** prezintă concentrația de SCFA totală. **Figura 23b** prezintă concentrația de acid acetic, acid propionic și acid butiric.

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*. Exemplele demonstrează că bacteriile din aceste specii sunt utile pentru tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale.

Speciile *Blautia* sunt bacterii non-motile, pozitive la reacția Gram, care pot fi fie cocoide sau fie ovale și toate sunt anaerobe obligatoriu care produc acid acetic ca produs final major al fermentării glucozei [17]. *Blautia* poate fi izolată din intestinul uman, deși *B. producta* a fost izolată dintr-o mostră de septicemie.

Blautia hydrogenotrophica (cunoscută anterior ca *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) a fost izolată din intestinalele mamiferelor, este strict anaerobică, și metabolizează H_2/CO_2 la acetat, care poate fi important pentru nutriția umană și sănătate. Tipul de tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* este S5a33 = DSM 10507 = JCM 14656. Numărul de acces GenBank pentru secvența de gene rARN 16S de tulpină *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 este X95624.1 (divulgată aici ca SEQ ID NO:5). Acest exemplu de tulpină *Blautia hydrogenotrophica* este descris în [17] și [18]. Tulpina S5a33 și tulpina S5a36 corespund la două subclone ale unei tulpine izolate dintr-o mostră fecală a unui subiect sănătos. Ele prezintă o morfologie, fiziologie și metabolism identice și au secvențe rARN 16S identice. Astfel, în unele realizări, *Blautia hydrogenotrophica* pentru utilizare în invenție are secvența rARN 16S din SEQ ID NO:5.

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294 a fost testată în exemple și este de asemenea referită în acest document ca tulpină BH. Tulpina BH a fost depozitată cu Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [German Microorganism Colection] (Mascheroder Weg 1b, 38124

Braunschweig, Germania) în ianuarie 1996 ca „*Ruminococcus hydrogenotrophicus*” sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294 ca „S5a33” pe 10 mai 2001. Depozitorul a fost INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, Franța. Proprietatea depozitului a trecut la 4D Farma Plc prin

5

cesiune.

Tulpinile bacteriene strâns asociate de tulpina testată în exemple sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale. În anumite realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență rARN 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența rARN 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență rARN 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5.

10

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri de bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale. Un biotip este o tulpină strâns asociată care are caracteristici fiziologice și biochimice foarte similare.

15

Tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție, pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotidă pentru o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294. De exemplu, substanțial, întregul genom poate fi secvențiat și o tulpină biotip pentru utilizare în invenție poate avea identitatea de secvență de cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% de-a lungul a cel puțin 80% din întregul său genom (de exemplu de-a lungul a cel puțin 85%, 90%, 95% sau 99%, sau de-a lungul întregului său genom). De exemplu, în unele realizări, o tulpină biotip are o identitate de secvență de cel puțin 98% de-a lungul a cel puțin 98% din genomul său sau o identitate de secvență de cel puțin 99% de-a lungul a 99% din genomul său. Alte secvențe adecvate pentru utilizare în identificarea tulpinii biotip pot include hsp60 sau secvențe repetitive cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)₅, sau REP sau [20]. Tulpinile biotip pot avea secvențe cu identitatea de secvență de cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% față de secvența corespunzătoare a unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486. În unele realizări, o tulpină biotip are o secvență cu identitatea de secvență de cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% față de secvența corespunzătoare a tulpinii *Blautia hydrogenotrophica* depozitată ca DSM 10507/14294 și cuprinde o secvență rARN 16S care este cel puțin 99% identică (de exemplu cel puțin 99,5% sau cel puțin 99,9% identică) cu SEQ ID NO:5. În unele realizări, o tulpină biotip are o secvență cu identitatea de secvență de cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% față de secvența corespunzătoare a tulpinii *Blautia hydrogenotrophica* depozitată ca DSM 10507/14294 și are secvența rARN 16S din SEQ ID NO:5.

20

25

30

35

40

45

50

55

Alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin utilizarea numărului de acces DSM 10507/14294 de depozitare și analiza fragmentului de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismului lungimii fragmentelor fluorescente amplificate (FAFLP) și a amprentelor digitale (rep)-PCR ale elementului ADN repetitiv, sau a profilării proteinei, sau a secvențierii parțiale rADN 16S sau 23s. În realizări preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini de *Blautia hydrogenotrophica*.

În anumite realizări, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție, sunt tulpini care asigură același tipar ca bacteriile depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 când sunt analizate prin analiza restricției ADN ribozomală amplificată (ARDRA), de exemplu când se utilizează enzima de restricție Sau3AI (pentru metode și îndrumări exemplificative vezi, de exemplu, [21]). Alternativ, tulpinile biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași modele de fermentare a carbohidraților ca bacteriile depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294.

Alte tulpini *Blautia hydrogenotrophica* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, cum ar fi biotipuri unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 pot fi identificate utilizând orice metodă adecvată sau strategie, incluzând testele descrise în exemplele. De exemplu, tulpinile pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin cultivarea bacteriilor și administrarea la șobolani pentru a fi testate în testul de distensiune. În particular, tulpinile bacteriene care au modele de creștere similare, tipul metabolic și/sau antigenii de suprafață la o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea o activitate modulatorie microbionă comparabilă cu tulpina DSM

10507/14294. În particular, o tulpină biotip va declanșa efecte comparabile asupra modelului de hipersensibilitate viscerală cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în exemple.

5 O tulpină specială preferată a invenției este tulpina *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294. Aceasta este tulpina BH exemplară testată în exemple și prezentată pentru a fi eficientă pentru tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, de tulpină *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294, sau un derivat al acesteia, pentru utilizare în terapie, în particular pentru bolile descrise aici.

10 Un derivat de tulpină depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat al unei tulpini a invenției poate fi modificat, de exemplu la nivel genetic, fără ablația activității biologice. În particular, o tulpină derivată a invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea activitatea modulatorie a microbiotei comparabilă cu tulpina DSM 10507/14294 originală. În
15 particular, o tulpină derivată va declanșa efecte comparabile asupra modelului de hipersensibilitate viscerală cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în exemple. Un derivat de tulpină DSM 10507/14294 va fi în general un biotip de tulpină DSM 10507/14294.

20 Referirile la celulele de tulpină *Blautia hydrogenotrophica* depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 cuprind orice celule care au același caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpinile depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294, și astfel de celule sunt cuprinse în invenție.

În realizările preferate, tulpinile bacteriene din compozițiile invenției sunt viabile și capabile de colonizarea parțială sau totală a intestinului.

25

Utilizări terapeutice

Compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea hipersensibilității viscerele. Hipersensibilitatea viscerală este un tip specific de durere caracterizat printr-o percepție subiectivă
30 dureroasă situată în zona abdominală care rezultă din activarea nociceptorilor viscerelor toracice, pelvice, sau abdominale (organe). Hipersensibilitatea viscerală este în general difuză și dificil de localizat, și prin urmare contrastează cu durerea somatică, care este în general mai ascuțită și mai bine localizată. De asemenea, hipersensibilitatea viscerală nu este asociată în general cu leziuni structurale specifice, spre deosebire de durerea somatică. Nociceptorii viscerali sunt intrinsec
35 diferiți de nociceptorii cutanați și de cei mai mulți alți nociceptori non-viscerali [22].

Hipersensibilitatea viscerală este în general experimentată în abdomen, dar nu întreaga durere abdominală este hipersensibilitate viscerală. În contrast, există multe cauze potențiale ale durerii abdominale și durerea abdominală poate fi o durere somatică, vizată sau viscerală. În abdomen, durerea somatică poate fi cauzată de un organ inflamă și este în general ascuțită și
40 localizată. Durerea abdominală poate fi cauzată de fibromialgie, care este o afecțiune a hipersensibilității somatice (piele și mușchi). Durerea vizată este simțită într-un loc cutanat departe de organul bolnav.

Hipersensibilitatea viscerală este adesea asociată cu dispepsia funcțională și sindromul de colon iritabil (IBS). Totuși, nu toate durerile asociate cu dispepsia funcțională și IBS sunt
45 hipersensibilitate viscerală. Într-adevăr, mulți pacienți cu IBS prezintă de asemenea o largă varietate de simptome somatice în regiuni abdominale (durere de spate, arsuri stomacale) și regiuni non-abdominale (dureri de cap migrenă, dispareunie, durere musculară în regiuni ale corpului distincte somatotopic de intestin) [23].

În unele realizări, patogeniza bolii sau afecțiunii afectează intestinul. În unele realizări, patogeniza bolii sau afecțiunii nu afectează intestinul. În unele realizări, patogeniza bolii sau afecțiunii nu este localizată în intestin. În unele realizări, tratarea sau prevenirea are loc într-un loc, altul decât intestinul. În unele realizări, tratarea sau prevenirea are loc la intestin și de asemenea într-un loc, altul decât intestinul. În anumite realizări, boala sau afecțiunea este sistemică.

50 Hipersensibilitatea viscerală este de asemenea cunoscută ca durere viscerală, și acești doi termeni sunt utilizați interschimbabil aici.

După cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene ale invenției pot fi eficiente pentru reducerea hipersensibilității viscerele. În particular, compozițiile bacteriene ale invenției pot reduce răspunsul la distensiunea colorectală, care este o manifestare a hipersensibilității viscerele care afectează mulți pacienți. În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în

tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale în abdomen, preferabil în tractul gastrointestinal, și cel mai preferabil în tractul gastrointestinal inferior. În alte realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale în cecum, colon sau rect.

5 În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională, colica infantilă sau, mai preferabil, IBS. În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională, colica infantilă, sau, mai
10 preferabil, IBS. În realizări preferate compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale în tratamentul bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, colicii infantile, sau, mai preferabil, IBS.

În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau, mai preferabil, IBS. În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru
15 utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu boală Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională sau, mai preferabil, IBS. În realizări preferate compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale în tratamentul bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale sau, mai preferabil, IBS. În
20 anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea hipersensibilității viscerale la un pacient care suferă de distensiunea dureroasă a tractului gastrointestinal, în particular în colon sau rect.

Anumite aspecte ale disconfortului și suferinței asociate cu IBS și alte afecțiuni intestinale pot fi cauzate de excesul producției de gaze în tractul gastrointestinal și de cea mai mare
25 parte a volumului acestor gaze acumulate. Volumul creșcut al diferitelor gaze poate conduce la flatulență, de exemplu. Așa cum se arată în exemple, compozițiile bacteriene ale invenției pot fi eficiente pentru tratarea unui aspect specific de IBS și altor afecțiuni intestinale – hipersensibilitate viscerală. Fără a dori să fie legat de orice teorie, efectul observat al compozițiilor bacteriene ale invenției asupra hipersensibilității viscerale, poate fi asociat cu un efect al bacteriei asupra unui
30 gaz specific - H_2S , și cu un efect asupra bacteriei care reduce sulfatul (SRB), care sintetizează H_2S în intestin. H_2S poate avea roluri importante ca moleculă de semnalizare a durerii și efectul compozițiilor invenției asupra hipersensibilității viscerale observat în exemple poate fi asociat cu o reducere a producției de H_2S în intestin, ceea ce poate contribui la hipersensibilitatea viscerală prin afectarea semnalizării durerii, independent de orice efecte de balonare asociate cu volumul de
35 gaz. Exemplele demonstrează că, compozițiile bacteriene ale invenției pot fi eficiente pentru reducerea SRB și reducerea H_2S . În unele realizări, compozițiile bacteriene ale invenției reduc SRB și/sau reduc H_2S în cecum. SRB sunt bacterii anaerobe care utilizează reducerea de sulfat pentru generarea de energie și exemple de SRB includ membri de genul *Desulfovibrio*, și în particular *Desulfovibrio piger*, care este cea mai abundentă specie, și de asemenea
40 genurile *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* și *Desulfotomaculum*.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către SRB în tratamentul hipersensibilității viscerale. În astfel de
realizări, compoziția poate fi preferabil în forma unei culturi bacteriene. În astfel de realizări, compoziția poate fi preferabil un liofilizat. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru
45 utilizare în scăderea nivelurilor de H_2S sau în prevenirea nivelurilor de H_2S ridicate în tractul gastrointestinal în tratamentul hipersensibilității viscerale. În astfel de realizări, compoziția poate fi preferabil un liofilizat.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării, nivelurilor de comunitate și/sau populație ale tractului gastrointestinal de către SRB în tratamentul
50 hipersensibilității viscerale. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării, nivelurilor de comunitate și/sau populație ale cecumului prin SRB în tratamentul hipersensibilității viscerale.

În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către SRB, scăderea nivelurilor de H_2S , sau prevenirea nivelurilor de
55 H_2S ridicate, în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu IBS. În alte realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către SRB, scăderea nivelurilor de H_2S , sau prevenirea nivelurilor de H_2S ridicate, în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau

colica infantilă, de exemplu în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă sau dispepsia funcțională.

În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării, nivelurilor de comunitate și/sau populație ale tractului gastrointestinal de către SRB, scăderea nivelurilor de H₂S, sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S, în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu IBS. În alte realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării, nivelurilor de comunitate și/sau populație ale tractului gastrointestinal de către SRB, scăderea nivelurilor de H₂S, sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau colica infantilă, de exemplu, în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă sau dispepsia funcțională.

În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către SRB, scăderea nivelurilor de H₂S, sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S, în tratamentul hipersensibilității viscerale în abdomen, preferabil în tractul gastrointestinal, mai preferabil în tractul gastrointestinal inferior, în cecum, în colon sau în rect. În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea colonizării, nivelurilor de comunitate și/sau populație ale tractului gastrointestinal de către SRB, scăderea nivelurilor de H₂S, sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S, în tratamentul hipersensibilității viscerale în abdomen, preferabil în tractul gastrointestinal, mai preferabil în tractul gastrointestinal inferior, în cecum, în colon sau în rect.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de tratare, prevenire sau reducere a colonizării tractului gastrointestinal de către SRB. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de tratare, prevenire sau reducere a colonizării, nivelurilor de comunitate și/sau populație ale tractului gastrointestinal de către SRB. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de scădere a nivelurilor de H₂S sau de prevenire a nivelurilor ridicate de H₂S în tractul gastrointestinal.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea pacienților care prezintă, sau este de așteptat să prezinte, niveluri crescute de SRB și/sau H₂S în tractul lor gastrointestinal, de exemplu când, comparăm cu un subiect sănătos, sau cu o populație de subiecți sănătoși.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în prevenirea hipersensibilității viscerale la un subiect care primește sau a primit tratament cu antibiotic sau care suferă de, sau a suferit de gastroenterită bacteriană. Tratamentul cu antibiotic și gastroenterita bacteriană sunt asociate cu modificări în microbiota intestinală, care pot precede hipersensibilitatea viscerală și care pot fi prevenite prin compozițiile invenției. Compozițiile invenției pot fi administrate concomitent cu un tratament cu antibiotic.

În realizări preferate, tratamentul cu compoziții ale invenției rezultă într-o reducere în hipersensibilitatea viscerală, o reducere în colonizarea prin SRB, și/sau o reducere în nivelurile de H₂S.

Tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale se pot referi la, de exemplu, o ameliorare a severității simptomelor sau la o reducere a frecvenței exacerbărilor sau a intervalului de declanșare, care sunt o problemă pentru pacient. De exemplu, în unele realizări compoziția invenției este pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale severe. În unele realizări subiectul având hipersensibilitate viscerală severă este un subiect diagnosticat cu boala Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională, colică infantilă, sau, mai preferabil, IBS. În unele realizări subiectul care are hipersensibilitate viscerală severă este un subiect diagnosticat cu boala Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională sau, mai preferabil, IBS.

Moduri de administrare

Preferabil, compozițiile invenției sunt pentru a fi administrate tractului gastrointestinal pentru a permite livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană a invenției. În general, compozițiile invenției sunt administrate oral, dar ele pot fi administrate rectal, intranasal, sau prin căi bucale sau sublinguale.

În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi administrate ca spumă, ca pulverizator sau ca gel.

În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi administrate ca supozitoare, cum ar fi a supozitoarele rectale, de exemplu sub forma unui ulei de teobroma (unt de cacao), unei grăsimi

sintetice dure (de exemplu supocire, witepsol), glicero-gelatină, polietilenglicol, sau compoziție cu glicerină de săpun.

5 În anumite realizări, compoziția invenției este administrată tractului gastrointestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nasogastric, un tub orogastric, un tub gastric, un tub jejunostomic (J tube), gastronomie endoscopică percutanată (PEG), sau printr-un port, cum ar fi portul peretelui toracic care furnizează acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

10 Compozițiile invenției pot fi administrate o dată, sau ele pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite realizări, compozițiile invenției trebuie administrate zilnic. Exemplele demonstrează că administrarea zilnică furnizează cu succes colonizarea și beneficiile clinice la modelul pe șobolan al hiersensibilității viscerale.

Exemplele demonstrează de asemenea că administrarea BH poate să nu conducă la colonizarea permanentă a intestinului, astfel încât administrarea regulată pe perioade de timp extinse poate furniza beneficii terapeutice mai mari. Astfel, exemplele prezintă livrarea cu succes a tulpinii bacteriene a invenției la colon după administrarea zilnică.

15 Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției sunt administrate regulat, cum ar fi zilnic, la fiecare două zile, sau săptămânal, pentru o perioadă de timp extinsă, cum ar fi pentru cel puțin o săptămână, două săptămâni, o lună, două luni, șase luni, sau un an.

În unele realizări, compozițiile invenției sunt administrate pentru 7 zile, 14 zile, 16 zile, 21 zile sau 28 zile sau nu mai mult de 7 zile, 14 zile, 16 zile, 21 zile sau 28 zile. De exemplu, în 20 unele realizări, compozițiile invenției sunt administrate 16 zile.

În anumite realizări ale invenției, tratamentul în conformitate cu invenția este însoțit de evaluarea microbiotei intestinului pacientului. Tratamentul poate fi repetat dacă nu este obținută livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală cu tulpina invenției, astfel încât să se observe eficiența, sau tratamentul poate înceta dacă livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală este de 25 succes și se observă eficiența.

În anumite realizări, compoziția invenției poate fi administrată unui animal gravid, de exemplu unui mamifer cum ar fi un om pentru a preveni dezvoltarea hipersensibilității viscerale la copil său *in utero* și/sau după ce este născut.

30 Compozițiile invenției pot fi administrate unui pacient care a fost diagnosticat cu hipersensibilitate viscerală sau cu o boală sau afecțiune asociată cu hipersensibilitatea viscerală, sau care a fost identificat ca fiind expus riscului de hipersensibilitate viscerală. Compozițiile pot fi de asemenea administrate ca măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea hipersensibilității viscerale la un pacient sănătos.

35 Compozițiile invenției pot fi administrate unui pacient care a fost identificat ca având o microbiotă intestinală anormală. De exemplu, pacientul poate avea o colonizare redusă sau absentă de *Blautia*, și în particular de *Blautia hydrogenotro-phica*, *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

În general, compozițiile invenției sunt pentru tratamentul oamenilor, deși ele pot fi utilizate și pentru a trata animale incluzând mamiferele monogastrice cum ar fi păsările de curte, porcii, pisicile, cainii, caii sau iepurii. Compozițiile invenției pot fi utile pentru amplificarea creșterii și performanței animalelor. Dacă sunt administrate animalelor, poate fi utilizat gavajul oral.

În unele realizări, subiectul căruia îi este administrată compoziția este un adult uman. În unele realizări, subiectul căruia îi este administrată compoziția este un copil uman.

Compoziții

45 Compoziția invenției cuprinde bacterii. În realizări preferate ale invenției, compoziția este formulată în formă criodesicată. De exemplu, compoziția invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină tari, care cuprind o tulpină bacteriană a invenției.

50 Compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine stabilită și sunt disponibile îndrumări relevante, de exemplu, în referințele [24-26]. Exemplele demonstrează că, compozițiile liofilizate sunt în special eficiente. În realizări preferate, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate și este pentru tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu IBS, preferabil pentru scăderea nivelurilor de H₂S sau pentru prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S în tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu IBS. În alte realizări preferate, 55 compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate și este pentru tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu IBS, preferabil pentru utilizare în reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către SRB în tratamentul hipersensibilității viscerale. În alte realizări preferate, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate și este pentru tratamentul hipersensibilității viscerale asociate cu IBS, preferabil pentru utilizare în reducerea colonizării, a nivelurilor de

comunitate și/sau populație ale tractului gastrointestinal de către SRB în tratamentul hipersensibilității viscerale.

Alternativ, compoziția invenției poate cuprinde o cultură bacteriană vie, activă. Exemplele demonstrează că, culturile bacteriene ale invenției sunt terapeutic eficiente.

5 În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost inactivată, de exemplu, nu a fost inactivată la căldură. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost omorâtă, de exemplu, nu a fost omorâtă la căldură. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost atenuată, de exemplu, nu a fost atenuată la căldură. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost omorâtă, inactivată și/sau atenuată. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este vie. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă și capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului.

15 În unele realizări, compoziția cuprinde un amestec de tulpini bacteriene vii și tulpini bacteriene care au fost omorate.

În realizări preferate, compoziția invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinii bacteriene la intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la livrarea la locația țintă prin, de exemplu, ruperea cu stimuli chimici sau fizici cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică, sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificări în pH. Poate fi utilizată orice metodă de încapsulare adecvată. Exemple de tehnici de încapsulare includ captarea într-o matrice poroasă, atașarea sau adsorbția pe suprafețe purtătoare solide, autoagregarea prin floclare sau cu agenți de reticulare, și izolarea mecanică în spatele unei membrane microporoase sau a unei microcapsule. Orientările care privesc încapsularea pot fi utile pentru prepararea compozițiilor invenției care sunt disponibile în, de exemplu, referințele [27-28].

25 Compoziția poate fi administrată oral și poate fi sub forma unei tablete, capsule sau pulberi. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece *Blautia* sunt anaerobe. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse ca, captatori de oxigen și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală și supraviețuirea in vivo. Alternativ, compoziția probiotică a invenției poate fi administrată oral ca alimente sau produse nutriționale, cum ar fi produsele lactate fermentate pe bază de lapte sau zer, sau ca produs farmaceutic.

Compoziția poate fi formulată ca probiotic.

35 O compoziție a invenției include o cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană a invenției. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană este suficientă să exercite un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă să conducă la livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului pacientului.

O doză zilnică adecvată de bacterii, de exemplu pentru un adult uman, poate fi de la aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități de formare a coloniilor (CFU); de exemplu, de la aproximativ 1×10^7 până la aproximativ 1×10^{10} CFU; într-un alt exemplu de la aproximativ 1×10^6 până la aproximativ 1×10^{10} CFU; într-un alt exemplu de la aproximativ 1×10^7 până la aproximativ 1×10^{11} CFU; într-un alt exemplu de la aproximativ 1×10^8 până la aproximativ 1×10^{10} CFU; într-un alt exemplu de la aproximativ 1×10^8 până la aproximativ 1×10^{11} CFU.

45 În anumite realizări, doza de bacterii este cel puțin 10^9 celule pe zi, cum ar fi cel puțin 10^{10} , cel puțin 10^{11} , sau cel puțin 10^{12} celule pe zi.

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

De obicei, un probiotic, cum ar fi compoziția invenției, este combinat opțional cu cel puțin un compus prebiotic adecvat. Un compus prebiotic este uzual un carbohidrat nedigerabil cum ar fi o oligo sau polizaharidă, sau un alcool din zahăr, care nu este degradat sau absorbit în tractul digestiv superior. Prebiotice cunoscute includ produse comerciale cum ar fi inulina și transgalactooligozaharida.

55 În anumite realizări, compoziția probiotică a prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 până la aproximativ 30% din masă, în raport cu greutatea totală a compoziției, (de exemplu de la 5 până la 20% din masă). Carbohidrații pot fi selectați din grupul constând din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu catenă

scurtă, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, aminoduri modificate și rezistente la guma arabilă, polidextroze, D-tagatoze, fibre de acacia, carob, ovăz, și fibre de citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate prezentate aici mai jos ca FOSs-c.c); respectivii FOSs-c.c. nu sunt carbohidrați digerabili, obținuți în general prin transformarea zahărului din trestie și care includ o moleculă de zaharoză la care sunt legate trei molecule de glucoză.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți acceptabili farmaceutic sau purtători. Exemple de astfel de excipienți adecvați pot fi găsite în referința [29]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscute în domeniul farmaceutic și sunt descriși de exemplu, în referința [30]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și altele asemenea. Exemple de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorilor farmaceutici, excipienților sau diluanților poate fi selectată în raport de calea de administrare intenționată și practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de, purtător, excipient sau diluant orice liant, lubrifiant, agent de punere în suspensie, agent de acoperire, agent de solubilizare adecvați. Exemple de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale cum ar fi glucoza, lactoza anhidră, lactoza cu flux liber, beta-lactoza, îndulcitori din porumb, gume naturale și sintetice, cum ar fi acacia, tragacantul sau alginatul de sodiu, carboximetil celuloza și polietilenglicolul. Exemple de lubrifianți adecvați includ oleatul de sodiu, stearatul de sodiu, stearatul de magneziu, benzoatul de sodiu, acetatul de sodiu, clorura de sodiu și altele asemenea. Conservanții, stabilizatorii, coloranții și chiar agenții de aromatizare pot fi furnizați în compoziția farmaceutică. Exemple de conservanți includ benzoatul de sodiu, acidul sorbic, cisteina și esteri de acid p-hidroxibenzoic, de exemplu, în unele realizări conservantul este selectat dintre benzoatul de sodiu, acidul sorbic și esteri de acid p-hidroxibenzoic. Pot fi de asemenea utilizați antioxidanți și agenți de punere în suspensie. Un exemplu suplimentar al unui purtător adecvat este zaharoza. Un exemplu suplimentar al unui conservant este cisteina.

Compozițiile invenției pot fi formulate ca produse alimentare. De exemplu, un produs alimentar poate furniza beneficii nutriționale în plus față de efectul terapeutic al invenției, cum ar fi într-un supliment nutrițional. În mod similar, un produs alimentar poate fi formulat pentru a ameliora gustul compoziției invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă pentru consum prin faptul că este mai similară cu un produs alimentar comun, mai degrabă decât cu o compoziție farmaceutică. În anumite realizări, compoziția invenției este formulată ca produs pe bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte” înseamnă orice produs pe bază de lapte sau zer, lichid sau semisolid, care are un conținut de grăsime variabil. Produsul pe bază de lapte poate fi, de exemplu, lapte de vacă, lapte de capră, lapte de oaie, lapte degresat, întregul lapte, lapte recombinat din lapte praf și zer fără nici o procesare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurtul, laptele coagulat, brânza dulce, laptele acru, întregul lapte acru, unt de lapte și alte produse din lapte acru. O altă grupă importantă include băuturi din lapte, cum ar fi băuturile din zer, laptele fermentat, laptele condensat, laptele pentru copil sau sugar; laptele aromat, înghețata; laptele care conține alimente cum ar fi dulciurile.

În unele realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene de genul *Blautia* și nu conțin bacterii din nici un alt gen, sau care cuprind numai cantități de *minimis* sau irelevante biologic dintr-un alt gen de bacterii.

În anumite realizări, compozițiile invenției conțin o singură tulpină bacteriană sau specie și nu conțin nici o altă tulpină bacteriană sau specie. Astfel de compoziții pot cuprinde numai cantități de *minimis* sau irelevante biologic de alte tulpini bacteriene sau specii. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial fără alte specii de organisme. În unele realizări, astfel de compoziții pot fi un liofilizat care este substanțial fără alte specii de organisme.

În anumite realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin nici un alt gen bacterian, sau care cuprind numai cantități de bacterii de *minimis* sau irelevante biologic dintr-un alt gen. În anumite realizări, compozițiile invenției cuprind o singură specie de *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin nici o altă specie bacteriană, sau care cuprind numai cantități de bacterii de *minimis* sau irelevante biologic dintr-o altă specie. În anumite realizări, compozițiile invenției cuprind o singură tulpină de *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin nici o altă tulpină bacteriană sau specie, sau care cuprind numai cantități de bacterii de *minimis* sau irelevante biologic dintr-o altă tulpină sau specie.

În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o tulpină bacteriană sau specie. De exemplu, în unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o tulpină din aceleași specii (de exemplu mai mult de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 sau 45 tulpini), și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai puțin de 50 tulpini din aceleași specii (de exemplu mai puțin de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 sau 3 tulpini), și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, sau 31-50 tulpini din aceleași specii și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o specie din același gen (de exemplu mai mult de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 30, 35 sau 40 specii), și, opțional, nu conțin bacterii din nici un alt gen. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai puțin de 50 specii din același gen (de exemplu mai puțin de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4 sau 3 specii), și, opțional, nu conțin bacterii din nici un alt gen. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, sau 31-50 specii din același gen și, opțional, nu conțin bacterii din nici un alt gen. Invenția cuprinde orice combinație ale celor de mai sus.

În unele realizări, compoziția cuprinde tulpina bacteriană *Blautia hydrogenotrophica* ca parte a unui consorțiu microbial. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană *Blautia hydrogenotrophica* este prezentă în combinație cu una sau mai multe (de exemplu cel puțin 2, 3, 4, 5, 10, 15 sau 20) alte tulpini bacteriene din alt gen, cu care ea poate trăi simbiotic in vivo in intestin. De exemplu, în unele realizări, compoziția cuprinde o tulpină bacteriană de *Blautia hydrogenotrophica* în combinație cu o tulpină bacteriană dintr-un gen diferit. În unele realizări, consorțiul microbial cuprinde două sau mai multe tulpini bacteriene obținute de la o mostră de fecale a unui singur organism, de exemplu un om. În unele realizări, consorțiul microbial nu este găsit împreună în natură. De exemplu, în unele realizări, consorțiul microbial cuprinde tulpini bacteriene obținute din mostrele fecale a cel puțin două organisme diferite. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt din aceleași specii, de exemplu de la doi oameni diferiți. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un copil uman și un adult uman. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un om și a mamifer neuman.

În unele realizări, compoziția invenției cuprinde suplimentar o tulpină bacteriană care are aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpina *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294, dar care nu este tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294, sau care nu este o *Blautia hydrogenotrophica* sau care nu este o *Blautia*.

În unele realizări în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, specie sau gen, tulpinile bacteriene individuale, speciile sau genurile pot fi pentru administrare separată, simultană sau secvențială. De exemplu, compoziția poate cuprinde toate cele mai multe tulpini bacteriene, specii sau genuri, sau tulpinile bacteriene, speciile sau genurile pot fi depozitate separat și administrate separat, simultan sau secvențial. În unele realizări, mai mult de o tulpină bacteriană, specie sau gen sunt depozitate separat dar sunt amestecate împreună înainte de utilizare.

În unele realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție este obținută din fecalele unui adult uman. În unele realizări, în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, toate tulpinile bacteriene sunt obținute din fecalele de adult uman, sau dacă alte tulpini bacteriene sunt prezente, ele sunt prezente numai în cantități *de minimis*. Bacteriile s-ar putea să fi fost cultivate după ce au fost obținute din fecalele de adult uman și utilizate într-o compoziție a invenției.

În unele realizări, una sau mai multe tulpini bacteriene *Blautia hydrogenotrophica* este/sunt singurul agent activ terapeutic într-o compoziție a invenției. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziție este singurul agent activ terapeutic într-o compoziție a invenției.

Compozițiile pentru utilizare conform invenției pot, sau pot să nu necesite aprobare de comercializare.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care respectiva tulpină bacteriană este liofilizată. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care respectiva tulpină bacteriană este uscată prin pulverizare. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care este vie. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată

sau uscată prin pulverizare și în care este viabilă. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care este capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care este viabilă și capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului.

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

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

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare când se administrează unui subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este hipersensibilitate viscerală, cum ar fi hipersensibilitatea viscerală asociată cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională, colica infantilă sau, mai preferabil, IBS.

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare când se administrează unui subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este hipersensibilitate viscerală, cum ar fi hipersensibilitatea viscerală asociată cu boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau, mai preferabil, IBS.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de la aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități de formare a coloniilor pe gram, față de o greutate a compoziției.

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

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

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

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, care cuprinde un diluant selectat din grupul care constă din etanol, glicerol și apă.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, care cuprinde un excipient selectat din grupul care constă din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu flux liber, beta-lactoză, îndulcitor de porumb, acacia, tragacant, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, polietilenglicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, care cuprinde în plus cel puțin un conservant, un antioxidant și un stabilizator.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, care cuprinde un conservant selectat din grupul care constă din benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri de acid p-hidroxibenzoic.

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

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care când compoziția este depozitată într-un recipient etanșat la aproximativ 4°C sau aproximativ 25°C și recipientul este plasat într-o atmosferă având 50% umiditate relativă, cel puțin 80% din tulpina bacteriană după cum s-a măsurat în unitățile de formare a coloniilor, rămânând după o perioadă de cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.

În unele realizări, compoziția invenției este prevăzută într-un recipient etanșat care cuprinde o compoziție cum s-a descris aici. În unele realizări, recipientul etanșat este un pliculeț sau sticlă. În unele realizări, compoziția invenției este prevăzută într-o seringă care cuprinde o compoziție cum s-a descris aici.

Compoziția din prezenta invenție poate, în unele realizări, să fie furnizată ca formulare farmaceutică. De exemplu, compoziția poate fi furnizată ca tabletă sau capsulă. În unele realizări, capsula este o capsulă cu gelatină („gel-cap”).

În unele realizări, compozițiile invenției sunt administrate oral. Administrarea orală poate
5 implica înghițirea, astfel încât compusul să intre în tractul gastrointestinal, și/sau administrarea bucală, linguală, sau sublinguală prin care compusul intră în fluxul sanguin direct din gură.

Formulări farmaceutice adecvate pentru administrarea orală includ dopuri solide, microparticule solide, semi-solide și lichide (incluzând faze multiple sau sisteme dispersate) cum
10 ar fi tabletele; capsule moi sau tari care conțin multi sau nanoparticule, lichide (de exemplu soluții apoase), emulsii sau pulberi; pastile (inclusiv umplute cu lichid); masticabile; geluri; forme de dozare cu dispersare rapidă; filme; ovule; pulverizatoare; și plasturi bucali/mucoadezivi.

În unele realizări formularea farmaceutică este o formulare enterică, adică o formulare gastro-rezistentă (de exemplu, rezistentă la pH-ul gastric) care este adecvată pentru livrarea
15 compoziției invenției în intestin prin administrare orală. Formulările enterice pot fi utile în special când bacteria sau o altă componentă a compoziției este sensibilă la acid, de exemplu predispusă la degradare sub condiții gastrice.

În unele realizări, formularea enterică cuprinde o acoperire enterică. În unele realizări, formularea este o formă de dozare acoperită enteric. De exemplu, formularea poate fi o tabletă
20 acoperită enteric sau o capsulă acoperită enteric, sau altele asemenea. Acoperirea enterică poate fi o acoperire enterică convențională, de exemplu, o acoperire convențională pentru o tabletă, capsulă, sau altele asemenea pentru livrare orală. Formularea poate cuprinde un film de acoperire, de exemplu, un strat subțire de film al unui polimer enteric, de exemplu un polimer insolubil în acid.

În unele realizări, formularea enterică este intrinsec enterică, de exemplu, gastro-
25 rezistentă fără necesitatea unei acoperiri enterice. Astfel, în unele realizări, formularea este o formulare enterică care nu cuprinde o acoperire enterică. În unele realizări, formularea este o capsulă făcută dintr-un material termogelant. În unele realizări, materialul termogelant este un material celulozic, cum ar fi metilceluloza, hidroximetilceluloza sau hidroxipropilmetilceluloza (HPMC). În unele realizări, capsula cuprinde o carcasă care nu conține nici un polimer care
30 formează filmul. În unele realizări, capsula cuprinde o carcasă și carcasa cuprinde hidroxipropilmetilceluloză și nu cuprinde nici un polimer care formează film (de exemplu vezi [31]). În unele realizări, formularea este o capsulă enterică intrinsecă (de exemplu, Vcaps® de la Capsugel).

În unele realizări, formularea este o capsulă moale. Capsulele moi sunt capsule care pot,
din cauza adăugării emolienților, cum ar fi de exemplu, glicerolul, sorbitolul, maltitolul și
35 polietilenglicolii, prezenți în carcasa capsulei, să aibă o anumită elasticitate și moliciune. Capsulele moi pot fi produse, de exemplu, pe bază de gelatină sau amidon. Capsulele moi pe bază de gelatină sunt disponibile comercial de la diferiți furnizori. Depinzând de metoda de administrare, cum ar fi de exemplu, orală sau rectală, capsulele moi poate avea diferite forme, ele putând fi de exemplu, rotunde, ovale, de formă alungită sau torpilă. Capsulele moi pot fi produse prin procedee
40 convenționale, cum ar fi de exemplu, prin procedeul Scherer, prin procedeul Accogel sau prin procedeul picăturii sau suflării.

Metode de cultivare

Tulpinile bacteriene pentru utilizare în prezenta invenție pot fi cultivate utilizând tehnici microbiologice standard, cum s-a detaliat de exemplu în referințele [32-34].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate de exemplu să fie mediul agar YCFA
45 sau mediul YCFA. Mediul YCFA poate include (pe 100ml, valori aproximative): caziton (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g), NaHCO_3 (0,4 g), cisteină (0,1 g), K_2HPO_4 (0,045 g), KH_2PO_4 (0,045 g), NaCl (0,09 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 g), CaCl_2 (0,009 g), resazurin (0,1 mg), hemin (1 mg), biotină (1 μg), cobalamină (1 μg), acid *p*-aminobenzoic (3 μg), acid folic (5 μg), și piridoxamină (15 μg).
50

General

Practica prezentei invenții va utiliza, dacă nu este indicat altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în cadrul specialiștilor în domeniu. Astfel de tehnici sunt explicate complet în literatură. Vezi, de exemplu, referințele [35-
55 42], etc.

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

Termenul „aproximativ” în relație cu o valoare numerică x este opțional și înseamnă, de exemplu, $x \pm 10\%$.

Cuvantul „substanțial” nu exclude „complet” *de exemplu* o compoziție care este „substanțial fără” de la Y, poate fi complet fără Y. Unde este necesar, cuvantul „substanțial” poate fi omis din definiția invenției.

Referirile la o identitate de secvență procentuală între două secvențe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, procentul de nucleotide este același în compararea celor două secvențe. Această aliniere și omologia procentuală sau identitatea de secvență poate fi determinată utilizând programe software cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunile 7.7.18 din ref. [43]. O aliniere preferată este determinată prin algoritmul de căutare omologă Smith-Waterman care utilizează o căutare a decalajului de afinitate cu o pedeapsă de deschidere a afinității de 12 și o pedeapsă de extensie a afinității de 2, matricea BLOSUM de 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este divulgat în ref. [44].

În afară de cazul când nu se specifică altfel, un procedeu sau metodă care cuprinde numeroase etape, poate cuprinde etape suplimentare la începutul sau la sfârșitul metodei, sau poate cuprinde etape de intervenție suplimentare. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau efectuate într-o ordine alternativă, dacă este adecvat.

Sunt descrise aici diferite realizări ale invenției. Se va aprecia că pot fi combinate caracteristicile specificate în fiecare realizare cu alte caracteristici specificate, pentru a furniza alte realizări. În particular, realizările evidențiate aici ca fiind adecvate, tipice sau preferate pot fi combinate una cu cealaltă (cu excepția cazului când ele sunt reciproc exclusive).

MODURI PENTRU EFECTUAREA INVENȚIEI

Exemplul 1 – Eficacitatea inoculării bacteriene într-un model pe șobolan a hipersensibilității viscerele

Rezumat

Șobolanii au fost inoculați cu microbiotă fecală de la un subiect uman cu IBS care prezintă hipersensibilitate viscerală. Șobolanilor le-au fost apoi administrate compoziții care cuprind tulpini bacteriene în conformitate cu invenția și au fost apoi testați utilizând un test de distensiune pentru a măsura hipersensibilitatea viscerală. S-a constatat că, compozițiile invenției reduc răspunsul șobolanilor la distensiune, ceea ce indică o reducere în hipersensibilitatea viscerală.

Tulpina

Tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294.

Compoziții și administrare

Cultura BH (16H) sau liofilizat - administrat prin gavaj oral

Soluția de control administrată prin gavaj oral

Șobolani

Inoculați cu microbiotă intestinală umană de la un subiect cu IBS.

Proiectul studiului

Ziua -14 - șobolanii inoculați cu microbiotă intestinală umană de la un subiect cu IBS

Zilele 0 până la 28 - doză zilnică de cultură BH sau liofilizat, sau soluție de control

Zilele 0, 14 și 28 - qPCR a populației BH în mostrele fecale

Între zilele 14 și 28 - operația de implantare a electrodului în abdomen (pentru testul de distensiune)

Ziua 28 – test de distensiune, mostre cecale colectate pentru analiza sulfurilor și acidului gras cu catenă scurtă (SCFA), enumerarea microbilotei în mostrele fecale în mediu selectiv.

Rezultate

Figura 1 prezintă rezultatele unei analize qPCR a populației BH în mostrele fecale de la șobolani cărora le-a fost administrată soluție de control (IBS) sau liofilizat BH (IBS+BH). O creștere în populația BH a fost văzută în zilele 14 și 28 la șobolanii care au primit liofilizatul BH, care confirmă colonizarea cu succes.

Figura 2 prezintă rezultatele testului de distensiune. Șobolanii au fost supuși la distensiune colorectală și au fost înregistrat numărul de contracții pe minut ca măsură specifică a hipersensibilității viscerele. Șobolanii tratați cu compozițiile invenției au prezentat contracții reduse și hipersensibilitate viscerală redusă.

Figurile 3 și 4 raportează efectele administrării culturii BH și liofilizatului asupra microbiotei din mostrele fecale. Administrarea culturii BH a condus la o reducere notabilă (1 log) în bacteria de reducere a sulfatului (SRB).

Figura 5 raportează impactul administrării liofilizatului BH asupra fermentării microbiotei după cum s-a măsurat prin concentrațiile de acizi grași cu catenă scurtă în mostrele cecale. Administrarea de liofilizat BH a condus la o creștere în producția de acetat.

Figura 6 raportează impactul administrării liofilizatului BH asupra fermentării microbiotei după cum s-a măsurat prin concentrația de sulfură din mostrele cecale (H_2S). Administrarea de BH a condus la o scădere în producția de sulfură.

10

Concluzii

Administrarea de compoziții care cuprind *Blautia hydrogenotrophica* a condus la colonizarea cu succes și la reducerea notabilă în hipersensibilitatea viscerală, după cum s-a măsurat utilizând testul de distensiune. Acest efect a fost observat când *Blautia hydrogenotrophica* a fost administrată ca cultură și ca liofilizat. Administrarea de *Blautia hydrogenotrophica* a avut de asemenea efect notabil asupra constituirii și fermentării microbiotei, cu reduceri observate în SRB și producția de sulfură. Aceste date au indicat că *Blautia hydrogenotrophica* poate fi utilă pentru reducerea hipersensibilității viscerale, și în particular a hipersensibilității viscerale asociate cu IBS. Reducerea în hipersensibilitatea viscerală poate fi asociată cu reducerile observate în SRB și producția de sulfură.

Exemplul 2 - Eficacitatea liofilizatului bacterian într-un model pe șobolan al hipersensibilității viscerale

Observațiile din exemplul 1 au fost confirmate în experimente suplimentare utilizând un liofilizat de tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 și un model pe șobolan de IBS. Așa cum se arată în Figurile 7 și 8, administrarea liofilizatului BH a furnizat o reducere statistic semnificativă în numărul contracțiilor abdominale în răspunsul la distensiune, care indică o reducere în hipersensibilitatea viscerală. În Figura 7 a fost utilizată o mostră fecală de la un subiect cu IBS pentru a fi inoculată șobolanilor. În Figura 8 mostrele fecale de la trei subiecți cu IBS au fost utilizate pentru a fi inoculate șobolanilor, cu unul din acești subiecți cu IBS fiind același cu subiectul cu IBS utilizat în Figura 7. Mai mult, așa cum se arată în Figurile 9 și 10, administrarea liofilizatului BH a furnizat o reducere statistic semnificativă în sulfuri. În Figura 9 a fost utilizată o mostră fecală de la un subiect cu IBS pentru a fi inoculată șobolanilor. În Figura 10, au fost utilizate mostre fecale de la trei subiecți cu IBS pentru a fi inoculate șobolanilor, cu unul din acești subiecți cu IBS fiind același cu subiectul cu IBS utilizat în Figura 9.

Exemplul 3 – Efectele liofilizatului bacterian asupra șobolanilor sănătoși

Au fost studiate efectele administrării unui liofilizat de tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 asupra șobolanilor HIM sănătoși și rezultatele sunt raportate în Figurile 11-14. Detalii suplimentare referitoare la experimente sunt furnizate mai sus în descrierea figurilor. Figura 11 arată că o doză adecvată pentru BH la șobolani este 10^9 celule pe zi sau mai mare. Figura 12 arată că în aceste experimente BH nu a colonizat permanent tractul digestiv al șobolanului. Figura 13 arată că BH este găsit în primul rând în cecum. Figura 14 arată că administrarea de BH induce o creștere în acetat precum și în producția de butirat.

Exemplul 4 – Eficacitatea liofilizatului bacterian într-un model pe șobolan al hipersensibilității viscerale

Efectele administrării unui liofilizat de tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 pe un model pe șobolan cu IBS au fost investigate suplimentar. Șobolanii fără germeni au fost inoculați cu mostre fecale de la pacienți cu C-IBS (cu constipație) sau cu U-IBS (nesubstituiți). Cea mai mare parte a experimentelor au fost efectuate cu mostre fecale de la pacienți cu IBS care prezentau hipersensibilitate viscerală (VH măsurată cu barostatul). Rezultatele sunt raportate în Figurile 15 și 16 și detalii suplimentare referitoare la experimente sunt furnizate mai sus în descrierea figurilor. Figura 15 confirmă că administrarea de liofilizat BH cauzează o reducere statistic semnificativă în bacteria care reduce sulfatul. După cum s-a așteptat, se observă de asemenea o creștere în BH. Figura 16 arată că administrarea BH a indus o scădere statistic semnificativă în cantitatea de H_2S produs de șobolanii HIM cu IBS. Supraproducția de H_2S cecal prin microbiota intestinală este asociată cu hipersensibilitatea viscerală.

Exemplul 5 - Modificări în simptomele pacientului în timpul studiului clinic de Fază I

A fost efectuat un studiu clinic de Fază I, în care *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", tulpină depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294) a fost administrată pacienților umani care au sindrom de colon iritabil (IBS). Pacienților le-a fost administrat Blautix în timpul unei perioade de dozare (zilele 1-16) cu perioada de eliminare fiind în zilele 19-23. S-a constatat că Blautix este atât sigur cât și bine tolerat. Au fost monitorizate patru simptome, din care unul a fost durerea abdominală. Studiul a înregistrat dacă pacienții au prezentat o îmbunătățire, nici o modificare sau o înrăutățire a fiecăruia din aceste simptome. Rezultatele de la pacienții cărora le-a fost administrat Blautix au fost comparate cu cele obținute utilizând pacienți cărora le-a fost administrat un placebo. Simptomele au fost monitorizate la trei momente de timp: ziua 1, ziua 15/16 și la finalul studiului. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 17 și 18.

Când simptomele raportate ale pacienților în ziua 16 au fost comparate cu linia de bază din ziua 1, 82% din 17 pacienții cu IBS care au primit Blautix au raportat o îmbunătățire în simptome (Figura 17). Îmbunătățirea simptomelor, din care unul este durerea abdominală, susține utilizarea de Blautix pentru tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale. Notabil, pacienții 3,02, 3,17 și 3,24, care au avut toți dureri abdominale severe la începutul studiului, au avut ușoare, slabe, și nici o durere abdominală, respectiv în ziua 15/16.

50% din pacienții care au primit placebo au raportat o îmbunătățire a simptomelor (Figura 17). Ratele de răspuns ridicate la placebo sunt un fenomen stabilit în studii clinice de IBS. Xifaxan a fost recent aprobat pentru a trata IBS pe baza unor îmbunătățiri mult mai mici față de placebo [45].

Este așteptată o înrăutățire a simptomelor la terminarea studiului (ziua 19-23) în comparație cu simptomele prezente după terminarea dozării (ziua 16), pe baza învățăturilor prezentate aici. Această înrăutățire a simptomelor a fost văzută în studiul clinic de fază I: 41% din pacienții cu IBS au raportat înrăutățirea simptomelor după încetare dozării cu Blautix (Figura 18). Înrautățirea simptomelor, din care unul este durerea abdominală, după încetarea dozării cu Blautix, susține prin urmare de asemenea utilizarea de Blautix în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale.

Exemplul 6 - Eficacitatea *B. hydrogenotrophica* asupra hipersensibilității viscerale studiată pe modelul pe șobolan (șobolan HMA) asociat microbiotei umane**Rezumat**

Grupuri de 16 șobolani fără germeni (care cuprind 8 șobolani în grupul de control și 8 șobolani în grupul de tratament) au fost inoculate cu microbiotă fecală de la un subiect uman cu IBS (șobolani IBS-HMA). Au fost efectuate trei experimente succesive utilizând mostre fecale de la 3 pacienți diferiți cu IBS. Două alte grupuri de șobolani (n = 10) au fost inoculați cu mostre fecale de la subiecți sănătoși (n=2 subiecți; 2 grupuri de șobolani HMA sănătoși) ca control al hipersensibilității viscerale. Astfel, au fost 24 de șobolani asociați cu microbiota IBS (control), 24 de șobolani asociați cu microbiota IBS tratați cu Blautix și 20 de șobolani sănătoși asociați cu microbiota. La jumătate din șobolani IBS-HMA le-a fost apoi administrată pentru 28 zile o compoziție cuprinzând tulpina bacteriană de *B. hydrogenotrophica* în conformitate cu invenția, în timp ce cealaltă jumătate din animale a primit o soluție de control. După 28 de zile de administrare, toți șobolanii HMA au fost testați utilizând un test de distensiune colonică pentru a măsura sensibilitatea viscerală. S-a descoperit că, compoziția invenției a redus răspunsul șobolanilor IBS-HMA la distensiune, ceea ce indică o reducere în hipersensibilitatea viscerală care a atins o normo-sensibilitate ca cea observată la șobolanii HMA sănătoși.

Tulpină

Tulpina (BH) de *Blautia hydrogenotrophica* DSM 10507^T/14294.

Compoziție și administrare

Liofilizatul BH a fost suspendat într-o soluție minerală sterilă la o concentrație de 10¹⁰ bacterii pe ml. Doi ml din această suspensie au fost administrați zilnic pe șobolan IBS-HMA, prin gavage oral, pentru o perioadă de 28 zile.

Soluția de control a fost soluția minerală sterilă care a fost administrată zilnic (2 ml pe șobolan) prin gavage oral grupului de control de șobolani IBS-HMA.

Șobolani

Șobolanii Fisher masculi fără germeni (cu vârsta de 10 săptămâni) au fost inoculați cu microbiotă fecală umană de la un subiect cu IBS (șobolani IBS-HMA). Șaisprezece șobolani au fost inoculați cu același inocul de fecale umane. Au fost efectuate trei experimente succesive cu

mostre fecale de la trei subiecți diferiți cu IBS. Două alte grupuri, adesea șobolani, au fost inoculate cu mostre fecale de la 2 subiecți sănătoși (grupuri de control normo-sensibile).

Proiectul studiului

5

Ziua -14 - Inocularea șobolanilor fără germeni cu microbiotă fecală umană.

Zilele 0 până la 28 - Doză zilnică de liofilizat BH (grup de test), sau soluție de control (grup de control) prin gavaj oral

10

Între zilele 14 și 22 - operația de implantare a electrodului în abdomen (pentru testul de distensiune)

Zilele 22-28 - Adaptarea șobolanilor pentru a evita stresul asociat cu testul de distensiune.

Ziua 28 – testul de distensiune și eutanasierea animalelor pentru a colecta mostre cecale pentru analiza sulfurilor și acidului gras cu catenă scurtă (SCFA).

15

Zilele 0, 14 și 28 – Colectarea de mostre fecale pentru analiza microbiană: qPCR pentru evaluarea populației BH și altor grupuri comensale de microorganisme și enumerarea grupurilor funcționale de microorganisme utilizând metoda mediului selectiv și strict anaerobic.

Rezultate

20

Figura 19 prezintă rezultatele analizei qPCR a populației de *B. hydrogenotrophica* în mostrele fecale de la șobolanii IBS-HMA care au primit o soluție de control sau un liofilizat BH.

O creștere semnificativă în populația BH a fost observată la sfârșitul perioadei de administrare (ziua 28) la șobolanii care au primit liofilizatul BH, ceea ce confirmă livrarea cu succes a BH în colon.

25

Figura 20 prezintă rezultatele testului de distensiune. Șobolanii au fost supuși la distensiune colorectală și numărul de contracții la 5 minute a fost înregistrat ca măsură specifică a hipersensibilității viscerale. Șobolanii IBS-HMA tratați cu compoziția invenției au prezentat contracții reduse, reflectând o reducere în hipersensibilitatea viscerală. După tratamentul cu *B. hydrogenotrophica*, șobolanii IBS-HMA au prezentat o sensibilitate normo-viscerală, în comparație cu cea măsurată la șobolanii HMA sănătoși.

30

Figura 21 raportează efectele administrării de *B. hydrogenotrophica* asupra unor grupuri de microorganisme din microbiota fecală, găsită anterior ca fiind afectată la pacienții cu IBS. Administrarea de BH a rezultat într-o reducere semnificativă în bacteria care reduce sulfatul (SRB).

35

Figura 22 raportează impactul administrării de BH asupra concentrației de sulfură (H_2S) în mostrele fecale ale șobolanilor IBS-HMA. Administrarea de BH a condus la o scădere semnificativă în producția de sulfură. Datele din Figura 22 sunt același ca cele din Figura 10 dar scara este diferită.

40

Figura 23 raportează impactul administrării de BH asupra principalilor metaboliți fermentativi, acizilor grași cu catenă scurtă, în mostrele cecale ale șobolanilor IBS-HMA. Administrarea de BH a condus la o creștere semnificativă în concentrația de acetat precum și la o creștere semnificativă în concentrația de butirat (Figura 23b).

Concluzii

45

Administrarea unei compoziții care cuprinde *Blautia hydrogenotrophica* a condus la o reducere semnificativă în hipersensibilitatea viscerală, după cum s-a măsurat utilizând testul de distensiune. După tratament, sensibilitatea viscerală a șobolanilor IBS-HMA a fost găsită ca fiind similară cu cea măsurată la șobolanii HMA sănătoși. Administrarea compoziției care cuprinde *B. hydrogenotrophica* poate reface sensibilitatea viscerală a animalelor IBS-HMA la una normală. Administrarea de *Blautia hydrogenotrophica* a avut de asemenea un efect semnificativ asupra constituției și fermentării microbiotei, și în special a indus reduceri importante în SRB și producția de sulfură. Aceste date au indicat că *Blautia hydrogenotrophica* poate fi utilă pentru reducerea hipersensibilității viscerale, și în particular a hipersensibilității viscerale asociate cu IBS. Reducerea hipersensibilității viscerale poate fi asociată cu reducerile observate în SRB și producția de sulfură.

50

Exemplul 7 – Testarea stabilității

55

O compoziție descrisă aici, conținând cel puțin o tulpină bacteriană, este descrisă aici depozitată într-un recipient etanșat la 25°C sau 4°C și recipientul este plasat într-o atmosferă având 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% sau 95% umiditate relativă. După 1 lună, 2 luni, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani, cel puțin 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% din tulpina bacteriană va rămâne, după cum s-a măsurat în unitățile de formare a coloniilor determinate prin protocoale standard.

Secvențe

SEQ ID NO:1 (Genă ARN ribozomală 16S GAM6-1 tulpină de *Blautia stercoris*, secvență parțială - HM626177)

5

```

1  tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccgggtgg
181 tatgagatgg acccgcgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaattattgca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggatgttaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gacgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt tttcttgag tgccggagag
601 gtaagcgga ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcggt tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg ggagcaaagc
781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag
901 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt
1021 ggggttaagtc ccgaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg
1321 ggtctgttac acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc

```

10

SEQ ID NO:2 (Genă ARN ribozomală 16S 14507 tulpină de *Blautia wexlerae*, secvență parțială - EF036467)

1 caagtcgaac ggggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
 181 aagatggacc cgcgttgat tagcttgttg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgac
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccggc
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaacct tctatcagca gggaagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gcccgggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcatgggct caacctgttg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
 601 agcggaaatc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
 661 ggcggttac tggacggtta ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcggtggagc atgtgggtta attcgaagca
 901 acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggatctttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtgatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcaat
 1081 ctggggagac tggcagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cgtgaatac gttcccggt
 1321 cttgtacaca ccgccgtca cccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
 1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

SEQ ID NO:3 (secvență rARN 16S consens pentru tulpina 830 de *Blautia stercoris*)

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
 CGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTCATAACGGGGGATAACA
 GTTGAAACCGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
 GGACCCGCGCTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
 ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
 CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAATGACGG
 TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
 AAATGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAGCTCTTCGGTGCCGACGCAACGCAA
 TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGTTTTATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTCTGTAATGGAACCTT
 TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 5 CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTAACACCCGCCCTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

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

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCCGCTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG
 CACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAG
 CGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
 GTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAAACGCAGTAAGTATCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTTCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GCGGTAAACAAAGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
 AACC CGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO:5 (genă ARN ribozomală 16S S5a36 tulpină de *Blautia hydrogenotrophica*, secvență parțială - X95624.1)

5

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
 61 tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt
 181 cgcatagaagc ggtgtgaaaa actgaggttg tataggatgg acccgcggtg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccac caagggcagc atccatagcc ggctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gccc aaactc ctacgggagg cagcagtggt gaattattgca
 361 caatggggga aacctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgcggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcggtatcc ggatttactg ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgga ttcctagtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaagcgggc tgctggacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttccacactg gggagtagt tcgcaagaat gaaactcaa ggaattgacg gggaccgcga
 901 caagcgggtg agcatgtgt ttaattcgaa gcaacgcga gaaccttacc aaatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca
 1021 tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaagggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaactc aaaaataacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctctgta cacaccgcc gtcacacat
 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgaac caaccnaag gagggagctg ccgaagggtg
 1441 gactgataac tggggtga

10

REFERINȚE

- [1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Tap et al. (2009), *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84.
- 5 [4] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [5] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [6] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [7] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [8] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- 10 [9] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [10] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [11] Lopetuso et al. (2013), *Gut Pathogens*, 5: 23
- [12] WO 2013/050792
- [13] WO 03/046580
- 15 [14] WO 2013/008039
- [15] WO 2014/167338
- [16] Lee și Lee (2014) *World J Gastroenterol.* 20(27): 8886-8897.
- [17] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [18] Bernalier et al. (1996) *Arch. Microbiol.* 166 (3), 176-183.
- 20 [20] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [21] Srůtkova et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [22] Robinson și Gebhart (2008) *Mol Interv*, 8(5): 242-253.
- [23] Zhou et al. (2010) *Pain.* 148(3): 454-461.
- [24] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- 25 [25] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. de Day și McLellan, Humana Press.
- [26] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [27] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [28] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [29] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Ediția a 2-a, (1994), Editată de A Wade și PJ Weller
- 30 [30] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [31] US 2016/0067188
- [32] *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [33] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- 35 [34] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [35] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
- [36] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., ed., 1998, Academic Press).
- 40 [37] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [38] *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. I-IV (D.M. Weir și C.C. Blackwell, ed, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [39] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 45 [40] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [41] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, ediția a 5-a (Current Protocols).
- [42] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- 50 [43] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., ed., 1987) Supplement 30
- [44] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [45] XIFAXAN- rifaximin tablet, Salix Pharmaceuticals, Inc. - FDA Highlights of Prescribing Information, Revizuită Noiembrie 2015

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- 4DPharma: "4Dpharma PLC clinical update on Blautix(TM), a novel treatment for irritable bowel syndrome", 4DPharma, 19 January 2016 (2016-01-19), XP002769874, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.directorstalkinterviews.com/4d-pharma-plc-clinical-update-on-blautix-a-novel-treatment-for-irritable-bowel-syndrome/412689588> [retrieved on 2017-05-05]
- WO-A1-01/85187
- WO-A2-2009/154463
- XU GUANG-YIN ET AL: "The endogenous hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine-I synthase contributes to visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome", MOLECULAR PAIN, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 6 August 2009 (2009-08-06), page 44, XP021059779, ISSN: 1744-8069, DOI: 10.1186/1744-8069-5-44
- DISTRUTTI ELEONORA ET AL: "Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies.", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 21 FEB 2016, vol. 22, no. 7, 21 February 2016 (2016-02-21), pages 2219-2241, XP002769875, ISSN: 2219-2840

(57) Revendicări:

1. O compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a hipersensibilității viscerale.

2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care hipersensibilitatea viscerală este asociată cu IBS, boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau colica infantilă.

3. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 2, în care hipersensibilitatea viscerală este asociată cu IBS, boala Crohn, colita ulcerativă sau dispepsia funcțională.

4. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția este pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu IBS, boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau colica infantilă.

5. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 4, în care compoziția este pentru utilizare în tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu IBS, boala Crohn, colita ulcerativă sau dispepsia funcțională.

6. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care compoziția este pentru utilizare în:

(i) reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către bacterii care reduc sulfat (SRB) în tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale; sau

(ii) scăderea nivelurilor de H₂S sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S în tractul gastrointestinal, în tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale; sau

(iii) tratarea sau prevenirea hipersensibilității viscerale la un pacient care suferă de distensiunea dureroasă a tractului gastrointestinal, în particular în colon sau rect.

7. Compoziția pentru utilizare conform revendicărilor 1-6, în care tulpina bacteriană are o secvență rARN 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența rARN 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*.

8. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 7, în care tulpina bacteriană are o secvență rARN 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5 sau care are secvența rARN 16s din SEQ ID NO:5.

9. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția cuprinde o tulpină bacteriană din specii *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare în:

(i) o metodă de tratare sau prevenire a hipersensibilității viscerale la un subiect diagnosticat cu IBS; sau

(ii) reducerea colonizării tractului gastrointestinal de către bacterii care reduc sulfat (SRB), scăderea nivelurilor de H₂S sau prevenirea nivelurilor ridicate de H₂S în tractul gastrointestinal, în tratamentul sau prevenirea hipersensibilității viscerale.

10. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care compoziția este pentru administrare orală.

11. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic.

12. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau este viabilă.

13. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care compoziția cuprinde o singură tulpină din specii *Blautia hydrogenotrophica*.

14. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, care cuprinde tulpina bacteriană *Blautia hydrogenotrophica* ca parte a unui consorțiu microbial.

FIG. 1

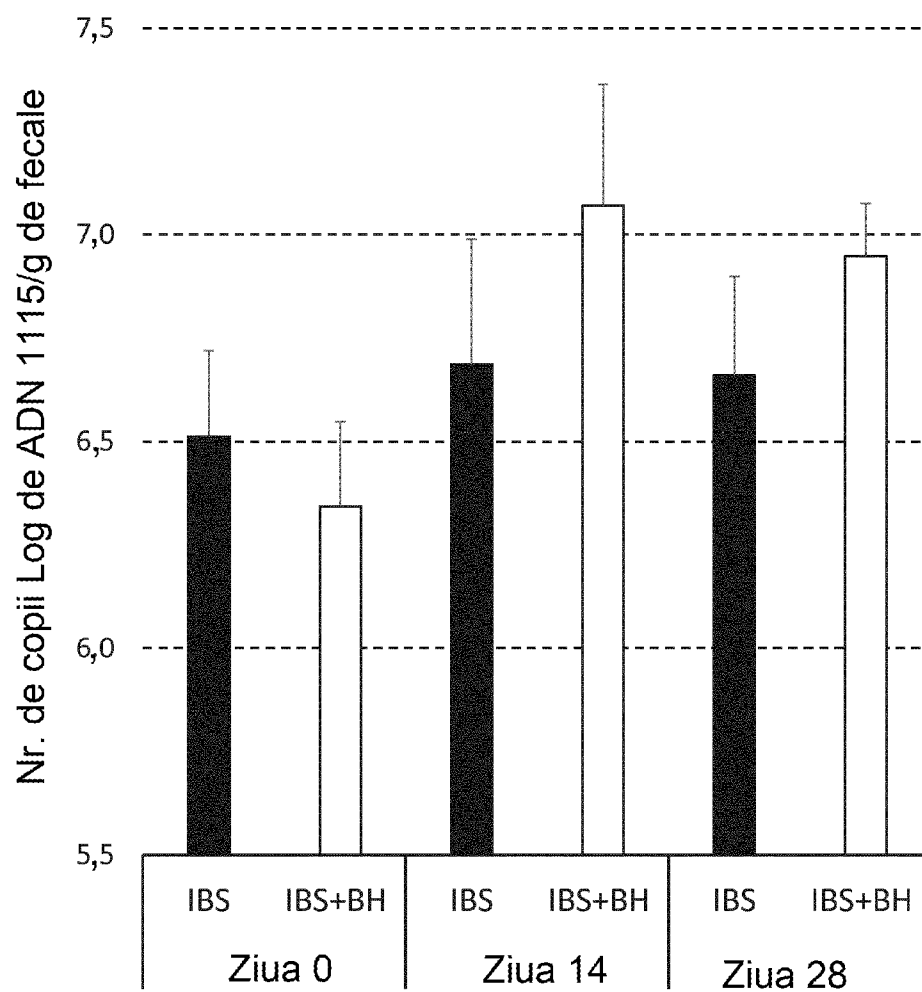


FIG. 2

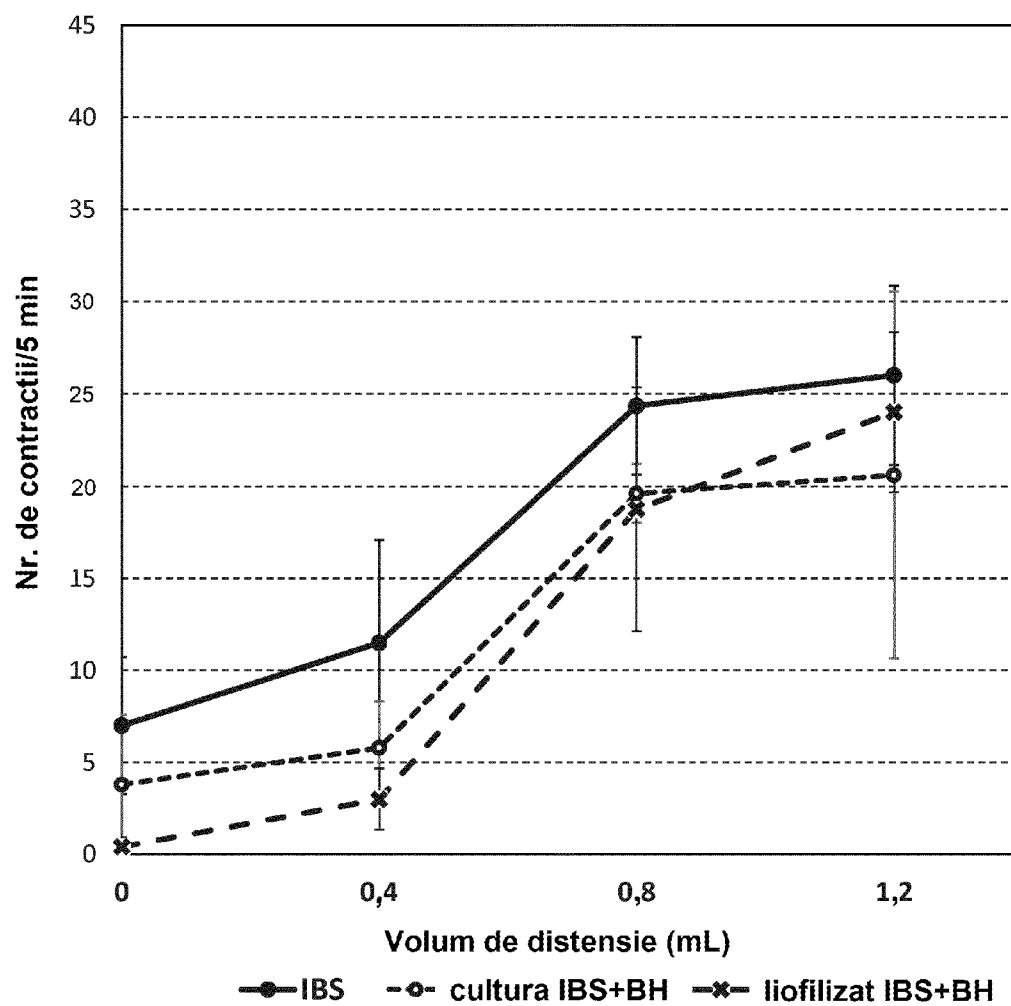


FIG. 3

Impactul culturii BH asupra microbiotei

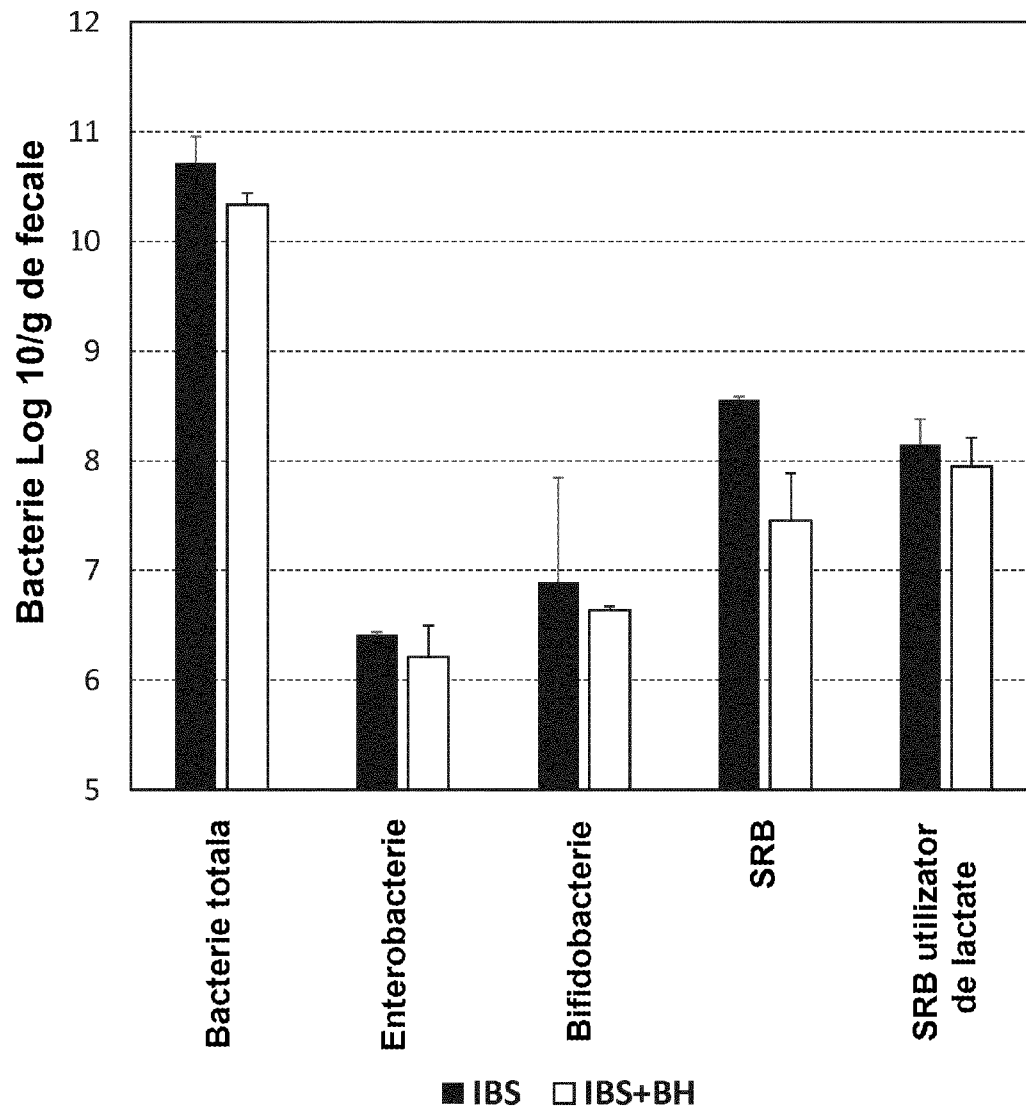


FIG. 4

Impactul liofilizatului BH asupra microbiotei

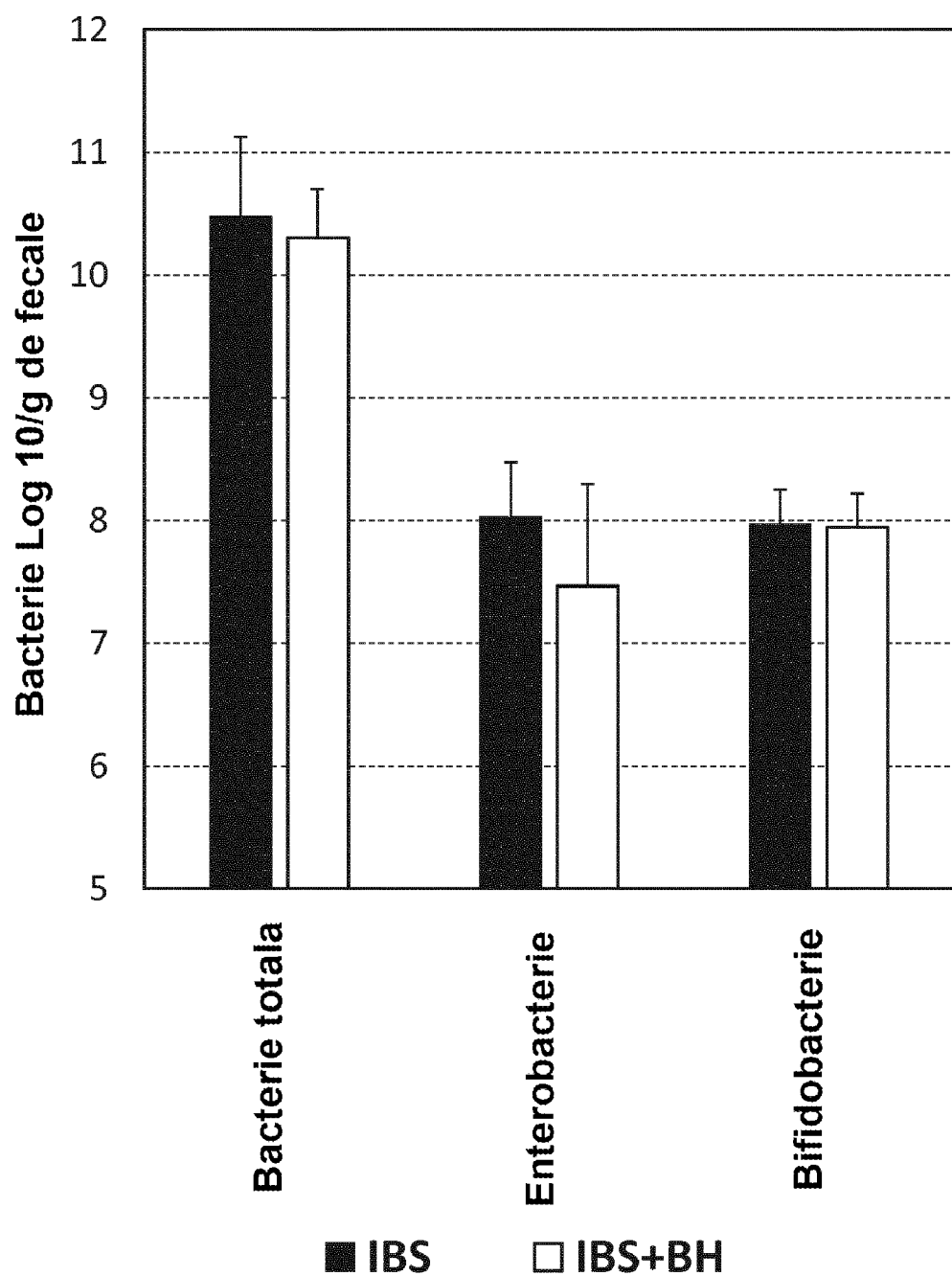


FIG. 5

Impactul BH asupra concentratiei de fermentare a
microbiotei cecale - acizi grasi cu catena scurta

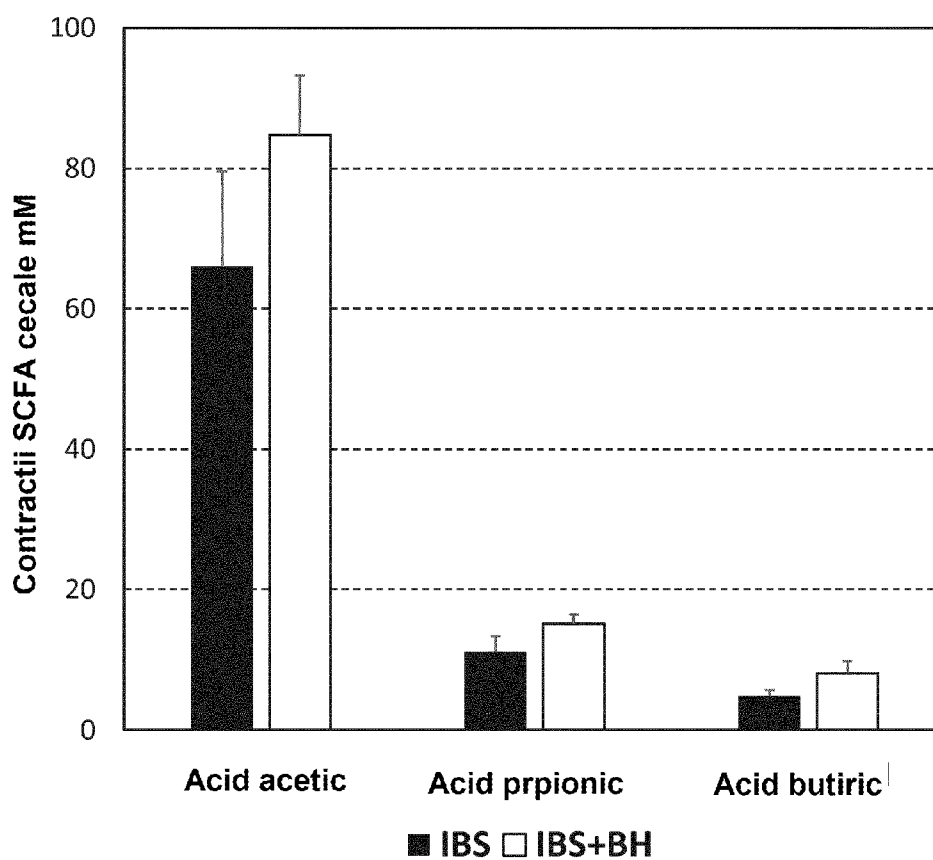


FIG. 6

**Impactul liofilizatului BH asupra fermentarii microbiotei
- sulfuri cecale**

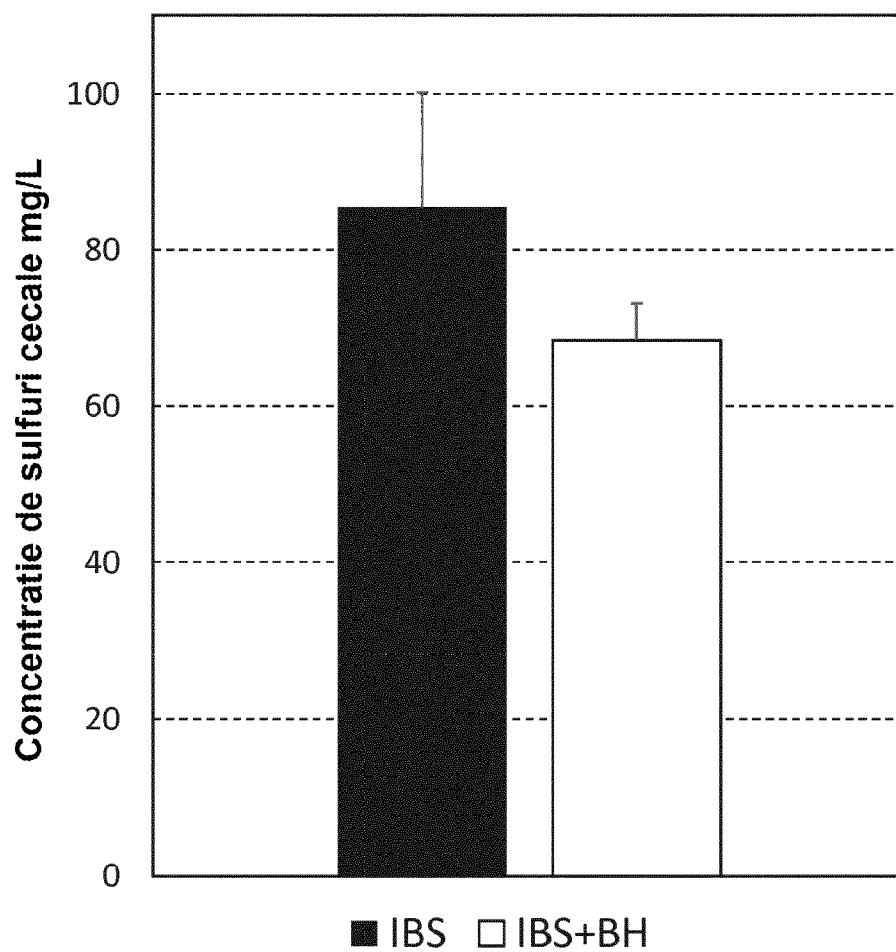


FIG. 7

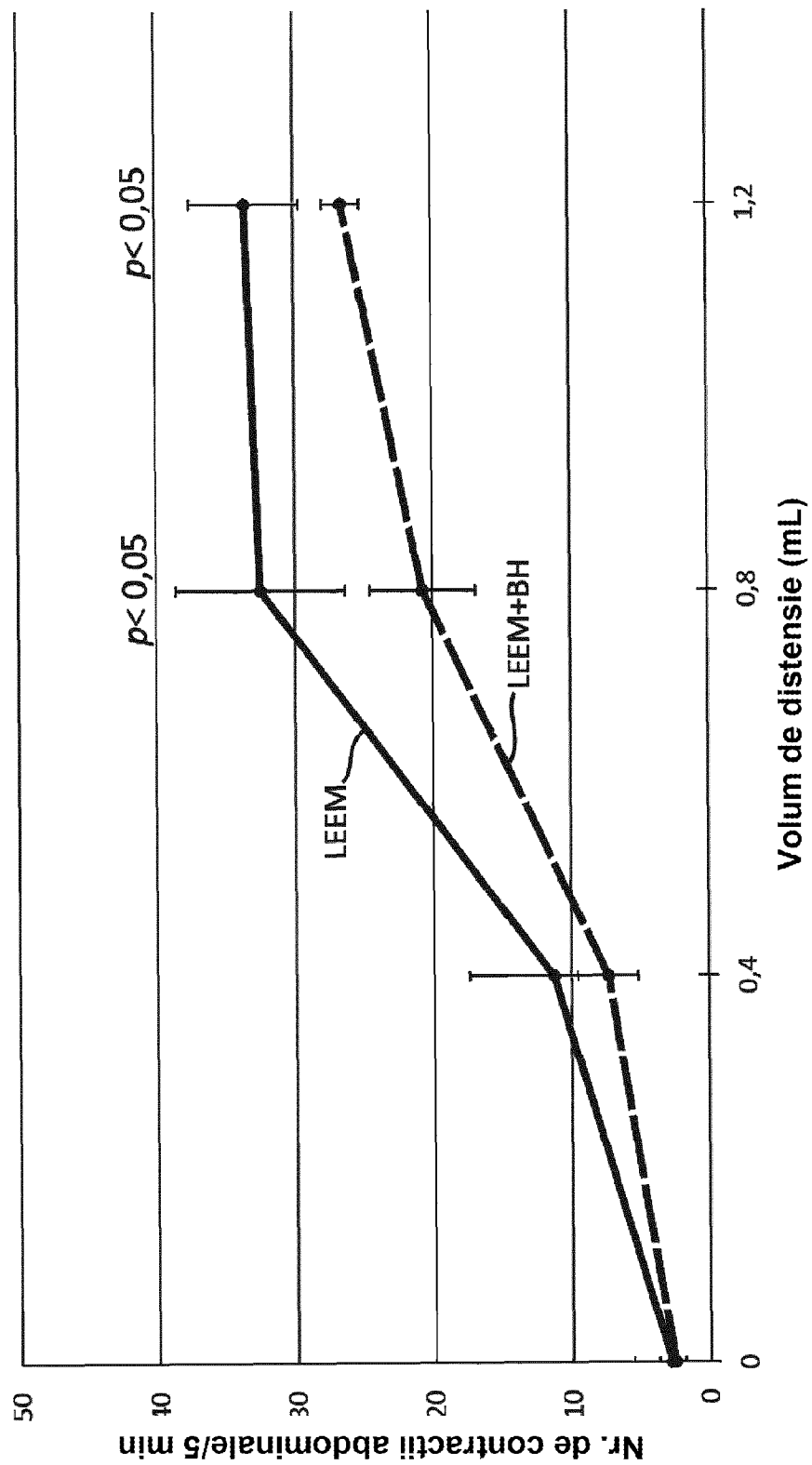


FIG. 8

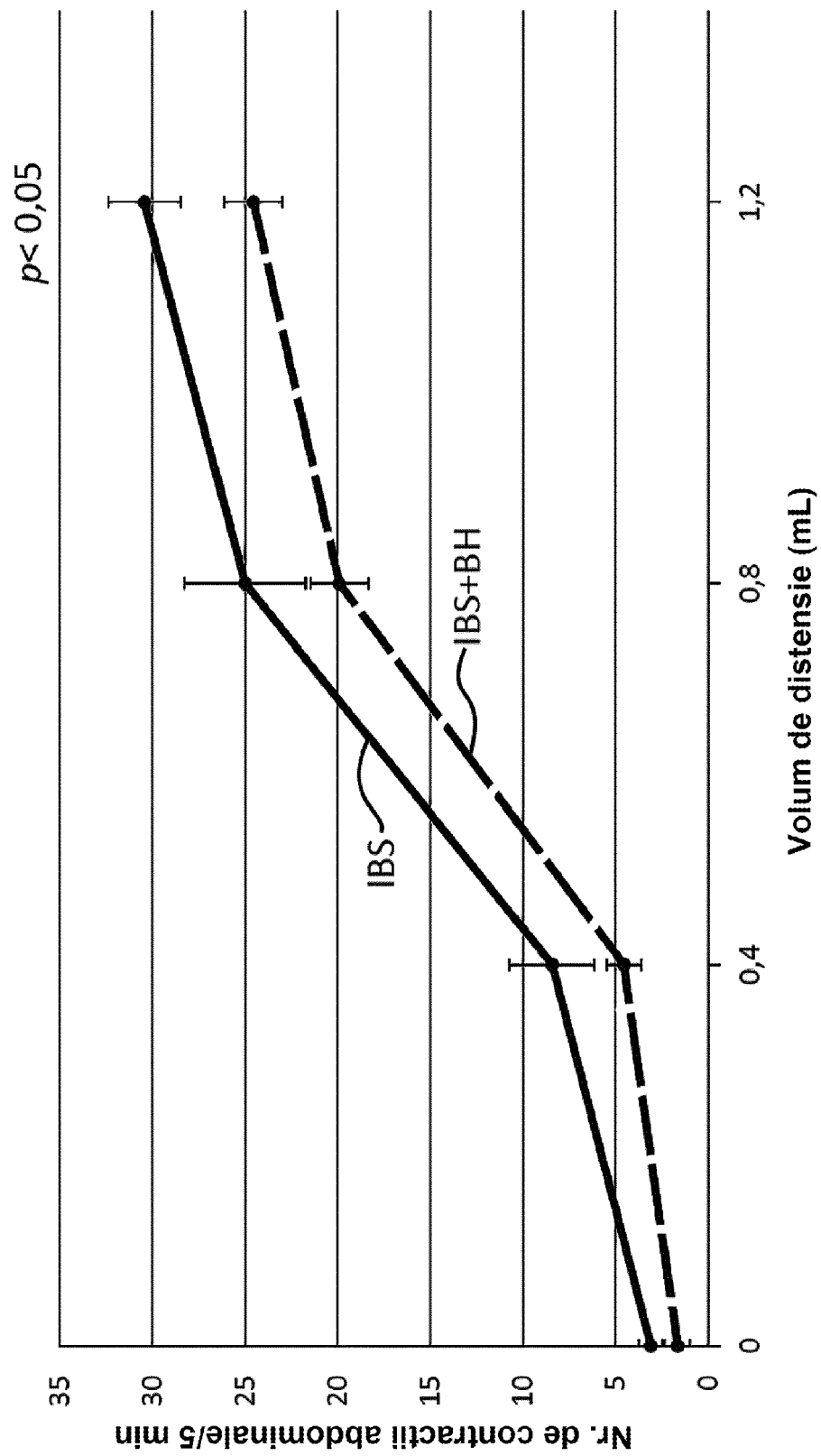


FIG. 9A

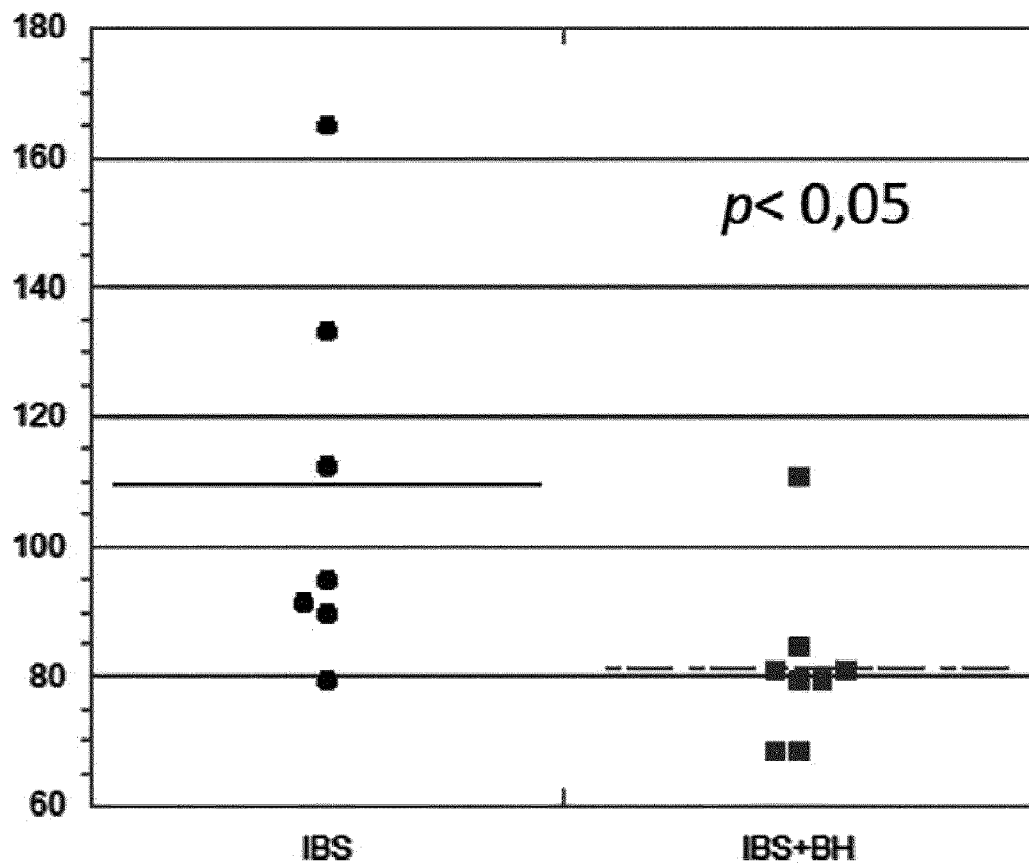


FIG. 9B

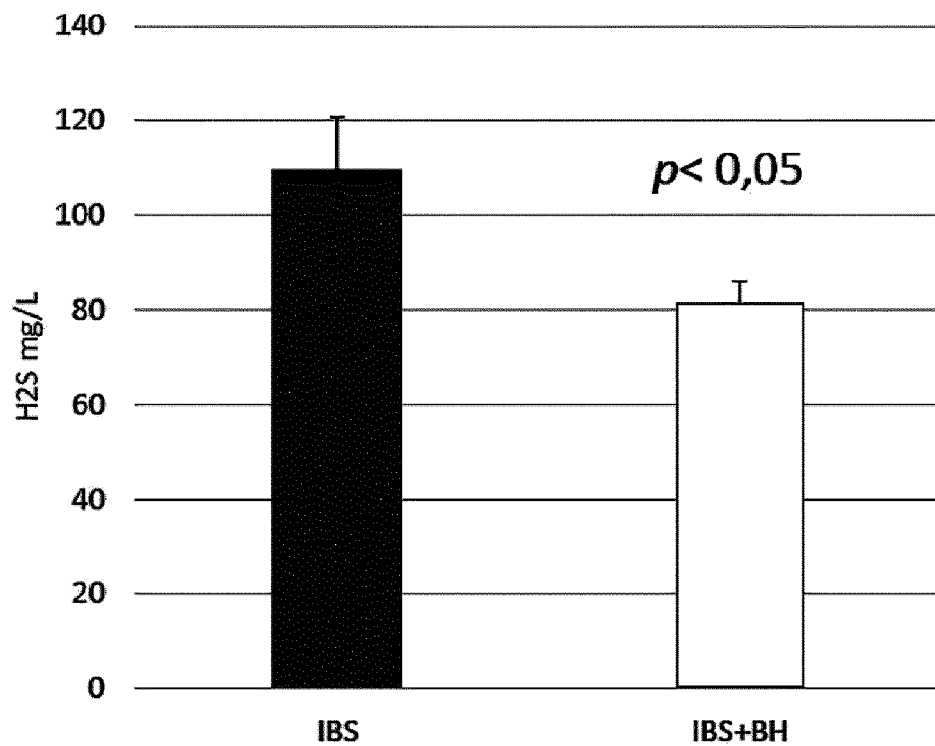


FIG. 10A

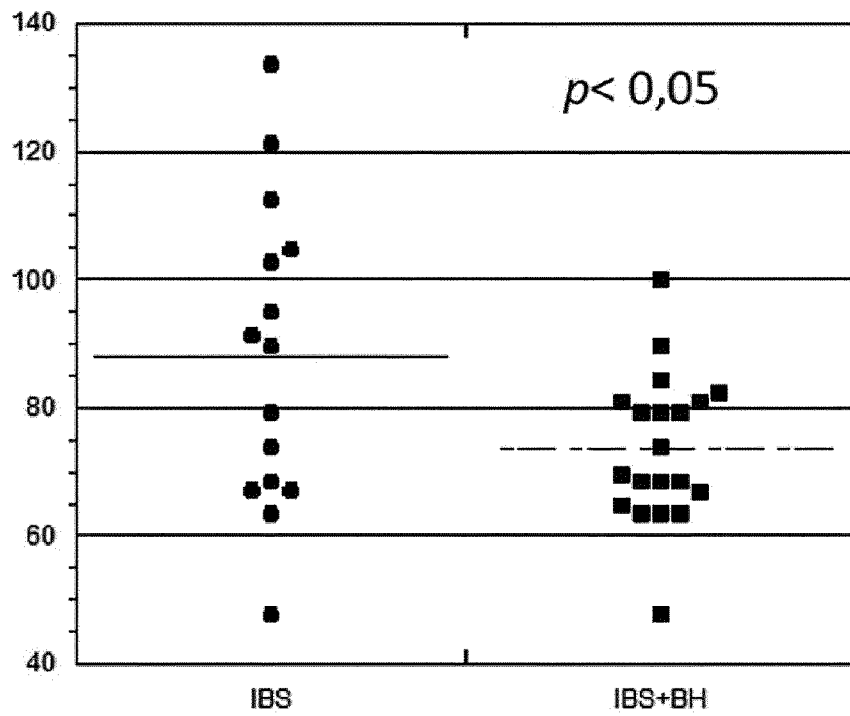


FIG. 10B

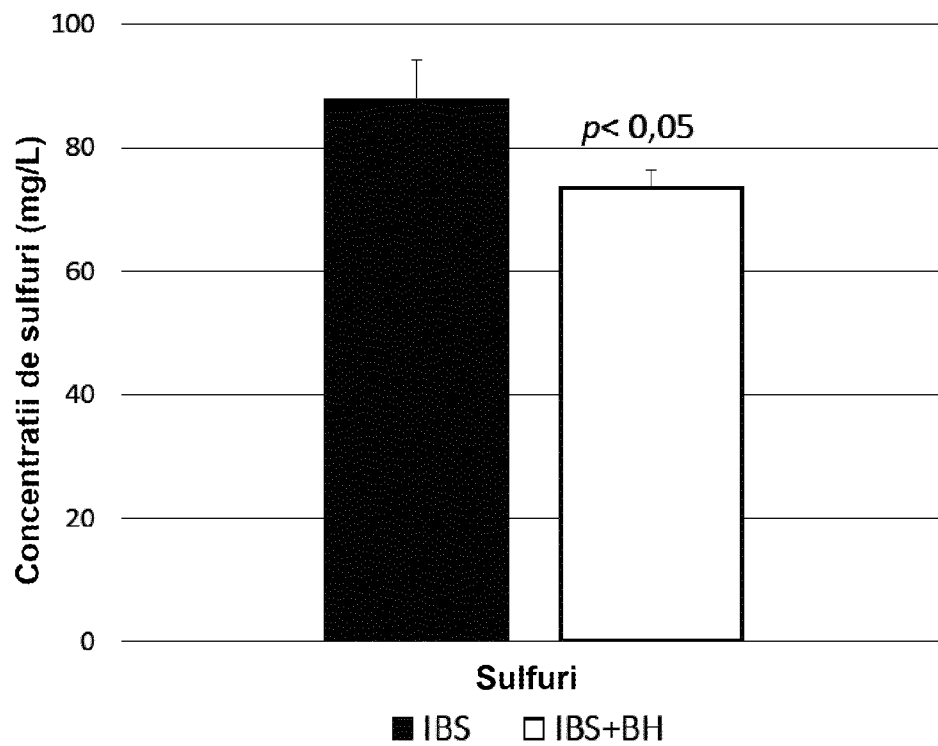
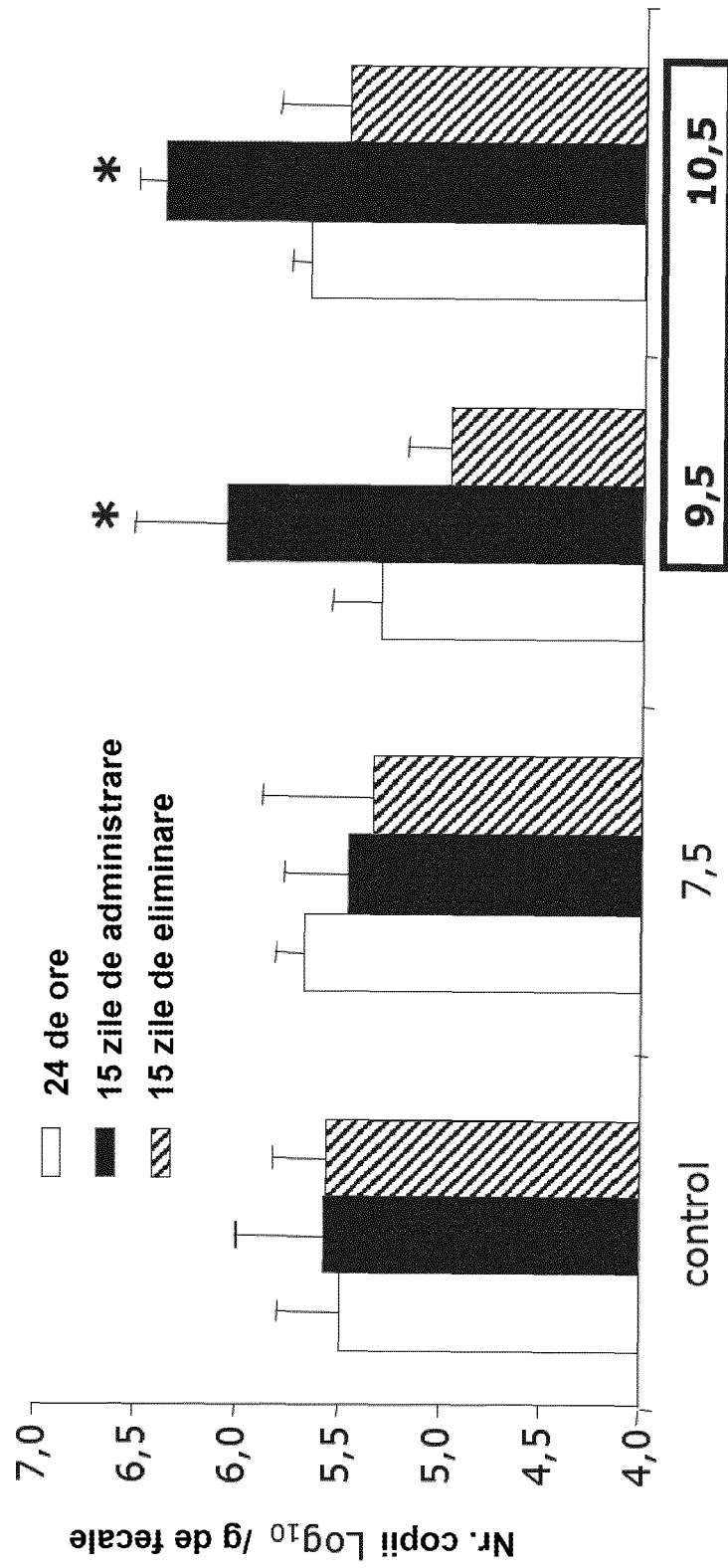


FIG. 11



B. hydrogenotrophica administrata ($\log_{10}$ pe ml)

FIG. 12

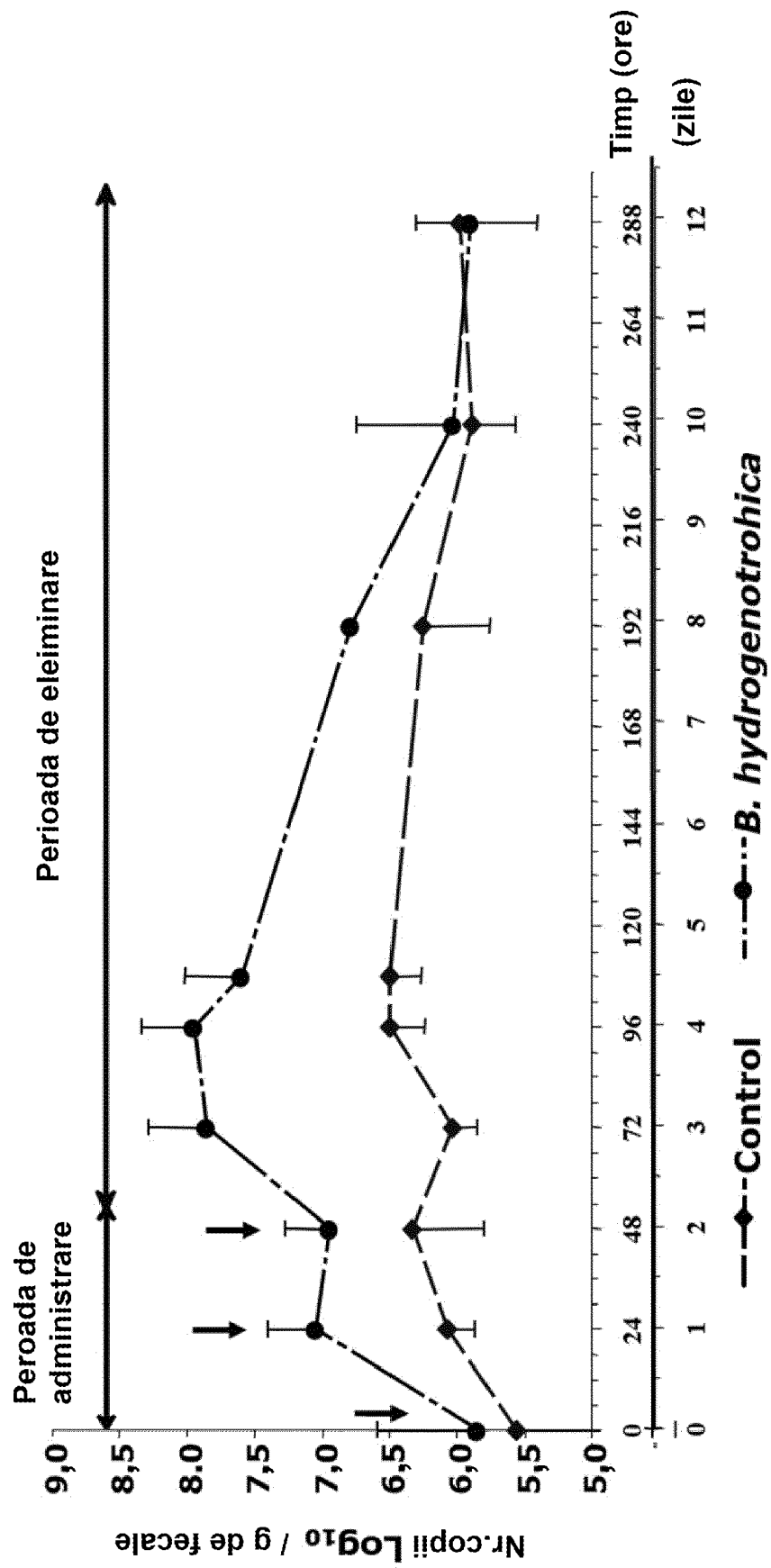


FIG. 13

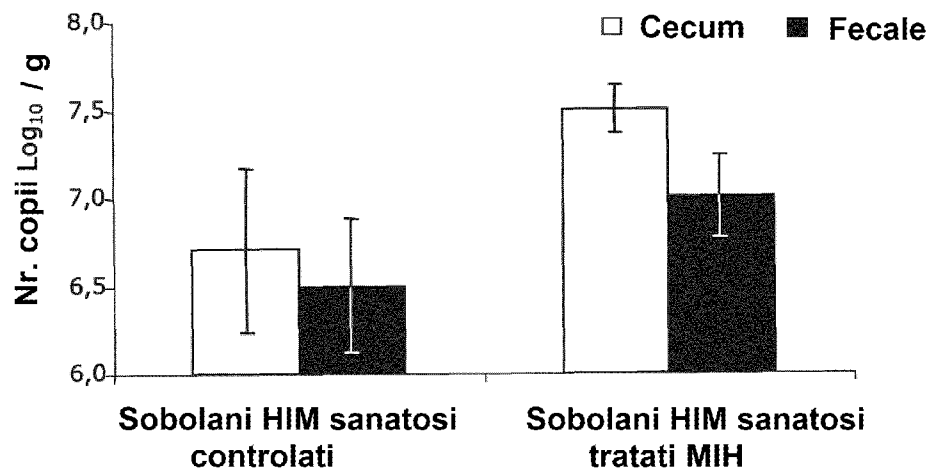


FIG. 14

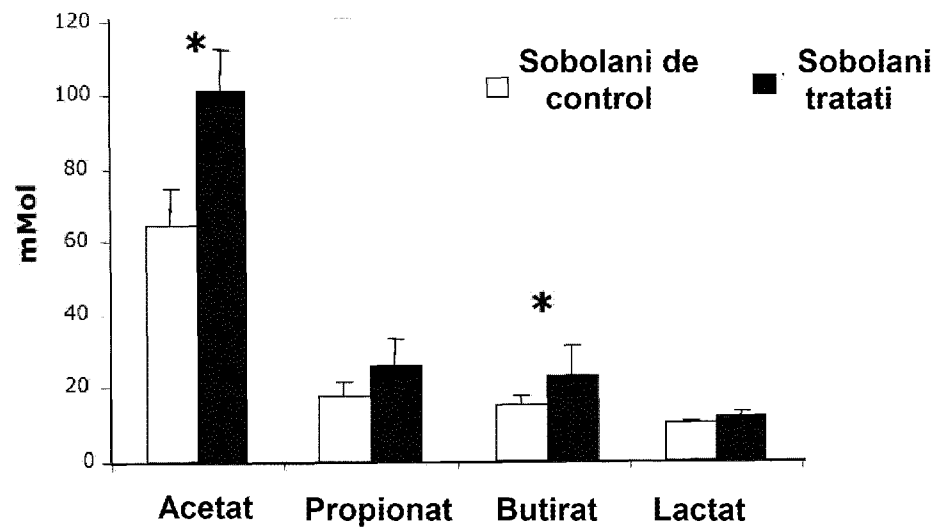


FIG. 15

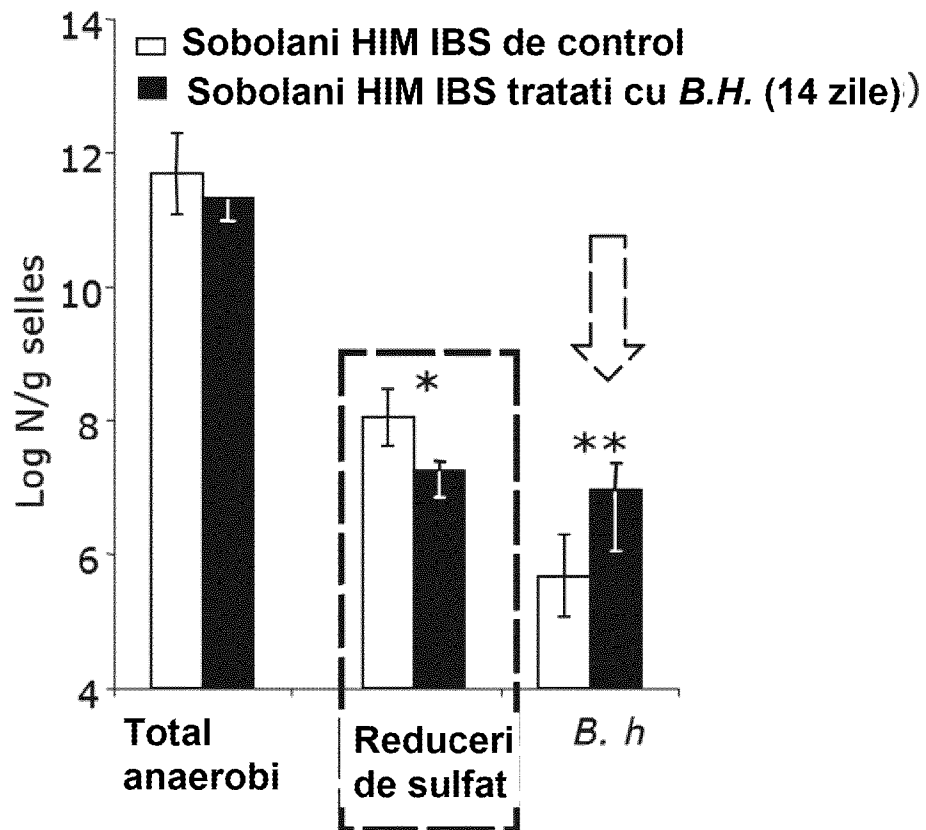


FIG. 16

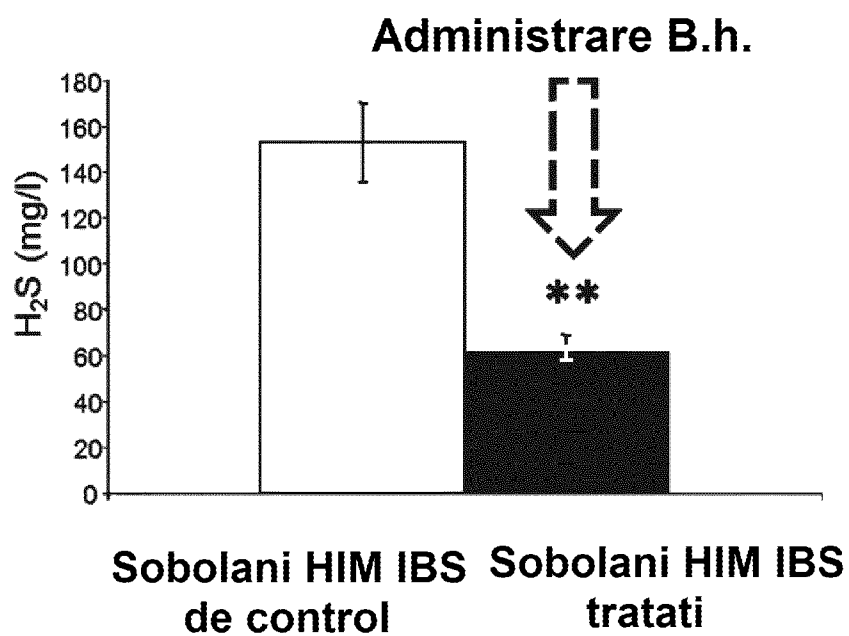


FIG. 17

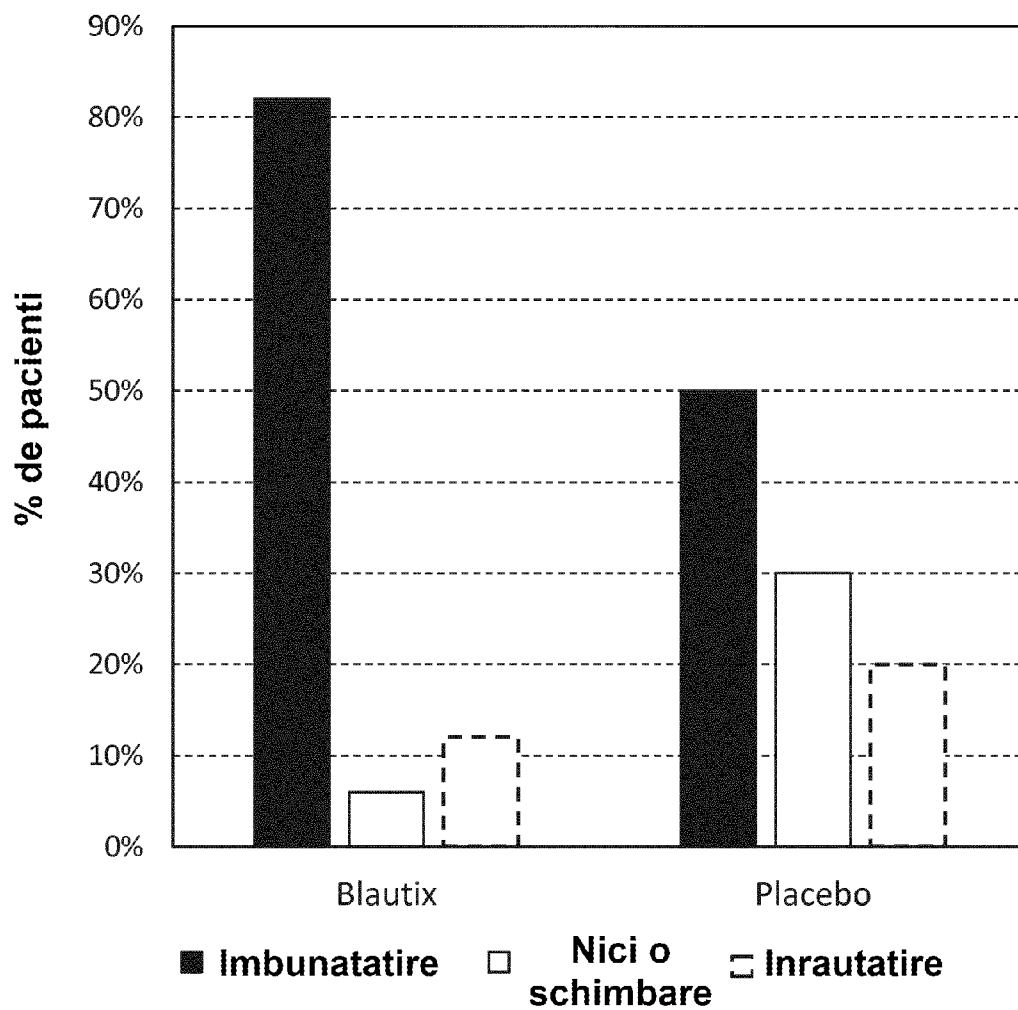


FIG. 18

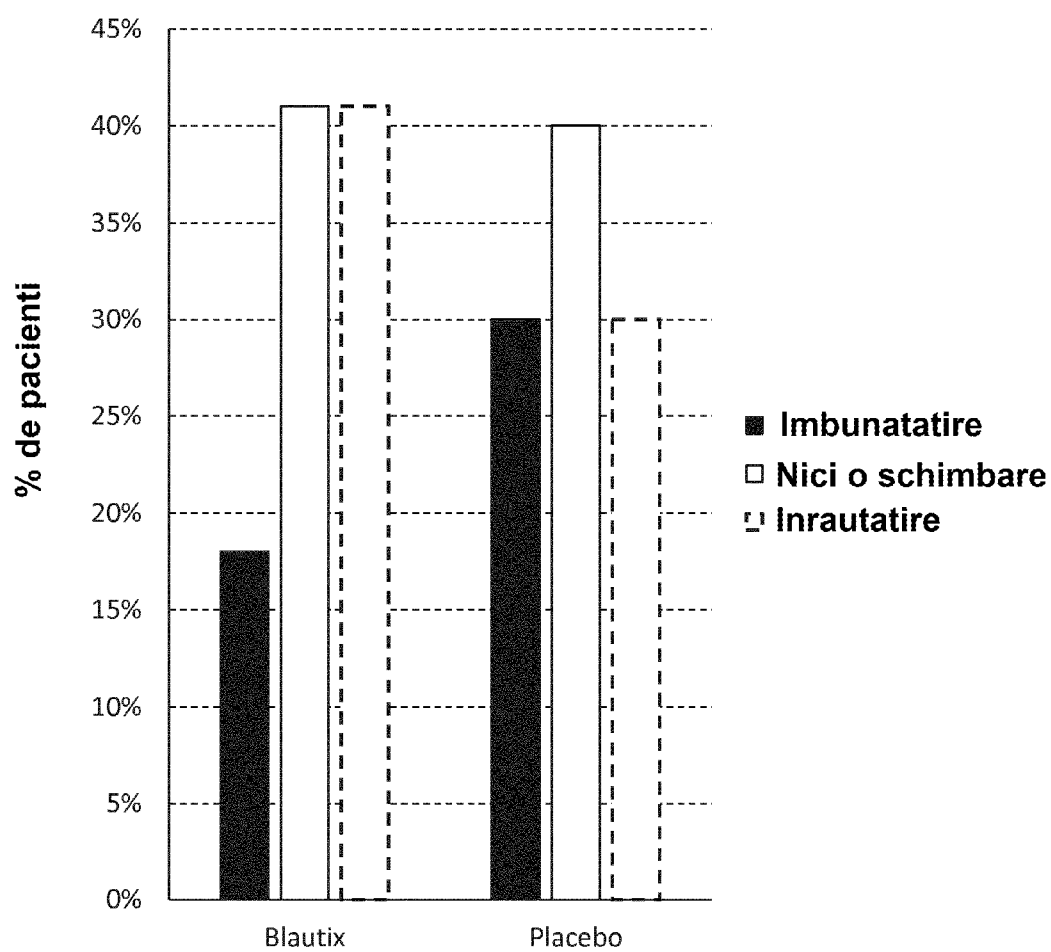


FIG. 19

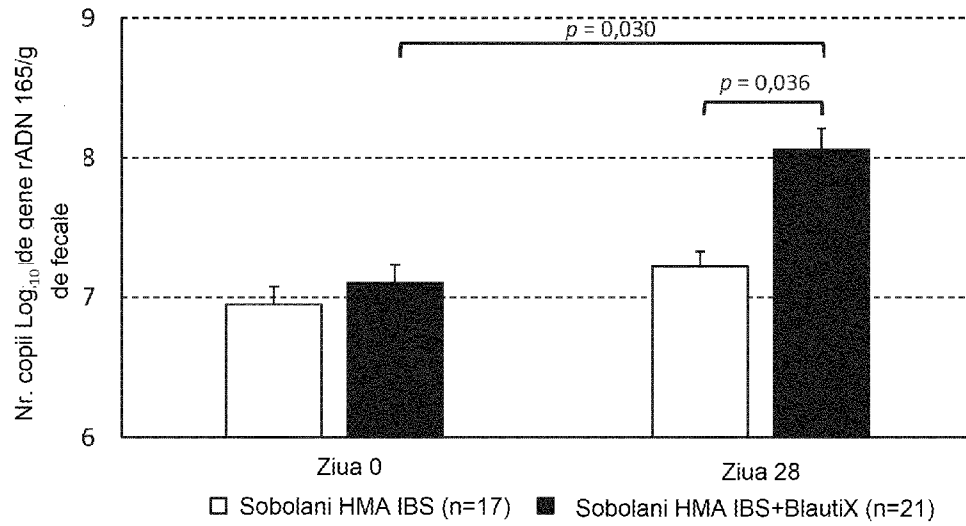


FIG. 20

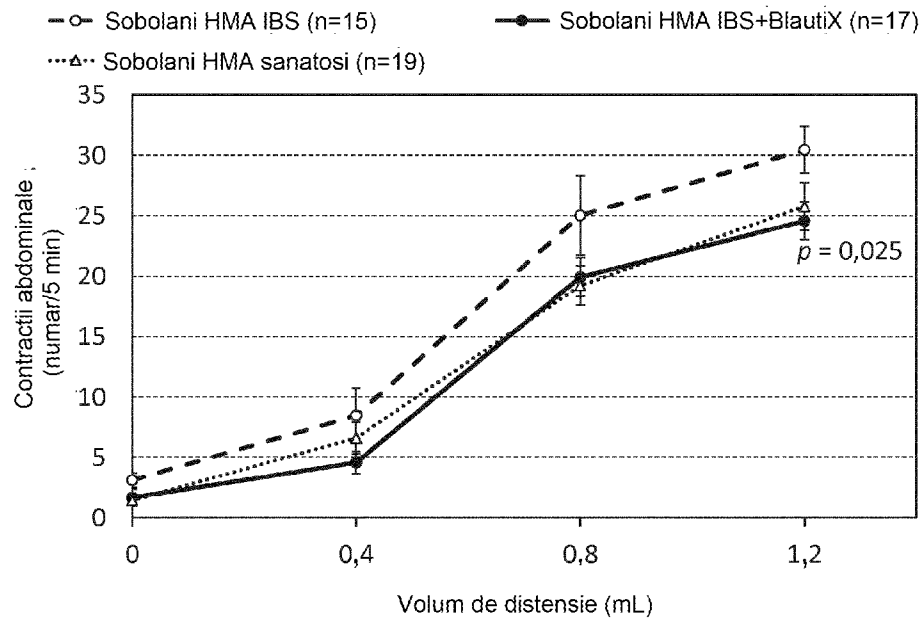


FIG. 21

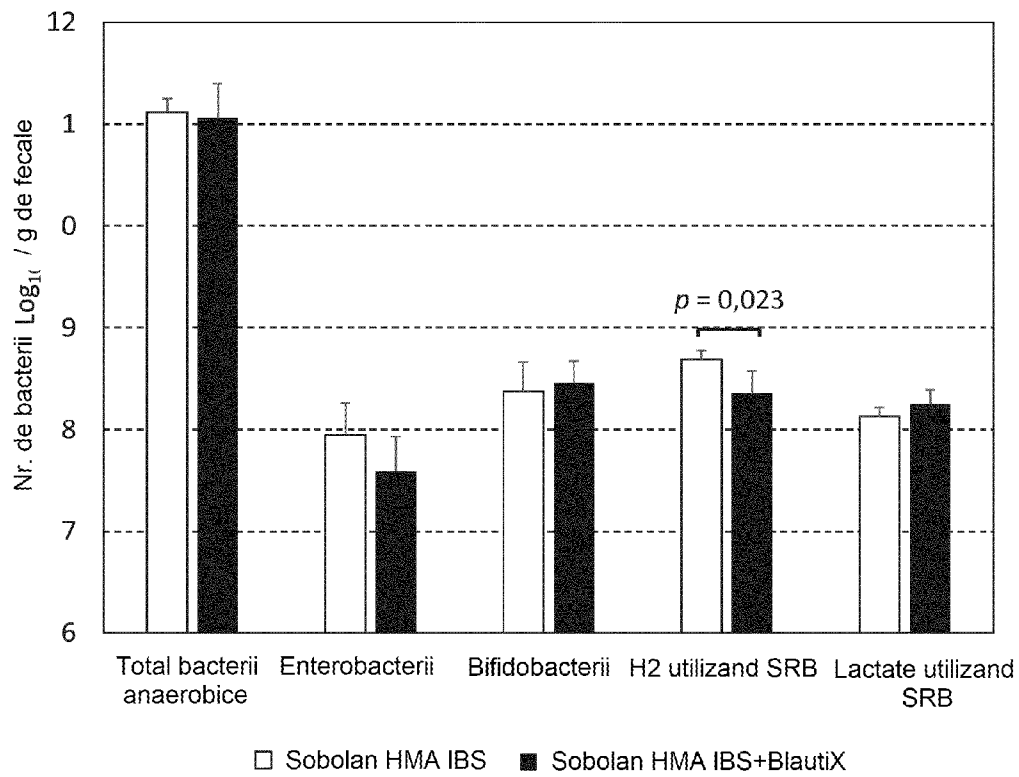


FIG. 22

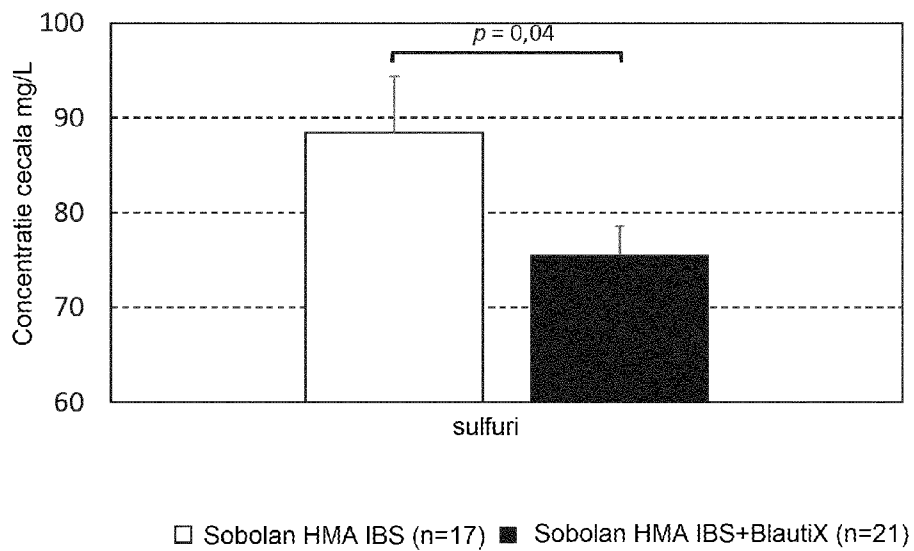


FIG. 23A

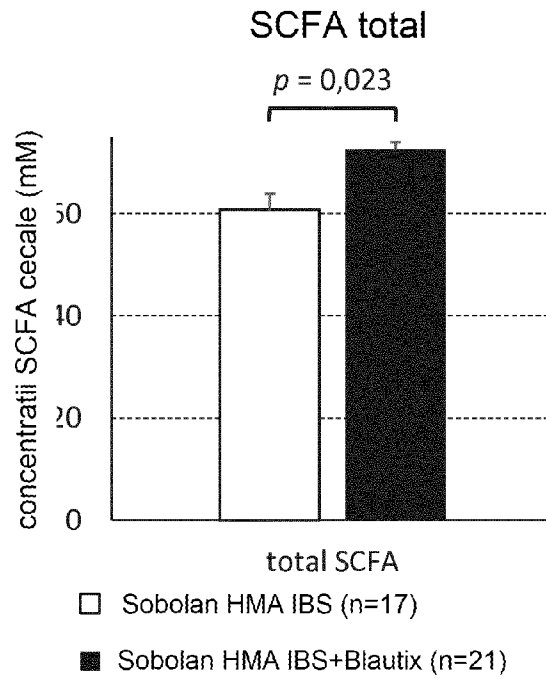


FIG. 23B

