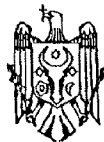




MD/EP 3313422 T2 2019.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3313422 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 35/74** (2015.01.01)
A61K 9/00 (2006.01.01)
A61K 9/19 (2006.01.01)
A61K 9/48 (2006.01.01)
A23L 33/135 (2016.01.01)
A61P 1/10 (2006.01.01)
A61P 1/12 (2006.01.01)
A61P 31/04 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0471 (22) Data de depozit: 2017.07.13 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17742524.6, 2017.07.13 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3313422, 2019.03.06 (31) Numărul cererii prioritare: 201612190; 201616016; 201616018; 201703552; 201703548 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.07.13; 2016.09.20; 2016.09.20; 2017.03.06; 2017.03.06 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 06/2019, 2019.06.30 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 10/2019, 2019.03.06 (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	

MD/EP 3313422 T2 2019.06.30

(54) Compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană de *Blautia hydrogenotrophica* pentru utilizare în tratamentul sau prevenirea diareei sau constipației

(57) Rezumat:

1
Invenția furnizează compoziții care cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene pentru tratarea sau prevenirea diareei și/sau constipației.

2
Secvențe: 5
Revendicări: 15
Figuri: 6

(54) Compositions comprising a bacterial strain of *Blautia hydrogenotrophica* for use in the treatment or prevention of diarrhea or constipation

(57) Abstract:

1
The invention provides compositions comprising one or more bacterial strains for treating preventing diarrhea and/or constipation.

2
Sequences: 5
Claims: 15
Fig.: 6

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

5

Această invenție este în domeniul compozițiilor care cuprind o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica* având o secvență rARN 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a diareei și/sau constipației.

10 **FUNDALUL INVENȚIEI**

Se crede că intestinul uman este steril în uter, dar este expus la o mare varietate de microbi materni și din mediu imediat după naștere. Ulterior, are loc o perioadă dinamică de colonizare microbiană și succesiune, care este influențată de factori cum ar fi modul de administrare, mediu, dietă și genotipul gazdei, toate acestea având impact asupra compoziției microbiotei intestinale, în special în timpul vieții timpurii. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine precum a adultului [1]. Microbiota intestinală umană conține mai mult de 1500 de filotipuri diferite dominate în niveluri de abundență de către două diviziuni (*încrengături*) bacteriene majore, Bacteroidetes și Firmicutes [2-3]. Relațiile simbiotice de succes care se ivesc din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat o varietate largă de funcții benefice metabolice, structurale, protectoare și altele. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură o degradare a componentelor dietetice altfel indigerabile cu eliberarea produselor secundare care asigură o sursă importantă de nutrienți pentru gazdă și alte beneficii pentru sănătate. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine-recunoscută și este exemplificată la animalele fără germeni ce au un sistem imunitar alterat care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriilor comensale [4-6].

Modificări dramatice în compoziția microbiotei au fost documentate în tulburări gastrointestinale cum ar fi boala inflamatorie intestinală (IBD). De exemplu, nivelurile bacteriilor *Clostridium* cluster XIVa și *Clostridium* cluster XI (*F. prausnitzii*) sunt reduse la pacienții cu IBD în timp ce numărul de *E. coli* este crescut, sugerând o schimbare în echilibrul dintre simbiozii și patobionții din intestin [7-11].

Ca recunoaștere a potențialului efect pozitiv pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animal, diferite tulpini au fost propuse pentru utilizare ca tratament în diferite boli (vezi, de exemplu, [12-15]). Un număr de tulpini, incluzând mai ales tulpinile de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor tulburări intestinale (vezi [16] pentru o recenzie). Tulpini din genul *Blautia* au fost propuse de asemenea pentru utilizare în modularea echilibrului microbian al ecosistemului digestiv de la pacienții cu IBS (WO 01/85187). Totuși, relația între diferite tulpini bacteriene și diferite boli, și efectele precise ale particulelor tulpini bacteriene asupra intestinului și la un nivel sistemic și asupra oricăror tipuri particulare de boli, sunt slab caracterizate.

Există o cerință pentru potențialele efecte ale bacteriilor intestinale de a fi caracterizate astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii utilizând bacterii intestinale.

US 2010/0247489 descrie utilizarea nutrienților minerali pentru a trata tulburările digestive. US'789 propune opțional utilizarea de asemenea a numeroaselor genuri diferite de bacterii pentru a preveni o largă varietate de simptome abdominale dar nu leagă nici o bacterie cu nici o boală sau simptom.

WO 2016/086206 sugerează că bacteriile din ordinul Clostridiales pot fi utilizate pentru a trata sau preveni diferite afecțiuni dar nu leagă nici o bacterie cu nici o boală sau simptom.

WO 2012/142605 propune că poate fi posibil să se trateze un număr de diferite boli cu o combinație de microorganisme. WO'605 sugerează un număr mare de posibile specii bacteriene care ar putea fi utilizate, dar nu există indicații în WO'605 despre cum ar putea fi utilizată oricare dintre speciile bacteriene propuse pentru a trata oricare dintre bolile propuse.

WO 02/07741 sugerează utilizarea a diferite bacterii din clasa *Clostridia* pentru a trata tulburări gastro-intestinale dar nu leagă nici o bacterie cu nici o boală sau simptom. WO 2016/086209 sugerează utilizarea unui număr mare de posibile bacterii din ordinul Clostridiales pentru a scădea secreția de citokine pro-inflamatorii și/sau creșterea secreției de citokine anti-inflamatorii, dar nu există indicații despre cum ar putea fi utilizată oricare dintre speciile bacteriene propuse pentru a trata oricare dintre bolile propuse.

60

REZUMATUL INVENȚIEI

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea diareei și constipației. În particular, inventatorii au identificat faptul că tulpinile bacteriene din genul *Blautia* pot fi eficiente pentru reducerea diareei și constipației. După cum s-a descris în exemple, administrarea orală de compoziții cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* poate reduce diareea și constipația la pacienți care au sindrom de colon iritabil (IBS). Prin urmare, într-o primă realizare, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica* având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de tratare și prevenire a diareei și constipației.

În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica* având o secvență rARN 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a diareei și/sau constipației la un subiect diagnosticat cu boală Crohn, colită ulcerativă, sau, mai preferabil, IBS. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu IBS are IBS atât cu diaree cât și constipație. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu IBS are IBS cu diaree dar fără constipație sau numai cu puțină constipație. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu IBS are IBS cu constipație dar fără diaree sau numai cu diaree puțină.

Tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia hydrogenotrophica* așa cum s-a definit în revendicări. Tulpini strâns înrudite pot fi de asemenea utilizate, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*. Preferabil, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5. Cel mai preferabil, tulpina bacteriană din compoziție este tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

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

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

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 livrarea de bacterii, și se arată că furnizează compoziții eficiente în exemple.

În anumite realizări, invenția furnizează un produs alimentar cuprinzând compoziția cum s-a descris mai sus.

În realizări preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica* având o secvență rARN 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli asociate cu infecție cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecție cu *E. coli*. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale.

În alte realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, preferabil a nivelului de *E. coli*, în tratamentul sau prevenirea IBS, bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale.

În realizări în special preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a diareei asociate cu infecție cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecție cu *E. coli*, sau sunt pentru utilizare în reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, preferabil a nivelului de *E. coli*, în tratamentul sau prevenirea diareei.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Modificări în simptomele pacientului în timpul perioadei de dozare (zilele 1-16) din studiul clinic de Fază 1.

Figura 2: Modificări în simptomele pacientului în timpul perioadei de eliminare din studiul clinic de Fază 1.

Figura 3: Rezultate ale Cmax din testul respirației pentru hidrogen pentru ziua 1, ziua 2, ziua 15 și ziua 16 pentru pacienții cu IBS tratați cu Blautix (**Figura 3a**) și pacienții cu IBS tratați cu placebo (**Figura 3b**). **Figura 3c** este un grafic care compară procentajul pacienților tratați cu Blautix cu o reducere a hidrogenului între media zilelor 15 și 16 și media zilelor 1 și 2 la procentajul pacienților tratați cu placebo cu o reducere a hidrogenului între aceste puncte în timp.

Figura 4a: Datele pereche ale testului respirației pentru hidrogen necorectate și pentru hidrogen corectate pentru ziua 1 și ziua 15 pentru pacienții cu IBS tratați cu Blautix; **Figura 4b:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen necorectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul de tratament cu Blautix; **Figura 4c:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen corectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul de tratament cu Blautix.

Figura 5a: Datele pereche ale testului respirației pentru hidrogen necorectate și pentru hidrogen corectate pentru ziua 1 și ziua 15 pentru pacienții cu IBS tratați cu placebo; **Figura 5b:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen necorectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul cu placebo; **Figura 5c:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen corectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul cu placebo.

Figura 6: Grafice care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen medii din ziua 1 și ziua 15 pentru grupul de tratament cu Blautix (Verum) și grupul cu placebo (**Figura 6a:** hidrogen necorectat; **Figura 6b:** hidrogen corectat).

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpinile bacteriene

Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica* având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5. Exemplele demonstrează că bacteriile din genul *Blautia* sunt utile pentru tratarea diareei și constipației.

Exemplele de tulpini *Blautia* includ *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. glucerasea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* și *B. wexlerae*. Speciile *Blautia* sunt bacterii pozitive la reacția Gram, ne-motile care pot fi fie cocoide, fie ovale și toate sunt obligat anaerobe 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 cu septicemie.

Blautia hydrogenotrophica (cunoscută anterior ca *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) a fost izolată din intestinalele mamiferelor, este strict anaerobă, și metabolizează H₂/CO₂ până la acetat, care poate fi important pentru nutriția omului și sănătate. Tulpina tip de *Blautia hydrogenotrophica* este S5a33 = DSM 10507 = JCM 14656. Numărul de acces al GenBank pentru secvența genei ARNr 16s a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 este X95624.1 (divulgată în acest document ca SEQ ID NO:5). Această tulpină exemplară de *Blautia hydrogenotrophica* este descrisă în [17] și [18]. Tulpina S5a33 și tulpina S5a36 corespund la două subclone ale unei tulpini izolate dintr-o mostră de fecale a unui subiect sănătos. Ele prezintă morfologie, fiziologie și metabolism identice și au secvențe identice de ARNr 16s. Astfel, în unele realizări, *Blautia hydrogenotrophica* pentru utilizare în invenție are secvența de ARNr 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 menționată în acest document ca tulpină BH. Tulpina BH a fost depozitată cu Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [Colecția germană de microorganisme] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germania) la 26 ianuarie 1996 ca „*Ruminococcus hydrogenotrophicus*” sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294 ca „S5a33” pe 14 mai 2001. Deponentul a fost INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, Franța. Proprietatea depozitelor a trecut la 4D Pharma Plc prin cesionare.

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

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 sunt de asemenea așteptate să fie eficiente pentru tratarea și prevenirea diareei

și constipației. Un biotip este o tulpină strâns înrudită care are aceleași caracteristici fiziologice și biochimice sau foarte similare.

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 nucleotide 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 cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență pe cel puțin 80% din întregul său genom (de exemplu pe cel puțin 85%, 90%, 95% sau 99%, sau asupra întregului genom). De exemplu, în unele realizări, o tulpină biotip are cel puțin 98% identitate de secvență pe cel puțin 98% din genomul său sau cel puțin 99% identitate de secvență pe 99% din genomul său. Alte secvențe adecvate pentru utilizare în identificarea tulpinilor biotip pot include hsp60 sau secvențe repetitive cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)₅, sau REP sau [20]. Tulpinile biotip pot avea secvențe cu cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/1429, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486. În unele realizări, o tulpină biotip are o secvență cu cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată ca DSM 10507/14294 și cuprinde o secvență de ARNr 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 cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată ca DSM 10507/14294 și are secvența de ARNr 16s din SEQ ID NO:5.

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 depozitului cu numărul de acces DSM 10507/14294 și analiza fragmentului de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismului lungimii fragmentelor amplificate fluorescente (FAFLP) și amprentarea prin PCR cu element de ADN repetitiv (rep), sau profilarea proteinelor, sau secvențierea parțială a ADN-ului de 16S sau 23s. În realizările 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 furnizează același tipar cu o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 când s-a analizat prin analiza de restricție a ADN-ului ribozomal amplificat (ARDRA), de exemplu când se utilizează enzima de restricție Sau3AI (pentru metode exemplare și îndrumare vezi, de exemplu, [21]). Alternativ, tulpinile biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași tipare de fermentare a carbohidraților precum o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

Alte tulpini de *Blautia* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, așa cum s-au definit în revendicări, cum ar fi biotipurile unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294, pot fi identificate utilizând orice metodă sau strategie adecvată, incluzând testele descrise în exemple. De exemplu, tulpinile pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin cultivarea bacteriilor și administrarea la șobolani pentru testare în testul de distensie. În particular, tulpinile bacteriene care au tipare de creștere, tip metabolic și/sau antigeni de suprafață similare cu o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea o activitate modulatorie a microbiotei comparabilă cu tulpina DSM 10507/14294. În particular, o tulpină biotip va declanșa efecte comparabile asupra diareei și/sau constipației cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în Exemple.

O tulpină preferată în mod special a invenției este tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294. Aceasta este tulpina de BH exemplară testată în exemple și dovedită a fi eficientă pentru tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, din tulpina *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294, sau o derivată a acesteia, pentru utilizare în terapie, în particular pentru bolile descrise în acest document.

O derivată a tulpinii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din cea originală. O derivată a unei tulpini a invenției poate fi modificată, de exemplu la nivel genetic, fără a elimina activitatea biologică.

În particular, o tulpină derivată a invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea activitate modulatorie a microbiotei comparabilă cu tulpina DSM 10507/14294 originală. În particular, o tulpină derivată va declanșa efecte comparabile asupra diareei și constipației cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și

administrare descrise în Exemple. O derivată a tulpinii DSM 10507/14294 va fi în general un biotip al tulpinii DSM 10507/14294.

- Referirile la celulele din tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică precum tulpinile depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294, și astfel de celule sunt cuprinse de invenție.

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

10 Utilizări terapeutice

- În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea diareei și/sau constipației. În unele realizări compoziția este pentru utilizare în tratarea unui pacient care are atât diaree cât și constipație. În unele realizări compoziția este pentru utilizare în tratarea unui pacient care are diaree fără constipație. În unele realizări compoziția este pentru utilizare în tratarea unui pacient care are constipație fără diaree. Deși pacienții adesea prezintă fie diaree, fie constipație, un singur pacient poate prezenta ambele condiții la diferite momente. Pacienții cu IBS și/sau boli inflamatorii ale intestinului adesea prezintă diaree și/sau constipație. Corespunzător, invenția furnizează compoziția invenției pentru utilizare în tratarea unui pacient diagnosticat cu sau suspectat că are IBS sau o boală inflamatorie a intestinului. De exemplu, pacienții cu IBS pot avea cicluri alternative de diaree și constipație sau un pacient cu IBS poate fi caracterizat ca un pacient cu IBS cu diaree sau un pacient cu IBS cu constipație. În unele realizări, o compoziție a invenției poate fi utilizată pentru a trata un pacient având IBS, un pacient având IBS cu diaree sau un pacient având IBS cu constipație. De exemplu, în unele realizări, subiectul diagnosticat cu IBS are IBS atât cu diaree cât și cu constipație. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu IBS are IBS cu diaree dar fără constipație sau numai cu puțină constipație. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu IBS are IBS cu constipație dar fără diaree sau numai cu puțină diaree. În unele realizări, boala inflamatorie este la intestin subțire, colon sau rect. Diareea este un simptom al bolii Crohn și colitei ulcerative. Corespunzător, o compoziție a invenției poate fi utilizată pentru a trata un pacient care are boală Crohn sau colită ulcerativă.

După cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene ale invenției pot fi eficiente pentru reducerea diareei și/sau constipației.

- În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei și/sau constipației asociate cu boală Crohn, colită ulcerativă sau, mai preferabil, IBS. În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei și/sau constipației la un subiect diagnosticat cu boală Crohn, colită ulcerativă sau, mai preferabil, IBS. În realizări preferate compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei și/sau constipației în tratamentul bolii Crohn, colitei ulcerative sau, mai preferabil, IBS. În unele realizări, pacientul are durere abdominală și/sau balonare în plus față de diaree și/sau constipație. În astfel de realizări, pacientul poate avea orice combinație din două, trei sau toate patru dintre aceste condiții. De exemplu, pacientul poate avea diaree, constipație, durere abdominală și balonare; diaree, constipație și durere abdominală; diaree, constipație și balonare; diaree, durere abdominală și/sau balonare fără constipație; constipație, durere abdominală și/sau balonare fără diaree.

- În anumite realizări, compoziția poate fi în forma unei culturi bacteriene. În unele realizări, compoziția poate fi preferabil un liofilizat.

- În unele realizări, compoziția invenției este pentru utilizare în tratarea diareei și/sau constipației la un subiect având un nivel crescut de hidrogen în respirația sa față de un subiect sănătos. În unele realizări, compoziția invenției este pentru utilizare în reducerea nivelului de hidrogen în respirația unui subiect care are diaree și/sau constipație. Subiectul este preferabil un subiect diagnosticat ca având IBS și/sau o boală inflamatorie a intestinului. În unele realizări, boala inflamatorie este la intestin subțire, colon sau rect. În unele realizări, subiectul a fost diagnosticat cu boală Crohn, colită ulcerativă sau, mai preferabil, IBS, de exemplu unul dintre tipurile de IBS descrise aici. Fără a fi legat de teorie, se speculează că nivelul de hidrogen crescut apare din mecanismele care sunt la baza inflamației în intestin. Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție a invenției reduce nivelul de hidrogen detectat în teste de respirație pentru hidrogen. Corespunzător, nivelurile de hidrogen sunt preferabil evaluate utilizând un test de respirație pentru hidrogen. Testul de respirație pentru hidrogen este bine cunoscut în domeniu și astfel persoana calificată va cunoaște cum să efectueze astfel de test. În unele realizări, pacientului i se administrează lactuloză ca substrat pentru test.

Testul respirației pentru hidrogen este de asemenea o unealtă utilă pentru monitorizarea eficacității sau eficacității probabile a tratamentului sau prevenției utilizând o compoziție a unei invenții. De exemplu, o reducere a nivelului de hidrogen detectat în respirația unui subiect după tratamentul sau prevenirea cu o compoziție a invenției poate indica faptul că tratamentul are un

5 efect terapeutic sau preventiv. În mod corespunzător, în unele realizări metodele și utilizările invenției cuprind suplimentar monitorizarea nivelului de hidrogen în respirația unui subiect în timpul și/sau după tratamentul sau prevenția cu o compoziție a invenției și prin urmare evaluarea eficacității sau eficacității probabile a tratamentului sau prevenției.

De exemplu, nivelurile de hidrogen pot fi monitorizate de una sau mai multe (de

10 exemplul 1, 2, 3, 4 sau mai mult de 4) ori, de exemplu, incluzând înaintea tratamentului, la începerea tratamentului, în timpul tratamentului, la sfârșitul tratamentului și/sau după tratament, după cum se dorește. În unele realizări, nivelul de hidrogen în respirația subiectului la sfârșitul și/sau după perioada de dozare (în timpul căreia compoziția este administrată subiectului) este comparat cu nivelul de la începutul și/sau înaintea perioadei de dozare și o reducere a nivelului

15 indică eficacitatea sau eficacitatea probabilă a tratamentului sau prevenției. De exemplu, în realizările în care perioada de dozare este de 16 zile, poate fi dezirabil să se facă măsurători în ziua 1 și ziua 16, sau de exemplu în ziua 1, ziua 2, ziua 15 și ziua 16. În unele realizări, sunt făcute mai multe măsurători și este obținută media acelor măsurători (de exemplu, media din ziua 1 și ziua 2 și media din ziua 15 și ziua 16). În unele realizări, o reducere de cel puțin 40 ppm a nivelului

20 Cmax de hidrogen indică faptul că tratamentul sau prevenirea este eficientă sau probabil să fie eficientă. În unele realizări, nivelul de hidrogen în respirația subiectului este măsurat numai o dată, de exemplu, la sfârșitul sau după tratament, și descoperirea că nivelul este la sau aproape de un nivel predeterminat este un indicator că tratamentul sau prevenirea este probabil să fi fost eficientă. Testul respirației pentru hidrogen este un test standard și astfel nivelurile predeterminate sunt

25 cunoscute în domeniu.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în prevenirea diareei și/sau constipației la un subiect care primește sau a primit sau este aproape să primească (de exemplu, mai târziu în aceeași zi, următoarea zi, sau în 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14 sau 21 zile) tratament cu antibiotic sau care suferă de, sau a suferit de gastroenterită bacteriană. Tratamentul cu antibiotic

30 și gastroenterita bacteriană sunt asociate cu modificări în microbiota intestinului care pot precede diareea și/sau constipația și care pot fi prevenite de către compozițiile invenției. Compozițiile invenției pot fi administrate simultan, separat sau secvențial cu un tratament cu antibiotic. De exemplu, compozițiile invenției pot fi administrate concomitent cu un tratament cu antibiotic.

În realizări preferate, tratamentul cu compozițiile invenției conduce la o reducere în

35 diaree și/sau constipație.

Tratamentul sau prevenirea diareei și/sau constipației se poate referi la o ameliorare a severității simptomelor sau o reducere a frecvenței exacerbarilor sau a gamei de declanșatoare care sunt o problemă pentru pacient.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea

40 unei boli asociate cu infecție cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecție cu *E. coli*. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale. În astfel de realizări tulpina de *Enterobacteriaceae* poate fi o tulpină patogenă.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea

45 unei boli asociate cu niveluri crescute de *Enterobacteriaceae*, cum ar fi *E. coli*. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale. În astfel de realizări, tulpina de *Enterobacteriaceae* poate fi o tulpină comensală sau nepatogenă.

În realizări preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelului

50 de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, preferabil a nivelului de *E. coli*, în tratamentul sau prevenirea unei boli asociate cu niveluri crescute de *Enterobacteriaceae*, cum ar fi IBS, boală Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională, diaree, gastroenterită, infecție a tractului urinar sau meningită neonatală. *Enterobacteriaceae* și în particular *E. coli* sunt cunoscute ca fiind potențiale declanșatoare pentru, sau cunoscute că exacerbează, boala Crohn și colita ulcerativă [22-24], deci

55 efectul arătat în exemple pentru compozițiile invenției poate fi benefic în tratamentul acestor condiții.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea

60 IBS, bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale prin reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal.

Moduri de administrare

Preferabil, compozițiile invenției trebuie să fie administrate la tractul gastro-intestinal pentru a permite distribuirea la nivelul și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană a invenției. În general, compozițiile invenției sunt administrate oral, dar pot fi administrate rectal, intranazal, sau pe căile bucală sau sublinguală.

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

În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi administrate ca supozitoare, cum ar fi un supozitor rectal, de exemplu sub forma unei compoziții de ulei de Theobroma (unt de cacao), grăsime tare sintetică (de exemplu Suppocire, Witepsol), glicero-gelatină, polietilen glicol, sau glicerină de săpun.

În anumite realizări, compoziția invenției este administrată la tractul gastro-intestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nasogastric, tub orogastric, tub gastric, tub de jejunostomie (tub J), gastrostomie endoscopică percutanată (PEG), sau un port, cum ar fi un port de perete toracic care furnizează acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

Compozițiile invenției pot fi administrate o dată, sau pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite realizări, compozițiile invenției trebuie să fie administrate zilnic. Exemplele demonstrează că administrarea furnizează o colonizare cu succes și beneficii clinice în tratamentul diareei și/sau constipației.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt administrate regulat, cum ar fi zilnic, la fiecare două zile, sau săptămânal, pentru o perioadă extinsă de timp, cum ar fi timp de cel puțin o săptămână, două săptămâni, o lună, două luni, șase luni, sau un an. Exemplele demonstrează că administrarea de BH nu poate conduce la colonizarea permanentă a intestinului, astfel administrarea regulată pentru perioade extinse de timp poate furniza beneficii terapeutice mai mari.

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

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

În anumite realizări, compoziția invenției poate fi administrată unui animal gestant, de exemplu un mamifer cum ar fi un om pentru a preveni diareea și/sau constipația care se dezvoltă la copilul ei *in utero* și/sau după ce acesta este născut.

Compozițiile invenției pot fi administrate unui pacient care a fost diagnosticat cu diaree și/sau constipație sau o boală sau afecțiune asociată cu diaree și/sau constipație, sau care a fost identificat ca fiind la risc de a avea diaree și/sau constipație. Compozițiile pot fi de asemenea administrate ca o măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea diareei și/sau constipației la un pacient sănătos.

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 cu *Blautia*, și în particular *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

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

În general, compozițiile invenției sunt pentru tratamentul oamenilor, deși pot fi utilizate pentru a trata animale incluzând mamifere monogastrice cum ar fi păsări de curte, porci, pisici, câini, cai sau iepuri. Compozițiile invenției pot fi utile pentru amplificarea creșterii și performanței animalelor. Dacă este administrată la animale, poate fi utilizat gavajul oral.

În unele realizări, subiectul căruia compoziția urmează să-i fie administrată este un om adult. În unele realizări, subiectul căruia compoziția urmează să-i fie administrată este un copil uman.

Compoziții

În general, compoziția invenției cuprinde bacterii așa cum sunt definite în revendicări. În realizările preferate ale invenției, compoziția este formulată sub formă uscată prin congelare. De exemplu, compoziția invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină tari, cuprinzând o tulpină bacteriană a invenției cum s-a definit în revendicări.

Preferabil, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine-stabilită și îndrumarea relevantă este disponibilă în, de exemplu, referințele [25-27]. Compozițiile liofilizate pot fi în special eficiente. În realizări preferate, compozițiile invenției cuprind bacterii liofilizate și sunt pentru tratamentul diareei și/sau constipației asociate cu IBS.

5 Alternativ, compoziția invenției poate cuprinde o cultură bacteriană vie, activă. Exemplele demonstrează că culturile din bacteriile invenției sunt eficiente terapeutic.

În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost inactivată, de exemplu, nu a fost omorâtă prin căldură. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost omorâtă, de exemplu, nu a fost omorâtă prin căldură. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost atenuată, de exemplu, nu a fost atenuată prin 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 să colonizeze parțial sau total intestinul. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă și capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul.

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

În realizările preferate, compoziția invenției este încapsulată pentru a permite distribuirea tulpinii bacteriene intestinului. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la distribuire la locul țintei prin, de exemplu, rupere cu stimuli chimici sau fizici cum ar fi presiune, activitate enzimatică, sau dezintegrare fizică, care poate fi declanșată de modificările în pH. Orice metodă adecvată de încapsulare poate fi utilizată. Tehnicile exemplare de încapsulare includ capturarea într-o matrice poroasă, atașarea sau adsorbția pe suprafețe solide purtătoare, auto-agregarea prin floculare sau cu agenți de reticulare, și izolarea mecanică în spatele unei membrane microporoase sau o microcapsulă. Îndrumarea despre încapsulare care poate fi utilă pentru prepararea compozițiilor invenției este disponibilă, de exemplu, în referințe [28-29].

20 Compoziția poate fi administrată oral și poate fi sub forma unei tablete, capsule sau a unei pulberi. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece *Blautia* sunt anaerobe. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse precum captatori de oxigen și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți distribuirea și/sau colonizarea parțială sau totală și supraviețuirea *in vivo*. Alternativ, compoziția de probiotic a invenției poate fi administrată oral ca un produs alimentar sau nutrițional, cum ar fi un produs lactat fermentat pe bază de lapte sau zer, sau ca un produs farmaceutic.

35 Compoziția poate fi formulată ca probiotic.

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 pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a conduce la distribuirea în și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului pacientului.

40 O doză zilnică adecvată din bacterii, de exemplu pentru un om adult, poate fi de la aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități formatoare de colonii (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.

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

50 În anumite realizări, compoziția conține tulpina bacteriană într-o cantitate de la aproximativ 1×10^6 până la aproximativ 1×10^{11} CFU/g, raportat la greutatea compoziției; de exemplu, de la aproximativ 1×10^8 până 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 ne-digerabil cum ar fi o oligo- sau polizaharidă, sau un alcool din zahar, care nu este degradat sau absorbit în tractul digestiv superior. Prebioticele cunoscute includ produse comerciale cum ar fi inulina și transgalacto-oligozaharidele.

60 În anumite realizări, compoziția de probiotic a prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 până la aproximativ 30% din masă, raportat la 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, gumă arabică modificată și amidonuri rezistente, polidextroză, D-tagatoză, fibre de acacia, fibre de roșcovă, ovăz, și citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate prezentate în acest document mai jos ca FOS-c.c); FOS-c.c. menționate nu sunt carbohidrați digerabili, obținuți în general prin conversia zahărului din sfeclă și incluzând o moleculă de zaharoză la care sunt legate trei molecule de glucoză.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemplele de astfel de excipienți adecvați pot fi găsite în referința [30]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referința [31]. Exemplele de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și alții asemenea. Exemplele de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi realizată în funcție de calea de administrare intenționată și de practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de, purtător, excipient sau diluant orice liant(lianți) adecvat, lubrifiant (lubrifianți), agent(agenți) de suspendare, agent(agenți) de acoperire, agent(agenți) de solubilizare. Exemplele de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale cum ar fi glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitori din porumb, gume naturale și sintetice, cum ar fi de acacia, tragacantă sau alginat de sodiu, carboximetil celuloză și polietilen glicol. Exemplele de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și alții asemenea. Conservanți, stabilizatori, coloranți și chiar agenți de aromatizare pot fi prevăzuți în compoziția farmaceutică. Exemplele de conservanți includ benzoat de sodiu, acid sorbic, cisteină și esteri de acid p-hidroxibenzoic, de exemplu, în unele realizări conservantul este selectat dintre benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri de acid p-hidroxibenzoic. Pot fi utilizați de asemenea antioxidanți și agenți de punere în suspensie. Un exemplu suplimentar de purtător adecvat este zaharoza. Un exemplu suplimentar de conservant este cisteina.

Compozițiile invenției pot fi formulate ca produs alimentar. De exemplu, un produs alimentar poate furniza un beneficiu nutrițional 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 fiind mai similară cu un articol alimentar comun, mai degrabă decât cu o compoziție farmaceutică. În anumite realizări, compoziția invenției este formulată ca un produs pe bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte” semnifică orice produs lichid sau semi-solid pe bază de lapte sau zer având un conținut variabil de grăsime. Produsul pe bază de lapte poate fi, de exemplu, lapte de vacă, lapte de capră, lapte de oaie, lapte degresat, lapte integral, lapte recombinat din lapte-praf și zer fără nici o procesare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurt, lapte covăsit, brânză dulce, lapte acru, lapte integral acru, lapte bătut și alte produse din lapte acru. Un alt grup important include băuturile din lapte, cum ar fi băuturi din zer, lapte fermentat, lapte condensat, lapte pentru sugari sau bebeluși; lapte aromatizat, înghețată; alimente conținând lapte cum ar fi dulciuri.

În unele realizări, compozițiile invenției, cum au fost definite în revendicări, cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene din genul *Blautia* și nu conțin bacterii din oricare alt gen, sau cuprind numai cantități *infime* sau irelevante biologic de bacterii dintr-un alt gen.

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 *infime* sau irelevante biologic din alte tulpini bacteriene sau specii. O astfel de compoziție poate fi o cultură care este substanțial lipsită de alte specii de organisme. În unele realizări, o astfel de compoziție poate fi un liofilizat care este substanțial lipsit de alte specii de organisme.

În anumite realizări, compozițiile invenției, cum au fost definite în revendicări, cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene din genul *Blautia*, de exemplu, o *Blautia hydrogenotrophica* și nu conțin nici un alt gen bacterian, sau cuprind numai cantități *infime* sau irelevante biologic de bacterii dintr-un alt gen. În anumite realizări, compozițiile invenției cuprind *Blautia hydrogenotrophica*, cum s-a definit în revendicări, și nu conțin nici o altă specie bacteriană, sau cuprind numai cantități *infime* sau irelevante biologic de bacterii dintr-o altă specie. În anumite realizări, compozițiile invenției cuprind o singură tulpină de *Blautia hydrogenotrophica*, cum s-a definit în revendicări, și nu conțin nici o altă tulpină bacteriană sau specie, sau cuprind numai cantități *infime* sau irelevante biologic de bacterii dintr-o altă tulpină sau specie.

În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o tulpină sau specie bacteriană. De exemplu, în unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o tulpină din interiorul aceleiași specii (de exemplu mai mult de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40

sau 45 de tulpini), și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai puțin de 50 de tulpini din interiorul aceleiași 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 de tulpini din interiorul aceleiași specii și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o specie din interiorul aceluiași 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 de specii), și, opțional, nu conțin bacterii din oricare alt gen. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai puțin de 50 de specii din interiorul aceluiași 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 oricare 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 de specii din interiorul aceluiași gen și, opțional, nu conțin bacterii din oricare alt gen. Invenția cuprinde orice combinație a celor de mai sus.

În unele realizări, compoziția cuprinde un consorțiu microbian. De exemplu, în unele realizări, compoziția cuprinde tulpina bacteriană *Blautia*, cum s-a definit în revendicări, ca parte a unui consorțiu microbian. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană *Blautia* 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 poate trăi în simbioză *in vivo* în 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 microbian cuprinde două sau mai multe tulpini bacteriene obținute dintr-o mostră de fecale a unui singur organism, de exemplu un om. În unele realizări, consorțiul microbian nu este găsit împreună în natură. De exemplu, în unele realizări, consorțiul microbian cuprinde tulpini bacteriene obținute din mostrele de fecale de la cel puțin două organisme diferite. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt din aceeași specie, de exemplu doi oameni diferiți. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un sugar uman și un adult uman. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un om și un mamifer non-uman.

În unele realizări, compoziția invenției cuprinde suplimentar o tulpină bacteriană care are aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică precum tulpina de *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, specie sau gen bacterian, tulpinile, speciile sau genurile bacteriene individuale pot fi pentru administrare separată, simultană sau secvențială. De exemplu, compoziția poate cuprinde toate dintre acele mai mult de o tulpină, specie sau gen bacterian, sau tulpinile, speciile sau genurile bacteriene pot fi depozitate separat și pot fi administrate separat, simultan sau secvențial. În unele realizări, acele mai mult de o tulpină, specie sau gen bacterian sunt depozitate separat dar sunt amestecate împreună înainte de utilizare.

În unele realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție este obținută din fecale de om adult. În unele realizări în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, toate tulpinile bacteriene sunt obținute din fecale de om adult sau dacă sunt prezente alte tulpini bacteriene acestea sunt prezente numai în cantități *infime*. Este posibil ca bacteriile să fi fost cultivate după ce au fost obținute din fecalele de om adult și utilizate într-o compoziție a invenției.

În unele realizări, acea una sau mai multe tulpini bacteriene de *Blautia* reprezintă singurul agent activ (singurii agenți activi) terapeutic într-o compoziție a invenției cum s-a definit în revendicări. În unele realizări, tulpina bacteriană (tulpinile bacteriene) din compoziție reprezintă singurul agent activ (singurii agenți activi) terapeutic într-o compoziție a invenției.

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

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană menționată este liofilizată. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană menționată 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 aceasta 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 aceasta 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 să colonizeze parțial sau total intestinul. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care aceasta este viabilă și capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul.

5 În unele cazuri, tulpina bacteriană liofilizată sau uscată prin pulverizare este reconstituită înainte de administrare. În unele cazuri, reconstituirea este prin utilizarea unui diluant descris în acest document.

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

10 În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană conform invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare atunci când se administrează la un subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este diara sau constipația asociate cu boala Crohn, colita ulcerativă sau, mai preferabil, IBS.

15 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 formatoare de colonii per gram în raport cu masa 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.

20 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care compoziția este administrată printr-o metodă selectată din grupul constând din oral, rectal, subcutanat, nazal, bucal, și sublingual.

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

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

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitor de porumb, acacia, tragacant, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, polietilen glicol, 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, cuprinzând în plus cel puțin unul dintre un conservant, un antioxidant și un stabilizator.

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

În anumite realizări, este furnizată compoziția farmaceutică a invenției, în care compoziția nu cuprinde nici un mineral, sau mai specific, nu cuprinde nici un metal cu un număr atomic mai mare de 33, de exemplu, în care compoziția nu cuprinde nici un mineral din grupul constând din seleniu, molibden, tungsten, compuși de seleniu, compuși de molibden și compuși de tungsten.

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

45 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care atunci 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, rămâne cel puțin 80% din tulpina bacteriană după cum s-a măsurat în unități formatoare de colonii, 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.

50 În unele realizări, compoziția invenției este furnizată într-un recipient etanșat cuprinzând o compoziție cum s-a descris în acest document. În unele realizări, recipientul etanșat este un pliculeț sau o sticlă. În unele realizări, compoziția invenției este furnizată într-o seringă cuprinzând o compoziție cum s-a descris în acest document.

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

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

60 Formulările farmaceutice adecvate pentru administrare orală includ pastile solide, microparticule solide, semi-solid și lichid (incluzând faze multiple sau sisteme dispersate) cum ar

fi tablete; capsule moi sau tari conținând multi- sau nano-particule, lichide (de exemplu soluții apoase), emulsii sau pulberi; pastile (incluzând umplute cu lichid); tablete masticabile; geluri; forme de dozare cu dispersare rapidă; filme; ovule; spray-uri; și plasturi bucali/mucoadezivi.

În unele realizări formularea farmaceutică este o formulare enterică, adică o formulare gastro-rezistentă (de exemplu, rezistentă la pH gastric) care este adecvată pentru distribuirea compoziției invenției în intestin prin administrare orală. Formulările enterice pot fi utile în special când bacteriile sau o altă componentă a compoziției este sensibilă la acid, de exemplu predispusă la degradare în 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 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 administrare orală. Formularea poate cuprinde o acoperire cu film, de exemplu, un strat subțire de film dintr-un polimer enteric, de exemplu un polimer insolubil în acid.

În unele realizări, formularea enterică este intrinsec enterică, de exemplu, gastro-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 de termogelificare. În unele realizări, materialul de termogelificare este un material celulozic, cum ar fi metilceluloză, hidroximetilceluloză sau hidroxipropilmetilceluloză (HPMC). În unele realizări, capsula cuprinde un înveliș care nu conține nici un polimer formator de film. În unele realizări, capsula cuprinde o cochilie și cochilia cuprinde hidroxipropil-metilceluloză și nu cuprinde nici un polimer formator de film (de exemplu vezi [32]). În unele realizări, formularea este o capsulă intrinsec enterică (de exemplu, Vcaps® de la Capsugel).

În unele realizări, formularea este o capsulă moale. Capsulele moi sunt capsule care, datorită adăugărilor de emolienți, cum ar fi, de exemplu, glicerol, sorbitol, maltitol și polietilen glicoli, prezenți în cochilia capsulei, pot avea 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. În funcție de metoda administrării, cum ar fi, de exemplu, oral sau rectal, capsulele moi pot avea diferite forme, ele pot fi, de exemplu, rotunde, ovale, alungite sau în formă de torpilă. Capsulele moi pot fi produse prin procedee convenționale, cum ar fi, de exemplu, prin procedeul Scherer, procedeul Accogel sau procedeul în picătură sau de suflare.

35 **Metodele de cultivare**

Tulpinile bacteriene pentru utilizare în prezenta invenție pot fi cultivate utilizând tehnici standard de microbiologie cum s-a detaliat în, de exemplu, referințe [33-35].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi de exemplu agar YCFA sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (per 100ml, valori aproximative): Casitone (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), hemină (1 mg), biotină (1 μg), cobalamină (1 μg), acid *p*-aminobenzoic (3 μg), acid folic (5 μg), și piridoxamină (15 μg).

45 **Generalități**

Practica prezentei invenții va utiliza, dacă nu se indică altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în cadrul competenței din domeniu. Astfel de tehnici sunt explicate complet în literatură. Vezi, de exemplu, referințele [36-43], etc.

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

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

Cuvântul „substanțial” nu exclude „complet” de exemplu o compoziție care este „substanțial lipsită” de Y poate fi complet lipsită de Y. Unde este necesar, cuvântul „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, acel procent de nucleotide este identic la compararea celor

două secvențe. Această aliniere și omologia procentuală sau identitatea de secvență pot fi determinate utilizând programe de software cunoscute în domeniu, de exemplu acelea descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [44]. O aliniere preferată este determinată prin algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman utilizând o căutare a discontinuității afine cu o penalizare de deschidere a discontinuității de 12 și o penalizare de extensie a discontinuității de 2, matrice BLOSUM de 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este divulgat în ref. [45].

Dacă nu se menționează în mod specific, un procedeu sau metodă cuprinzând numeroase etape poate cuprinde etape suplimentare la începutul sau sfârșitul metodei, sau poate cuprinde etape intermediare suplimentare. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau efectuate într-o ordine alternativă, dacă este adecvat.

În acest document sunt descrise 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 în acest document ca fiind adecvate, tipice sau preferate pot fi combinate una cu cealaltă (excepție când acestea sunt reciproc exclusive).

MODURI PENTRU EFECTUAREA INVENȚIEI

Exemplul 1 - Modificări în simptomele pacientului în timpul studiului clinic de Fază 1

A fost efectuat un studiu clinic de Fază I în care s-a administrat *Blautia hydrogenotrophica* („Blautix“, tulpină depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294) la pacienții umani având 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 ziua 19-23. Blautix a fost găsit ca fiind atât sigur cât și bine tolerat. Au fost monitorizate patru simptome, dintre care două au fost diareea și constipația. Studiul a înregistrat dacă pacienții au experimentat o îmbunătățire, nici o modificare, sau o înrăutățire a fiecăruia dintre aceste simptome. Rezultatele de la pacienții cărora li s-a administrat Blautix au fost comparate cu acelea obținute utilizând pacienți cărora li s-a 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 1 și 2.

Când simptomele raportate de pacienți în ziua 16 au fost comparate cu linia de bază din ziua 1, 82% din 17 pacienți cu IBS care au primit Blautix au raportat o ameliorare a simptomelor (Figura 1). Îmbunătățirea simptomelor, dintre care două sunt diareea și constipația, susține utilizarea de Blautix pentru tratarea sau prevenirea diareei și constipației.

50% din pacienții care au primit placebo au raportat o îmbunătățire a simptomelor (Figura 1). Ratele ridicate de răspuns la placebo sunt un fenomen stabilit în studiile clinice ale IBS. Xifaxan a fost recent aprobat pentru a trata IBS pe baza unor îmbunătățiri mult mai mici față de placebo (vezi: <http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d.xml>).

Este așteptată o agravare a simptomelor la terminarea studiului (ziua 19-23) în comparație cu simptomele prezente după terminarea dozării (ziua 16) bazată pe învățămintele prezentate în acest document. Această agravare a simptomelor a fost observată în studiul clinic de Fază I: 41% din pacienții cu IBS au raportat agravarea simptomelor după încetarea dozării cu Blautix (Figura 2). Agravarea simptomelor, dintre două sunt diareea și constipația, după încetarea dozării cu Blautix prin urmare susține de asemenea utilizarea de Blautix în tratarea sau prevenirea diareei și/sau constipației.

Exemplul 2 - Rezultatele testului respirației pentru hidrogen

Nivelurile de hidrogen în respirație sunt un biomarker al activității Blautix - MoA implică metabolism al H₂ endogen pentru a produce acetat. Subiecților umani li s-a administrat lactuloză și li s-au eșantionat nivelurile de hidrogen (H₂) (Cmax) la patru momente de timp: ziua 1, ziua 2, ziua 15 și ziua 16. Rezultatele necorectate de hidrogen au fost convertite la rezultate corectate de hidrogen.

Unii pacienți au fost excluși din analiză. Au fost trei motive pentru care un subiect nu a fost inclus în analiza testului respirației pentru hidrogen: 1) Aceștia au produs un rezultat al CMAX din testul respirației pentru hidrogen de <20 în una dintre cele patru zile de eșantionare și au fost prin urmare considerați că nu au răspuns la test; 2) Aceștia au fost producători de metan (luați ca producând mai mult metan decât hidrogen în testul respirației), acest lucru afectează răspunsul pentru hidrogen; și/sau 3) a existat o valoare aberantă obținută în testul respirației pentru hidrogen (232 ppm). Subiecții 3.12 (Blautix), 3.24 (Blautix), 4.07 (Blautix) au fost excluși ca ne-

respondenți. Subiecții 3.03 (Blautix) și 3.08 (Placebo) au fost excluși ca producători de metan (4.07, menționat ca exclus mai sus, a fost de asemenea un producător de metan). Subiectul 4.09 (Placebo) a fost exclus din cauza unei valori aberante.

5 Rezultatele analizei pentru hidrogen corectate de la sfârșitul perioadei de dozare (ziua 15/16) au fost comparate cu acelea de la linia de bază (ziua 1/2). 10 din 12 pacienți (83%) care au primit Blautix au avut o reducere a nivelurilor de hidrogen în această perioadă (Figura 3a și 3c). În contrast, 3 din 6 (50%) pacienți care au primit placebo au avut niveluri reduse de hidrogen (Figura 3b și 3c). Aceste procentaje sunt similare cu procentajele pacienților care prezintă o îmbunătățire în simptome după tratament cu Blautix sau administrare de placebo.

10 Figura 4 prezintă rezultatele pentru hidrogen necorectate și corectate pentru grupul de tratament cu Blautix (Verum) împreună cu o analiză statistică a rezultatelor. S-a descoperit că valorile medii atât pentru H_2 necorectat cât și corectat diferă între ziua 1 și ziua 15. După 13,5 zile de tratament, a fost detectată o scădere semnificativă statistic ($p < 0,05$) a H_2 în Cmax în testul respirației după stimularea cu lactuloză. În contrast, pentru grupul cu placebo, media s-a găsit ca fiind echivalentă pentru ziua 1 și ziua 15 ($p > 0,05$) (Figura 5). Astfel, media pentru grupul de
15 tratament (la care se face referire de asemenea ca grup VERUM), scade între ziua 1 și ziua 15 în timp ce media pentru grupul cu placebo este echivalentă între ziua 1 și ziua 15 atât pentru rezultatele hidrogenului necorectate cât și rezultatele hidrogenului corectate (Figura 6).

20 **Exemplul 3 - Testarea stabilității**

O compoziție descrisă în acest document conținând cel puțin o tulpină bacteriană descrisă în acest document este 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
25 relativă. După 1 lună, 2 luni, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani, vor rămâne cel puțin 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% din tulpina bacteriană după cum s-a măsurat în unități formatoare de colonii determinate prin protocoale standard.

30 **Secvențe**

SEQ ID NO:1 (gena de ARN 16S ribozomal a tulpinii *Blautia stercoris* GAM6-1, secvență parțială - HM626177)

35

```

1  tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacggtat cgcattgatac agtggtgaaaa actccggttg
181 tatgagatgg accgcgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaatatgca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggatatgaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag
601 gtaagcggaa ttctagtgt agcgggtgaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggtcga aagcgtggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaacg
781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtga gcatgtggt taattcgaag
901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct gtgagatgtt
1021 ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaacctc atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc

```

1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggaacgacgtc aaatcatcat
 1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc
 1201 gcgaggggga gcaaattcca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
 1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg
 1321 ggtctgttac acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgccgaag tc

SEQ ID NO:2 (gena de ARN 16S ribozomal a tulpinii *Blautia wexlerae* WAL 14507, secvență parțială - EF036467)

5

1 caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
 181 aagatggacc cgcgttgat tagcttgttg gtggggtaac ggccaccaaa ggcgacgac
 241 catagccggc ctgagagggg gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggagggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccg
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gcccgggcta actacgtgcc agcagcccg gtaatacgtg gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggg gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcattgggt caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
 601 agcggaaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
 661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataacctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcgggtggagc atgtggttta attcgaagca
 901 acgcgaagaa cttaccaag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggatctttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtgatgg ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcaact
 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggtacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cggatgaatac gttcccggt
 1321 cttgtacaca ccgccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
 1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaagg

SEQ ID NO:3 (secvență consens a ARNr 16s pentru tulpina *Blautia stercoris* 830)

10

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
 CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTCATACAGGGGGATAACA
 GTTGAAACCGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
 GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
 ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
 CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG
 TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
 AAAGTGTCTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGAGCAAACGCAA
 TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTTATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTCTGTAATGGAACCTT
 TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCGGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTAACACCCGCCGTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

SEQ ID NO:4 (secvență consens a ARNr 16s pentru tulpina *Blautia wexlerae* MRX008)

TTCAATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGGGAAACCTTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
 5 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
 CGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
 GTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTTCCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
 AACCCTGACTACACGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
 CACACCGCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO:5 (gena de ARN 16S ribozomal a tulpinii *Blautia hydrogenotrophica* S5a36, secvență parțială - X95624.1)

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
 61 ttctcggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgag tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt
 181 cgcatagaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccactc ctacgggagg cagcagtggt gaatatgca
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgcaggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgaa ttcctagtgt agcgtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcgcc tgctggacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtg cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca
 901 caagcgggtg agcatgtgtg ttaattcgaa gcaaccgaa gaaccttacc aaatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcgaa cagaggagac aggtggtgca
 1021 tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggt acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaactc aaaaataacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtgcgggtga atacgttccc gggctctgta cacaccgcc gtcacaccat
 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaag gagggagctg ccgaaggtgg
 1441 gactgataac tggggtga

REFERINTE

5

- [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
- 10 [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.
- 15 [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
- 20 [14] WO 2013/008039
- [15] WO 2014/167338
- [16] Lee and 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.
- 25 [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] Darfeuille-Michaud et al. (2004) *Gastroenterology* 127(2):412-21.
- [23] Strus et al. (2015) *Cent Eur J Immunol.*40(4):420-30.
- [24] Petersen et al. (2015) *Scand J Gastroenterol.*;50(10):1199-207.
- 30 [25] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [26] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. de Day and McLellan, Humana Press.
- [27] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [28] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.

- [29] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
- [30] Handbook of Pharmaceutical Excipients, Ediția a 2-a, (1994), Editată de A Wade și PJ Weller
- [31] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [32] US 2016/0067188
- 5 [33] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [34] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [35] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
- [36] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
- 10 [37] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., ed., 1998, Academic Press).
- [38] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, ed., Academic Press, Inc.)
- [39] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, ed, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- 15 [40] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [41] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [42] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, ediția a 5-a (Current Protocols).
- 20 [43] PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a doua (Newton & Graham ed., 1997, Springer Verlag)
- [44] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., ed., 1987) Supplement 30
- [45] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> 4D PHARMA PLC

<120> COMPOZIȚII CUPRINZÂND TULPINI BACTERIENE

<130> P068687WO

<141> 2017-03-06

<150> GB 1612190.7

<151> 2016-07-13

<150> GB 1616018.6

<151> 2016-09-20

<150> GB 1616016.0

<151> 2016-09-20

<150> GB 1703548.6

<151> 2017-03-06

<150> GB 1703552.8

<151> 2017-03-06

<160> 5

<170> SeqWin2010, versiunea 1.0

<210> 1

<211> 1372

<212> ADN

<213> Blautia stercoris

<400> 1

tgcaagtcga	gcgaagcgct	tacgacagaa	ccttcggggg	aagatgtaag	ggactgagcg	60
gcggaacggg	gagtaacgcg	tgggtaacct	gcctcataca	gggggataac	agttggaaac	120
ggctgcta	accgcataag	cgcacggtat	cgcacgatac	agtgtgaaaa	actccgggtg	180
tatgagatgg	acccgcgtct	gattagctag	ttggaggggt	aacggccac	caaggcgacg	240
atcagtagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	300
ctacgggagg	cagcagtggg	gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	360
gcgtgaagga	agaagtatct	cggtatgtaa	acttctatca	gcagggaaga	aaatgacgg	420
acctgactaa	gaagccccgg	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatac	gtagggggca	480
agcgttatcc	ggatttactg	ggtgtaaaag	gagcgtagac	ggaagagcaa	gtctgatgtg	540
aaagcgtggg	gcttaacccc	aggactgcat	tggaaactgt	ttttcttgag	tgccggagag	600
gtaagcggaa	ttcctagtgt	agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	660
gaagcgggct	tactggacgg	taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtggg	agcaaacagg	720
attagatacc	ctggtagtcc	acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgttgg	ggagcaaacg	780
tcttcgggtg	cgcagcaaac	gcaataagta	ttccacctgg	ggagtacgtt	cgaagaatg	840
aaactcaaa	gaattgacgg	ggaccgcgac	aagcgggtga	gcatgtggtt	taattcgaag	900
caacgcgaag	aaccttacca	agtcttgaca	tcgatctgac	cggttcgtaa	tggaaacctt	960
ccttcgggac	agagaagaca	ggtggtgcat	ggttgtcgtc	agctcgtgtc	gtgagatgtt	1020
gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaacccct	atcctcagta	gccagcaggt	gaagctgggc	1080
actctgtgga	gactgccagg	gataacctgg	aggaaggcgg	ggacgacgtc	aaatcatcat	1140
gccccttatg	atttgggcta	cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaagg	aagcgagccc	1200
gcgaggggga	gcaaataccc	aaaataacgt	cccagttcgg	actgcagtct	gcaactcgac	1260
tgacacgaag	tggaatcgct	agtaatcgcg	aatcagaatg	tcgcggtgaa	tacgttcccg	1320
ggtctgttac	acaccgccc	tcacaccatg	ggagtcagta	acgcccgaag	tc	1372

<210> 2

<211> 1438

<212> ADN

<213> *Blautia wexlerae*

<220>

<221> bază modificată

<222> 19

<223> 'n' este a, c, g sau t

<400> 2

caagtcgaac	gggaattant	ttattgaaac	ttcgggtcgat	ttaattta	tctagtggcg	60
gacgggtgag	taacgcgtgg	gtaacctgcc	ttatacaggg	ggataacagt	cagaaatggc	120
tgctaataacc	gcataagcgc	acagagctgc	atggctcagt	gtgaaaaact	ccggtgggtat	180
aagatggacc	cgcgttggtat	tagcttgttg	gtggggtaac	ggcccaccaa	ggcgacgatc	240
catagccggc	ctgagagggg	gaacggccac	attgggactg	agacacggcc	cagactccta	300
cgggagggcag	cagtggggaa	tattgcacaa	tgggggaaac	cctgatgcag	cgacgcccg	360
tgaaggaaga	agtatctcgg	tatgtaaact	tctatcagca	gggaagatag	tgacggtacc	420
tgactaagaa	gccccggcta	actacgtgcc	agcagccgcy	gtaatacgtg	gggggcaagc	480
gttatccgga	tttactgggt	gtaaaaggag	cgtagacgg	gtggcaagtc	tgatgtgaaa	540
ggcatgggct	caacctgtgg	actgcattgg	aaactgtcat	acttgagtgc	cggaggggta	600
agcgaattc	ctagtgtagc	ggtgaaatgc	gtagatatta	ggaggaacac	cagtggcgaa	660
ggcggttac	tgagcggtaa	ctgacgttga	ggctcgaaag	cgtggggagc	aaacaggatt	720
agataccctg	gtagtccacg	ccgtaaacga	tgaataacta	ggtgtcgggt	ggcaagcca	780
ttcgggtgcc	tcgcaaacgc	agtaagtatt	ccacctgggg	agtacgttcg	caagaatgaa	840
actcaaagga	attgacgggg	acccgcacaa	gcgggtggagc	atgtggttta	attcgaagca	900
acgcgaagaa	ccttaccagg	tcttgacatc	cgctgaccg	atccttaacc	ggatctttcc	960
ttcgggacag	gcgagacagg	tggtgcatgg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt	gagatgttgg	1020
gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccttat	cctcagtagc	cagcatttaa	ggtgggcact	1080
ctggggagac	tgccagggat	aacctggagg	aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcacatgccc	1140
ccttatgatt	tgggctacac	acgtgctaca	atggcgtaaa	caaagggaag	cgagattgtg	1200
agatggagca	aatccccaaa	ataacgtccc	agttcggact	gtagtctgca	acccgactac	1260
acgaagctgg	aatcgctagt	aatcgcggtg	cagaatgccg	cgggtgaatac	gttcccggtg	1320
cttgtacaca	ccgcccgtca	caccatggga	gtcagtaacg	cccgaagtca	gtgacctaac	1380
tgcaaaagaa	gagctgccga	aggcgggacc	gatgactggg	gtgaagtcgt	aacaaggt	1438

<210> 3

<211> 1481

<212> ADN

<213> *Blautia stercoris*

<220>

<221> bază modificată

<222> 4

<223> 'k' este g sau t

<400> 3

tttkgtctgg	ctcaggatga	acgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcgaagc	60
gcttacgaca	gaaccttcgg	gggaagatgt	aagggactga	gcggcggacg	ggtgagtaac	120
gcgtgggtaa	cctgcctcat	acagggggat	aacagttgga	aacggctgct	aataccgcat	180
aagcgacacg	tatcgcatga	tacagtgtga	aaaactccgg	tggtatgaga	tggaccgcg	240
tctgattagc	tagttggagg	ggtaacggcc	caccaaggcg	acgatcagta	gccggcctga	300
gagggtgaac	ggccacattg	ggactgagac	acggcccaga	ctcctacggg	aggcagcagt	360
ggggaatatt	gcacaatggg	ggaaaccctg	atgcagcgac	gccgcgtgaa	ggaagaagta	420
tctcggtatg	taaacttcta	tcagcaggga	agaaaatgac	ggtacctgac	taagaagccc	480
cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa	tacgtagggg	gcaagcgtaa	tccggattta	540
ctgggtgtaa	agggagcgta	gacggaagag	caagtctgat	gtgaaaggct	ggggcttaac	600
cccaggactg	cattggaaac	tgtttttctt	gagtgccgga	gaggtaagcg	gaattcctag	660
tgtagcggtg	aatgcgtag	atattaggag	gaacaccagt	ggcgaaggcg	gcttactgga	720
cggtaactga	cgttgaggct	cgaagcgtg	gggagcaaac	aggattagat	accctggtag	780
tccacgccgt	aaacgatgaa	tactagggtg	tggggagcaa	agctcttcgg	tgccgcagca	840
aacgcaataa	gtattccacc	tggggagtac	gttcgcaaga	atgaaactca	aaggaattga	900
cggggacccg	cacaagcggg	ggagcatgtg	gtttattcga	agcaacgcga	agaaccttac	960
caagtcttga	catcgatctg	accggttcgt	aatggaacct	ttccttcggg	acagagaaga	1020
cagtggtgtg	atggttgctg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	tcccgcaacg	1080
agcgcaaccc	ctatcgtcag	tagccagcag	gtaaagctgg	gcactctgag	gagactgccg	1140
gggataacct	ggaggaaggc	ggggacgacg	tcaaatcatc	atgccctta	tgatttgggc	1200
tacacacgtg	ctacaatggc	gtaaacaaaag	ggaagcgagc	ccgcgagggg	gagcaaatcc	1260
caaaaataac	gtcccagttc	ggactgcagt	ctgcaactcg	actgcacgaa	gctggaatcg	1320
ctagtaatcg	cgaatcagaa	tgtcgcggtg	aatacgttcc	cgggtcttgt	acacaccgct	1380
cgtcacacca	tgggagtcag	taacgccgga	agtcagtgac	ccaaccttag	ggaggagct	1440
gccgaaggcg	ggattgataa	ctggggtgaa	gtctaggggg	t		1481

<210> 4

<211> 1384

<212> ADN

<213> Blautia wexlerae

<220>

<221> bază modificată

<222> 749

<223> 'n' este a, c, g sau t

<400> 4

ttcattgaga	cttcggtgga	tttagattct	atttctagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	60
tgggtaacct	gccttataca	gggggataac	agtcagaaat	ggctgcta	accgcataag	120
cgcacagagc	tgcatggctc	agtgtgaaaa	actccgggtg	tataagatgg	accgcggttg	180
gattagcttg	ttggtgggtg	aacggcccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	240
ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtggt	300
gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	360
cgttatgtaa	acttctatca	gcagggaaga	tagtgacggt	acctgactaa	gaagccccgt	420
ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatac	gtagggggca	agcgttatcc	ggatttactg	480
ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggtgtggcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	540
tggactgcat	tggaaactgt	catacttgag	tgccggaggg	gtaagcggaa	ttcctagtgt	600
agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaaggcggct	tactggacgt	660
taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	720
acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgtcng	gggagcatgg	ctcttcgggt	ccgtcgcaaa	780
cgcagtaagt	attccacctg	gggagtacgt	tcgcaagaat	gaaactcaaa	ggaattgacg	840
gggaccgcga	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	900
aagtcttgac	atccgcctga	ccgatccctta	accggatctt	tccttcggga	caggcgagac	960
aggtggtgca	tgggtgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgcacgca	1020
gcgcaacccc	tatcctcagt	agccagcatt	taaggtgggc	actctgggga	gactgccagg	1080
gataacctgg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcatcat	gccccttatg	atttgggcta	1140
cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaaggg	aagcgagatc	gtgagatgga	gcaaatccca	1200
aaaataacgt	cccagttcgg	actgtagtct	gcaacccgac	tacacgaagc	tggaaatcgt	1260
agtaatcgcg	gatcagaatg	ccgcgggtgaa	tacgttcccg	ggtcttgtac	acaccgcccg	1320
tcacaccatg	ggagtcagta	acgccccaag	tcagtgcact	aactgcaaa	aaggagctgc	1380
cga						1384

<210> 5

<211> 1458

<212> ADN
 <213> *Blautia hydrogenotrophica*

<220>
 <221> bază modificată
 <222> 1416
 <223> 'n' este a, c, g sau t

<400> 5

```

gatgaacgct ggcggcgctgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga 60
tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct 120
gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt 180
cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtg gattagctag 240
ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc 300
caattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagg cagcagtggt gaatttgca 360
caatggggga aacctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa 420
acttctatca gcagggaaga aagtgacggc acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt 480
gccagcagcc gcggtaatat gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg 540
gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat 600
tggaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgaa ttcctagtgt agcggtgaaa 660
tgcttagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcgccc tgctggacgg taactgacgt 720
tgaggtcga aagcgtggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa 780
cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaac cattcggtgc cgcagcaaac gcaataagta 840
ttccacactg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaa ggaattgacg gggacccgca 900
caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac 960
atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca 1020
tggttctcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct 1080
tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg 1140
gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccctat gatttgggct acacacgtgc 1200
tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg 1260
tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320
gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctcttga cacaccgcc gtcacacat 1380
gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtg 1440
gactgataac tggggtga 1458

```

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- C. LIU ET AL: "Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov.", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01) , pages 1896-1902, XP055005236, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ijs.0.65208-0
- WO-A1-01/85187
- WO-A1-02/07741
- WO-A1-2012/142605
- WO-A1-2016/057671
- US-A1- 2010 247 489
- US-A1- 2016 184 370

(57) Revendicări:

1. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogeno-trophica* având o secvență rARN 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a diareei și/sau constipației.
2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care diareea și/sau constipația este asociată cu sindromul colonului iritabil și/sau o boală inflamatorie a intestinului.
3. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 2, în care boala inflamatorie este la intestin subțire, colon sau rect.
4. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care diareea și/sau constipația este asociată cu sindromul colonului iritabil, boală Crohn sau colită ulcerativă.
5. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, în care compoziția este pentru utilizare
 - (a) în tratarea sau prevenirea diareei și/sau constipației la un subiect diagnosticat cu sindromul colonului iritabil, boală Crohn sau colită ulcerativă; și/sau
 - (b) într-o metodă de tratare a diareei în care subiectul are diaree fără constipație; și/sau
 - (c) într-o metodă de tratare a constipației în care subiectul are constipație fără diaree
6. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care subiectul suplimentar are durere abdominală și/sau balonare și/sau în care subiectul are un nivel crescut de hidrogen în respirația sa față de un subiect sănătos.
7. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care utilizarea cuprinde în plus reducerea nivelului de hidrogen în respirația subiectului.
8. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care utilizarea cuprinde în plus monitorizarea nivelului de hidrogen din respirația subiectului în timpul și/sau după tratament sau prevenire și prin urmare evaluarea posibilei eficacități a tratamentului sau prevenirii.
9. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogeno-trophica* având o secvență rARN 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de reducere a nivelului de Enterobacteriaceae în tractul gastrointestinal în tratamentul sau prevenirea diareei.
10. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1 în care diareea este asociată cu infecție cu Enterobacteriaceae.
11. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 12 sau revendicarea 13, în care Enterobacteriaceae este *E. coli*.
12. Compoziția pentru utilizare oricăror revendicare precedentă, 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.
13. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a diareei și/sau constipației la un subiect diagnosticat cu sindromul colonului iritabil.
14. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care
 - (a) compoziția este pentru administrare orală; și/sau
 - (b) compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili

farmaceutic; și/sau

(c) tulpina bacteriană este liofilizată; și/sau

(d) tulpina bacteriană este viabilă; și/sau

(e) compoziția cuprinde o singură tulpină din genul *Blautia*; și/sau

(f) compoziția cuprinde tulpina bacteriană *Blautia* ca parte a unui consorțiu microbian.

15. Un produs alimentar cuprinzând compoziția din oricare revendicare precedentă, pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă.

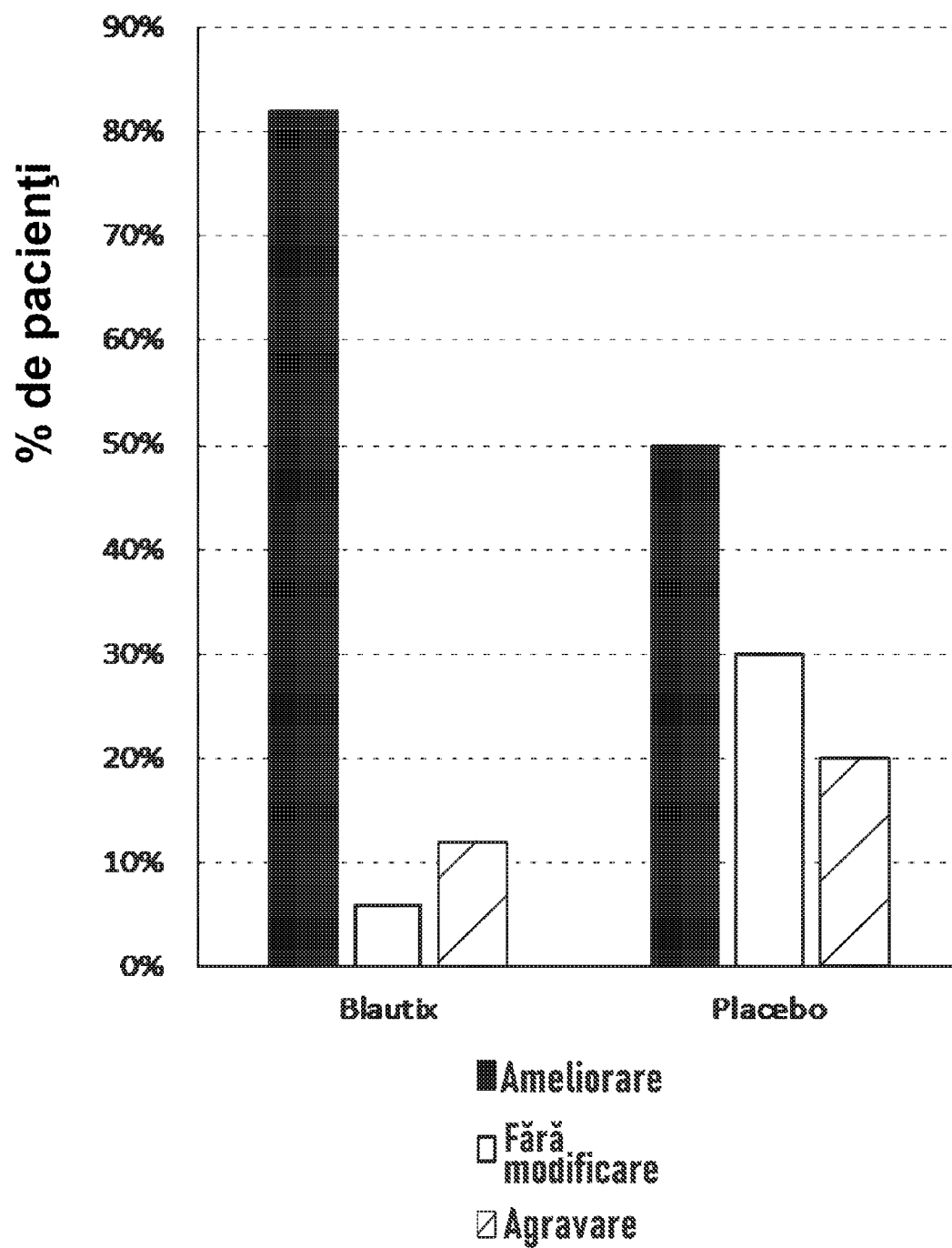


Fig. 1

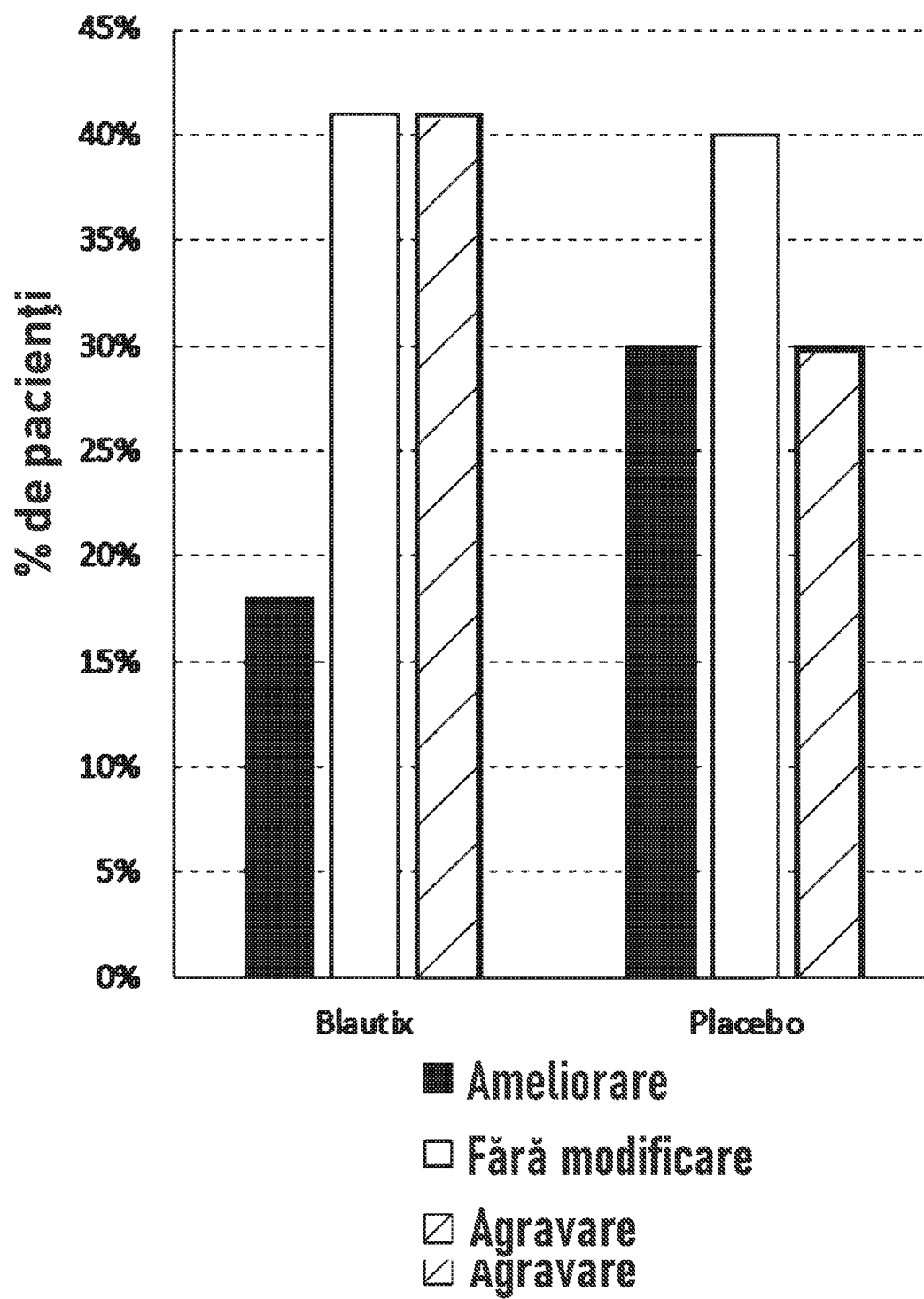


Fig. 2

10/12 cu Blautix prezintă reducere în hidrogen (83%)

	ZIUA 1	ZIUA 2	MEDIE	ZIUA 15	ZIUA 16	MEDIE		DIF
ID pacient	CMAX	CMAX		CMAX	CMAX			CMAX
3,02	123,0	94,0	108,5	34,0	74,0	54,0		-54,5
3,04	70,0	32,0	51,0	25,0	46,0	35,5		-15,5
3,05	163,0	116,0	139,5	167,0	111,0	139,0		-0,5
3,07	71,0	69,0	70,0	46,0	80,0	63,0		-7,0
3,09	121,0	76,0	98,5	66,0	65,0	65,5		-33,0
3,11	75,0	98,0	86,5	128,0	76,0	102,0		15,5
3,13	118,0	41,0	79,5	85,0	59,0	72,0		-7,5
3,15	155,0	99,0	127,0	63,0	87,0	75,0		-52,0
3,17	134,0	210,0	172,0	139,0	107,0	123,0		-49,0
3,19	72,0	53,0	62,5	87,0	85,0	86,0		23,5
3,21	144,0	139,0	141,5	75,0	126,0	100,5		-41,0
3,22	59,0	71,0	65,0	55,0	34,0	44,5		-20,5
Media	108,8	91,5	100,1	80,8	79,2	80,0		-20,1
DS	37,3	48,4		43,5	26,7			26,2
Mediana	119,5	85,0		70,5	78,0			-18,0
							Pacienți cu reducere a H ₂	10 (83%)

Fig. 3 (A)

3/6 cu Placebo prezintă reducere în hidrogen (50%)

	ZIUA 1	ZIUA 2	MEDIE	ZIUA 15	ZIUA 16	MEDIE	DIF
ID pacient	CMAX	CMAX		CMAX	CMAX		CMAX
3,06	126,0	91,0	108,5	86,0	131,0	108,5	0,0
3,10	124,0	168,0	146,0	107,0	88,0	97,5	-48,5
3,14	55,0	79,0	67,0	53,0	68,0	60,5	-6,5
3,16	98,0	123,0	110,5	123,0	151,0	137,0	26,5
3,23	58,0	113,0	85,5	79,0	99,0	89,0	3,5
4,13	58,0	69,0	63,5	25,0	38,0	31,5	-32,0
MEDIA	86,5	107,2	96,8	78,8	95,8	87,3	-9,5
SD	33,8	36,0	31,2	35,7	41,2	37,0	26,8
MEDIANA	78,0	102,0	97,0	82,5	93,5	93,3	-3,3
					Pacienți cu reducere a H ₂		3 (50%)

Fig. 3 (B)

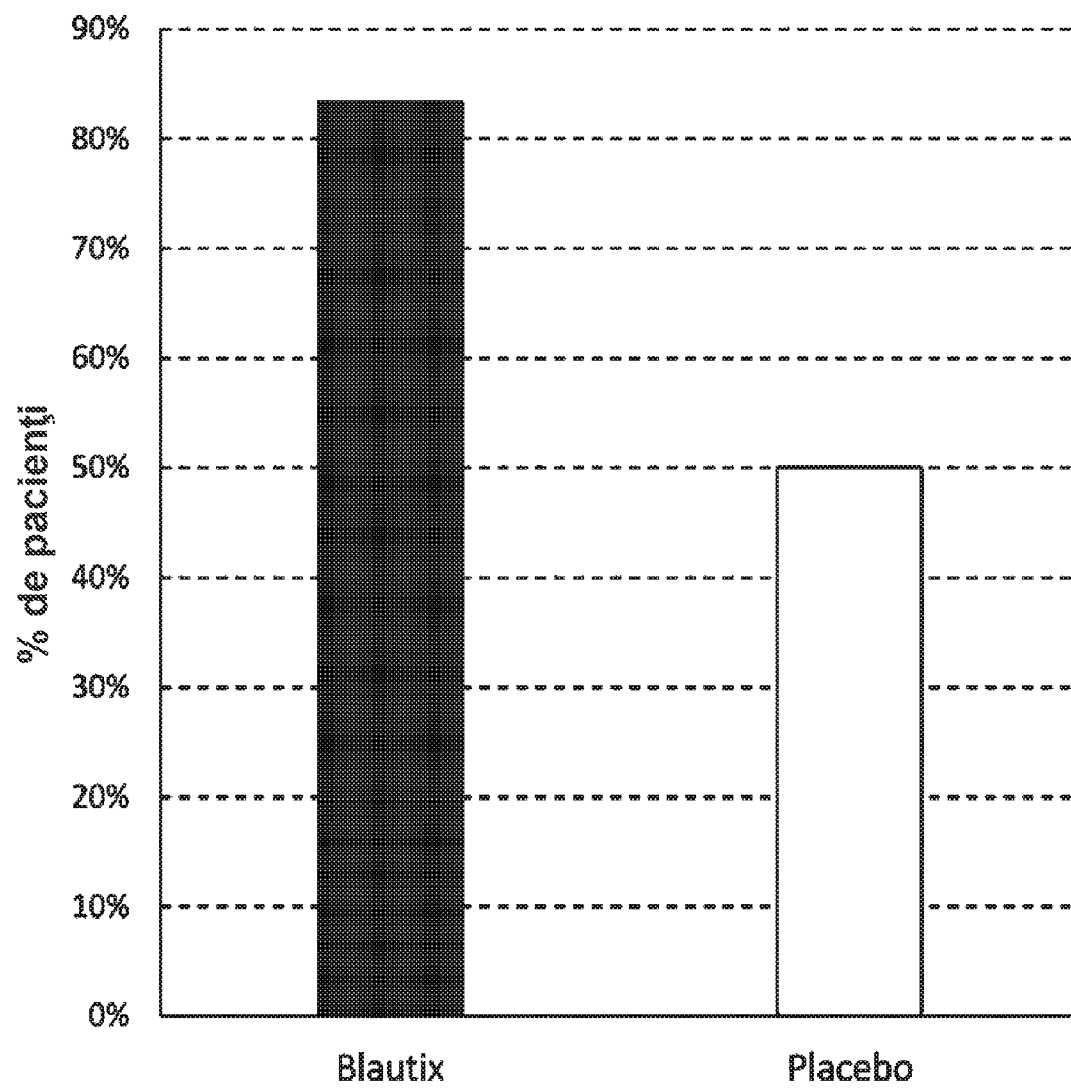


Fig. 3 (C)

Fig. 4 (A)

Hidrogen necorectat

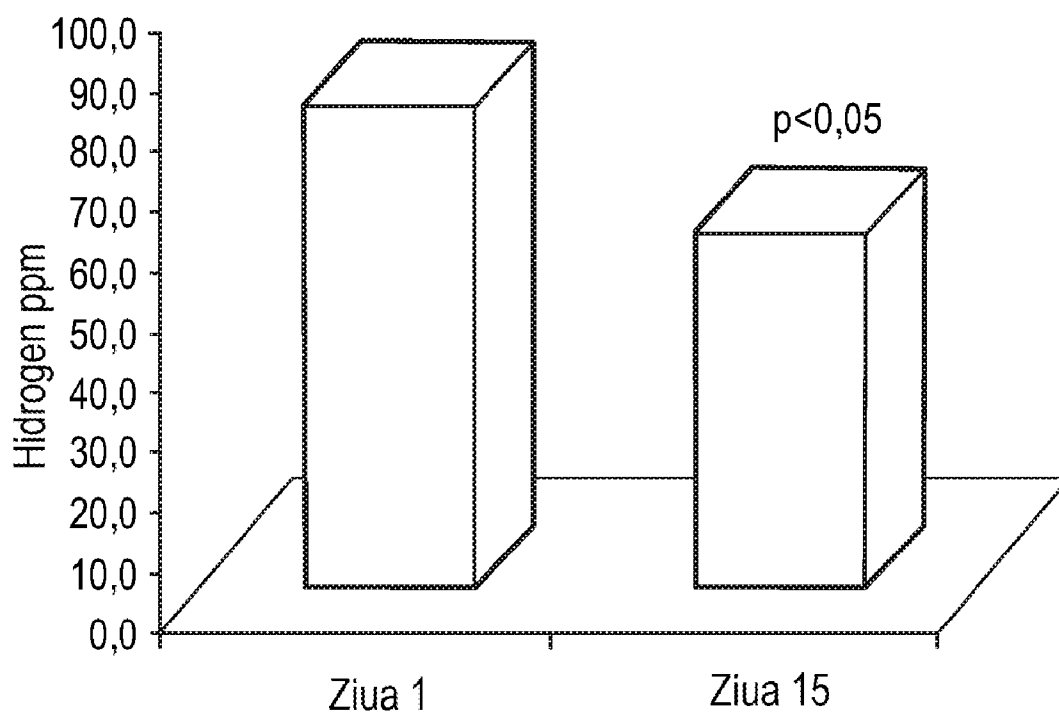


Fig. 4 (B)

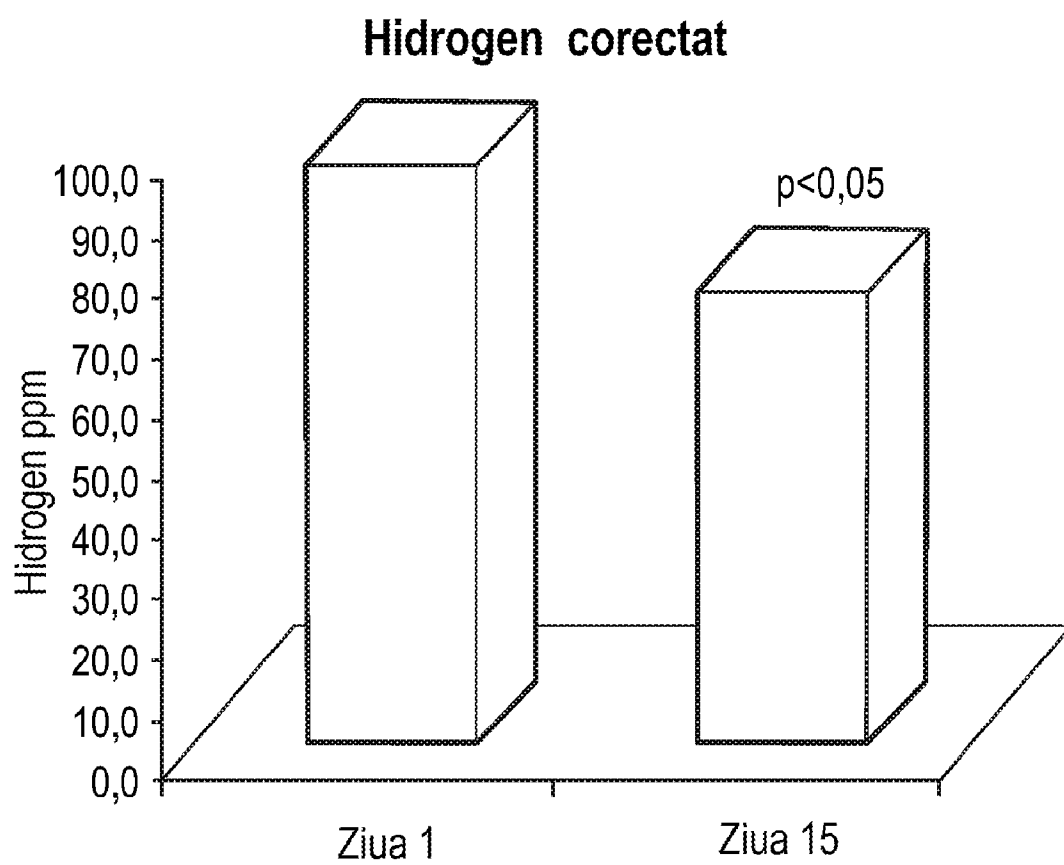


Fig. 4 (C)

Grupul PLACEBO

NUMAR	ZHUA I	ZHUA 15			H2 corectat	NUMAR	ZHUA I	ZHUA 15
ALTEATOR	CMAX	CMAX				ALTEATOR	CMAX	CMAX
306	103.3	81.9				306	126.0	86.0
308	42.3	43.3				308	55.0	58.0
310	97.6	84.3				310	124.0	107.0
314	35.0	42.4				314	55.0	53.0
316	59.0	80.9				316	98.0	123.0
323	41.1	62.2				323	58.0	79.0
413	53.2	25.0				413	58.0	25.0
		Test T unilateral	0.41620609				Test T unilateral	0.27096549
	ZHUA I	ZHUA 15					ZHUA I	ZHUA 15
MEDIA	61.7	60.0				MEDIA	82.0	75.9
SD	27.7	23.5				SD	33.1	33.5
N	7	7				N	7	7
MEDIANA	53.2	62.2				MEDIANA	58.0	79.0
MIN	35.0	25.0				MIN	55.0	25.0
MAX	103.3	84.3				MAX	126.0	123.0

Fig. 5 (A)

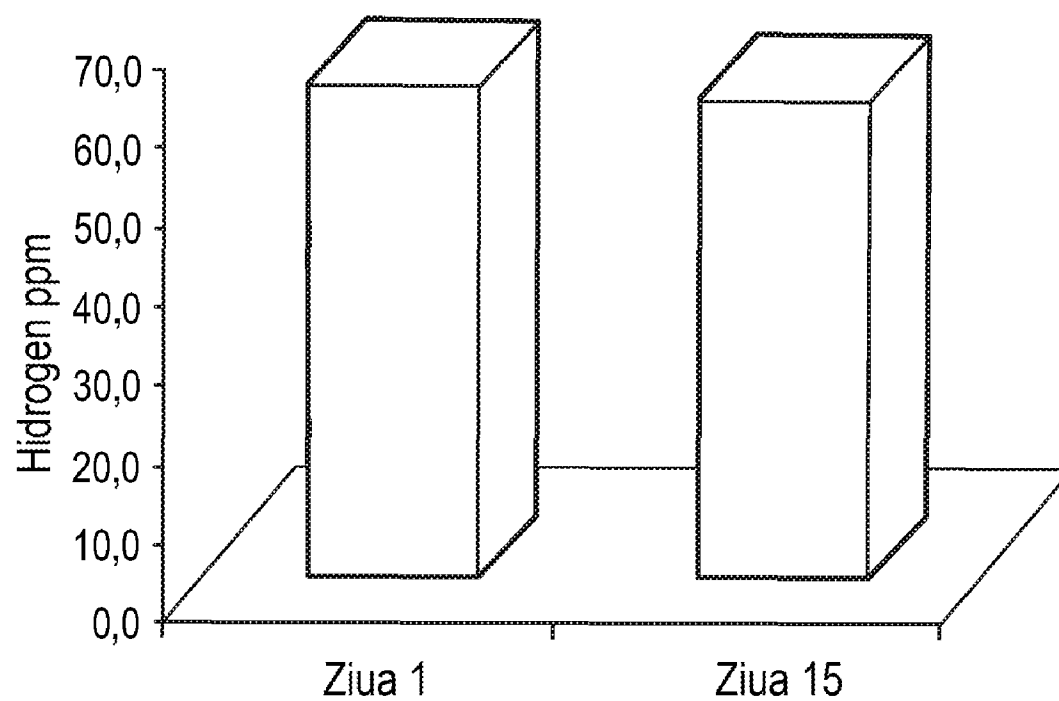
Placebo cu hidrogen necorectat

Fig. 5 (B)

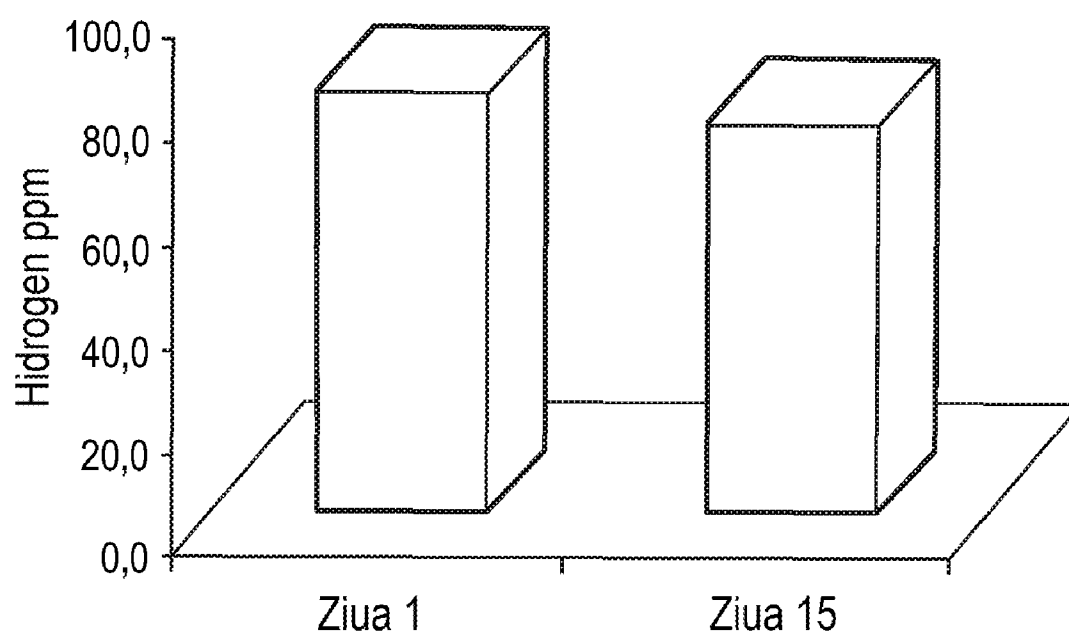
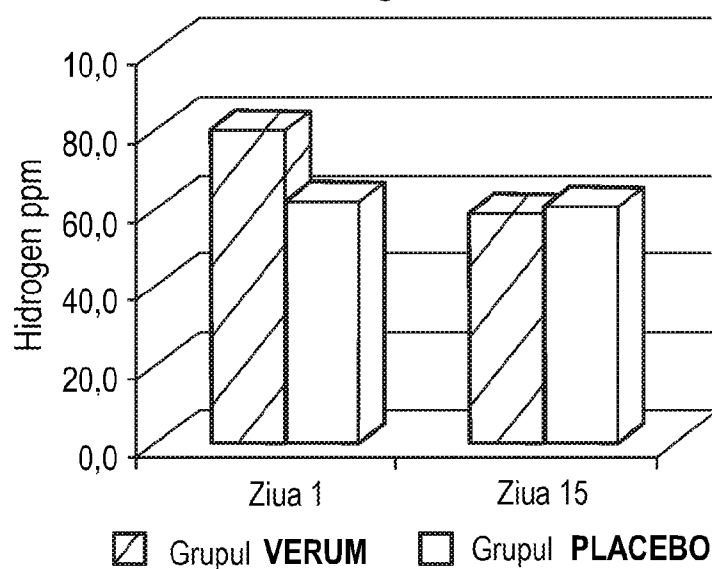
Placebo cu hidrogen corectat

Fig. 5 (C)

A

	ZIUA 1	ZIUA 15	N
Grupul VERUM	79,7	58,5	14
Grupul PLACEBO	61,7	60	7

Hidrogen necorectat**B**

	ZIUA 1	ZIUA 15	N
Grupul VERUM	96,4	75	14
Grupul PLACEBO	82	75,9	7

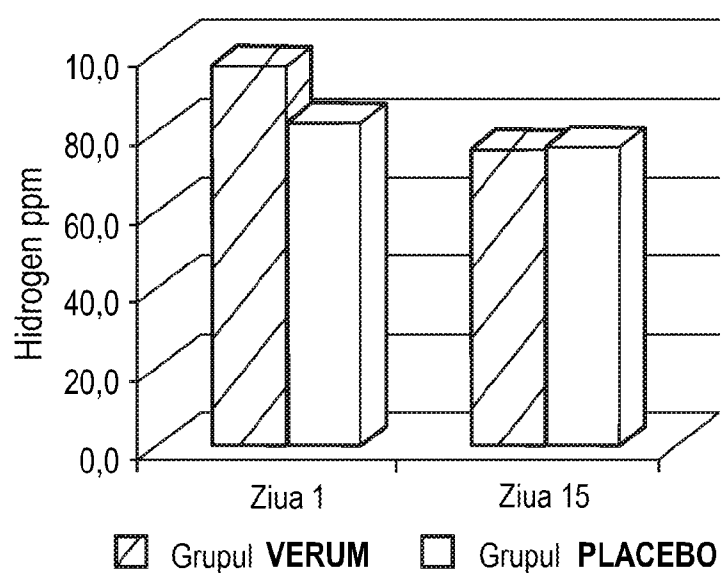
Hidrogen corectat

Fig. 6