



MD/EP 3313421 T2 2019.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3313421 (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 0470 (22) Data de depozit: 2017.07.13 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17742523.8, 2017.07.13 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3313421, 2019.03.06 (31) Numărul cererii prioritare: 201612190; 201616018; 201616016; 201703548; 201703552 (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: CROUZET Laureen, GB; HABOUZIT Chloe, FR; BERNALIER-DONADILLE Annick, FR (73) Titular: 4D PHARMA PLC, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

MD/EP 3313421 T2 2019.06.30

(54) Compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană de *Blautia hydrogenotrophica* pentru utilizare în tratamentul infecțiilor bacteriene ale tractului gastrointestinal

(57) Rezumat:

1
Invenția furnizează compoziții care cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene pentru utilizare într-o metodă de reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal.

2
Secvențe: 5
Revendicări: 15
Figuri: 15

(54) Compositions comprising a bacterial strain of *Blautia hydrogenotrophica* for use in the treatment of bacterial infections of the gastrointestinal tract

(57) Abstract:

1
The invention provides compositions comprising one or more bacterial strains for use in a method of reducing the level of *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract.

2
Sequences: 5
Claims: 15
Fig.: 15

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

5 **COMPOZIȚII CUPRINZÂND O TULPINĂ BACTERIANĂ DE BLAUTIA HYDROGENOTROPHICA PENTRU UTILIZARE ÎN TRATAMENTUL INFECȚIILOR BACTERIENE ALE TRACTULUI GASTROINTESTINAL**
Descriere

DOMENIUL TEHNIC

10

Această invenție este în domeniul compozițiilor care cuprind tulpini bacteriene izolate din tractul digestiv al mamiferelor și utilizarea unor astfel de compoziții în tratamentul bolii, așa cum s-a definit în revendicări.

15 **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 [i]. 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 [ii-iii]. 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 [iv-vi].

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 [vii-xi].

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, [xii-xv]). Un număr de tulpini, incluzând mai ales tulpinile de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor tulburări intestinale (vezi [xvi] pentru o recenzie). Tulpini din genul *Blautia* au fost propuse de aplacebosemenea 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, incluzând *Enterobacteriaceae*, pentru a preveni și reduce formarea de gaz în colon, astfel acest document sugerează că creșterea *Enterobacteriaceae spp.* în tractul gastrointestinal poate fi utilizată pentru a trata anumite boli. US'789 nu discută despre nici una dintre metodele de reducere a *Enterobacteriaceae spp.*

WO 2016/086206 sugerează că bacteriile din ordinul Clostridiales, incluzând *Enterobacteriaceae spp.*, pot fi utilizate pentru a trata sau preveni disbioza. Nu există nici o sugestie în WO'206 că reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae spp.* în tractul gastrointestinal poate fi utilizată pentru a trata boli, nici vreo sugestie referitoare la cum ar putea fi obținută o reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae spp.*

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.

REZUMATUL INVENȚIEI

5

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor asociate cu *Enterobacteriaceae*, în particular *E. coli*. În particular, inventatorii au identificat faptul că tulpinile bacteriene din genul *Blautia* pot fi eficiente pentru reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal. După cum s-a descris în exemple, administrarea orală de compoziții cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* poate reduce nivelul de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, incluzând *E. coli*, și poate trata sau preveni bolile asociate cu *Enterobacteriaceae* sau *E. coli*. 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 reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* patogene în tractul gastrointestinal.

În realizările preferate din toate aspectele invenției, *Enterobacteriaceae* este *E. coli*. Tulpina bacteriană este de *Blautia hydrogenotrophica* așa cum s-a definit în revendicări și preferabil este bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli asociate cu infecția cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecția cu *E. coli*, așa cum s-a definit în revendicări. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau a meningitei neonatale. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea infecției cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecția cu *E. coli*.

În alte realizări preferate, compozițiile invenției, cum s-au definit în revendicări, 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 a meningitei neonatale.

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea diareei. În particular, inventatorii au identificat care tulpini bacteriene din genul *Blautia* pot fi eficiente pentru reducerea diareei. După cum s-a descris în exemple, administrarea orală de compoziții cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* poate reduce diareea la pacienții care au sindrom de colon iritabil (IBS).

Tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia hydrogenotrophica*. Tulpinile strans 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 reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal. 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 unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutici.

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.

Divulgarea furnizează o compoziție de vaccin cuprinzând compoziția cum s-a descris mai sus.

Suplimentar, invenția furnizează o metodă de reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal și prin urmare de tratare sau prevenire a bolilor asociate cu *Enterobacteriaceae*, cuprinzând administrarea unei compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, cum s-a definit în revendicări.

60

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

- Figura 1:** Măsurarea populației de BH prin qPCR, arătând o creștere a BH în zilele 14 și 28 pentru șobolanii cu HIM cu IBS care primesc liofilizatul de BH.
- Figura 2:** Studiu al dozajului la șobolanii cu HIM - cuantificare cu RT-PCR a *B. hydrogenotrophica* în mostrele de fecale ale șobolanilor cu HIM sănătoși care primesc o concentrație diferită din speciile bacteriene.
- Figura 3:** Durata de tranzit a *B. hydrogenotrophica* după administrare orală (10^9 /zi) la șobolani cu HIM sănătoși.
- Figura 4:** Comparatie a nivelurilor de *B. hydrogenotrophica* găsite în mostrele fecale și cecale ale șobolanilor cu HIM sănătoși (cuantificare cu RT-PCR) după o administrare de 14 zile - *B. hydrogenotrophica* administrată la 10^{10} /zi/șobolan.
- Figura 5:** Efectul administrării de *B. hydrogenotrophica* asupra compoziției microbiotei fecale a șobolanilor asociați cu microbiota omului sănătos. Administrare de 10^{10} *B. hydrogenotrophica* / zi timp de 14 zile (rezultate de la analiza qPCR a 2 microbiote fecale de om sănătos (20 de șobolani cu HIM)).
- Figura 6:** Impactul administrării de *B. hydrogenotrophica* asupra populațiilor microbiene la șobolanii cu HIM cu IBS.
- Figura 7a:** Modificare a nivelurilor de *Blautia hydrogenotrophica* din micro-biota pacientului în timpul și după tratamentul cu Blautix.
- Figura 7b:** Modificare a nivelurilor de *Enterobacteria* din microbiota pacientului în timpul și după tratamentul cu Blautix.
- Figura 8:** 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 8a**) și pacienții cu IBS tratați cu placebo (**Figura 8b**). **Figura 8c** 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 9a:** 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 9b:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen necorectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul de tratament cu Blautix; **Figura 9c:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen corectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul de tratament cu Blautix.
- Figura 10a:** 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 10b:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen necorectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul cu placebo; **Figura 10c:** grafic care compară rezultatele testului respirației pentru hidrogen corectate medii pentru ziua 1 și ziua 15 pentru grupul cu placebo.
- Figura 11:** 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 11a:** hidrogen necorectat; **Figura 11b:** hidrogen corectat).
- Figura 12:** Evaluarea cu qPCR a populației de *B. hydrogenotrophica* în mostrele de fecale ale șobolanilor HMA cu IBS tratați sau nu cu o compoziție cuprinzând *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) timp de 28 de zile.
- Figura 13:** Enumerarea bacteriilor din mostrele de fecale ale șobolanilor HMA cu IBS după administrarea de *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) versus soluția de control.
- Figura 14:** Modificări ale simptomelor pacientului în timpul perioadei de dozare (zilele 1-16) a studiului clinic de Fază I.
- Figura 15:** Modificări ale simptomelor pacientului în timpul perioadei de eliminare a studiului clinic de Fază I.

DIVULGAREA INVENȚIEI

55 *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 aceste specii sunt utile pentru reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, în particular *E. coli*. Tulpinile bacteriene sunt din

speciile *Blautia hydrogenotrophica*. Cea mai preferată este bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

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 [xvii]. *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 H_2/CO_2 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 [xvii] și [xviii]. 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 strâns înrudite cu tulpina testată în exemple sunt de asemenea așteptate să fie eficiente pentru reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, în particular *E. coli*. 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 reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, în particular *E. coli*. 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)_n, sau REP sau [xx]. 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 10507/14294. 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, [xxi]). 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, 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 *Enterobacteriaceae* 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 reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, în particular *E. coli*. 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 *Enterobacteriaceae* 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.

Utilizări terapeutice

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal. Nivelurile crescute de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal sunt asociate cu numeroase stări patologice și boli, și exemplele demonstrează că compozițiile invenției pot fi eficiente pentru reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal.

În realizările preferate din toate aspectele invenției, *Enterobacteriaceae* este *E. coli*. Prin urmare, preferabil compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelului de *E. coli* în tractul gastrointestinal.

În anumite realizări, *Enterobacteriaceae* este o tulpină patogenă, cum ar fi *E. coli* O157:H7, O104:H4, O121, O26, O103, O111, O145, O104:H21, sau O104:H4.

În realizări alternative, *Enterobacteriaceae* este o tulpină comensală sau ne-patogenă. Nivelurile crescute ale unor astfel de *Enterobacteriaceae* pot contribui la afecțiuni cum ar fi IBS și boala Crohn, și exemplele demonstrează că compozițiile invenției pot avea un efect de reducere asupra *Enterobacteriaceae* în contextul IBS.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei boli asociate cu infecția cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecția cu *E. coli*. În anumite

realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau a meningitei neonatale. În astfel de realizări *Enterobacteriaceae* poate fi o tulpină patogenă.

5 În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea 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 a meningitei neonatale. În astfel de realizări, *Enterobacteriaceae* poate fi o tulpină comensală sau ne-patogenă.

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

15 În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea infecției cu *Enterobacteriaceae*, cum ar fi infecția cu *E. coli*. În realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea infecției tractului gastrointestinal, și în particular a cecumului. În astfel de realizări *Enterobacteriaceae* poate fi o tulpină patogenă.

20 În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus în materia fecală a subiectului. În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus într-o mostră de materie fecală de la subiect. În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus în intestinul distal al subiectului. În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus în cecum. În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus în colon. În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus în rect. În unele realizări, nivelul de *Enterobacteriaceae* este redus în intestinul mic.

25 În realizările preferate, 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 în tratamentul infecțiilor cauzate de *Enterobacteriaceae* patogene.

30 În realizările preferate, 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 în tratamentul infecției cu *E. coli*.

35 În realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* din tractul gastrointestinal, preferabil nivelul de *E. coli*, în tratamentul sau prevenirea unei boli asociate cu niveluri crescute de *Enterobacteriaceae*, cum ar fi IBS, boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională, diareea, gastroenterita, infecția tractului urinar sau meningita neonatală. *Enterobacteriaceae* și în particular *E. coli* sunt cunoscute a fi potențiale declanșatoare pentru, sau cunoscute că exacerbează, boala Crohn și colita ulcerativă [xxii-xxiv], astfel încât efectul prezentat în exemplele pentru compozițiile invenției poate fi benefic în tratamentul acestor afecțiuni.

40 În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea IBS, bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale prin reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal.

45 În realizările preferate, compozițiile invenției cuprind bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 și sunt pentru utilizare în reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* din tractul gastrointestinal în tratamentul bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, sau cel mai preferabil IBS. În alte realizări preferate, compozițiile invenției cuprind bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 și sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, sau cel mai preferabil IBS prin reducerea nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal.

50 În anumite realizări, compoziția este administrată în combinație cu un antibiotic, cum ar fi o fluorochinolonă, azitromicină, ciprofloxacina sau rifaximină. În anumite realizări, compoziția este administrată în combinație cu un tratament pentru deshidratare cum ar fi o soluție orală de rehidratare. Compoziția invenției poate fi administrată în același timp cu tratamentul cu antibiotic sau pentru deshidratare, sau secvențial cu tratamentul cu antibiotic sau pentru deshidratare.

55 În anumite realizări, compozițiile sunt pentru utilizare la pacienții care prezintă, sau este de așteptat să prezinte, niveluri crescute de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal, de exemplu, atunci când se compară cu un subiect sănătos, sau o populație de subiecți sănătoși.

60

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de tratare, prevenire sau reducere a colonizării tractului gastrointestinal de către *Enterobacteriaceae*.

În unele realizări, compoziția invenției este pentru utilizare într-o metodă de reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal la un subiect care are 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 prezintă sau care este așteptat să prezinte un nivel crescut de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal. Subiectul este preferabil un subiect diagnosticat ca având IBS, boală Crohn, colită ulcerativă, dispepsie funcțională, diaree, gastroenterită, infecție a tractului urinar sau meningită neonatală și/sau o infecție cauzată de *Enterobacteriaceae* patogene, de exemplu, *E. coli*. Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție a invenției reduce nivelul de hidrogen detectat în testul respirației pentru hidrogen. Corespunzător, nivelurile de hidrogen sunt preferabil evaluate utilizând un test al respirației pentru hidrogen. Testul respirației pentru hidrogen este bine cunoscut în domeniu și astfel persoana calificată va ști cum să efectueze un astfel de test. În unele realizări, pacientului îi este administrată lactuloză ca substrat pentru test.

Testul respirației pentru hidrogen este de asemenea o unealtă utilă pentru monitorizarea eficacității sau eficacității probabile de reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* și de tratament sau prevenire utilizând o compoziție a invenției. De exemplu, o reducere a nivelului de hidrogen detectat în respirația unui subiect după tratamentul cu o compoziție a invenției poate indica faptul că tratamentul are un efect de reducere, 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 cu o compoziție a invenției și prin urmare evaluarea eficacității sau eficacității probabile de reducere, tratament sau prevenire. De exemplu, nivelurile de hidrogen pot fi monitorizate de una sau mai multe (de exemplu 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 indică eficacitatea sau eficacitatea probabilă a reducerii, tratamentului sau prevenirii. 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 Cmax de hidrogen indică faptul că reducerea, tratamentul sau prevenirea este eficientă sau probabilă 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 reducerea, tratamentul sau prevenirea este probabilă să fi fost eficientă. Testul respirației pentru hidrogen este un test standard și astfel nivelurile predeterminate sunt cunoscute în domeniu.

Tratamentul sau prevenirea se poate referi la, de exemplu, o ameliorare a severității simptomelor sau o reducere a frecvenței exacerbărilor sau a gamei de declanșatoare care sunt o problemă pentru pacient.

Nivelurile de *Enterobacteriaceae* pot fi detectate în fecalele de la un pacient, utilizând tehnici standard, cum ar fi tehnicile qPCR utilizate în exemple.

Modurile 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, intranasal, 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 zilnică furnizează o colonizare cu succes și beneficii clinice.

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 nivelurile ridicate de *Enterobacteriaceae* 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 niveluri ridicate de *Enterobacteriaceae* sau o boală sau afecțiune asociată cu niveluri ridicate de *Enterobacteriaceae*, sau care a fost identificat ca fiind la risc de a avea niveluri ridicate de *Enterobacteriaceae*. Compozițiile pot fi de asemenea administrate ca o măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea nivelurilor ridicate de *Enterobacteriaceae* 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, caini, 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.

Compozițiile

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.

Preferabil, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine-stabilită și îndrumarea relevantă este disponibilă în, de exemplu, referințe [xxv-xxvii]. Exemplele demonstrează că compozițiile liofilizate sunt eficiente în mod special.

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 inactivată 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 omorâtă, de exemplu, nu a fost omorâtă 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.

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

5 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 intr-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 [xxviii-xxix].

10 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.

20 Compoziția poate fi formulată ca probiotic.

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

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.

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

În anumite 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.

55 Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemplele de astfel de excipienți adecvați pot fi găsite în referința [xxx]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referința [xxxi]. 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, cum au fost definite în revendicări, 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*, 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*, 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 hydrogenotrophica* cum s-a definit în revendicări ca parte a unui consorțiu microbian. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană *Blautia hydrogenotrophica* este prezentă în combinație cu una sau mai multe (de exemplu cel puțin 2, 3, 4, 5, 10, 15 sau 20) alte tulpini bacteriene din alt gen cu care 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, cea una sau mai multe tulpini bacteriene de *Blautia* reprezintă singurul agent activ (singurii agenți activi) terapeutic într-o compoziție a invenției. 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 aceasta este viabilă și capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul.

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.

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprin-zand: o tulpină bacteriană cum s-a definit în revendicări; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a reduce nivelurile de *Enterobacteriaceae* și/sau a trata o tulburare asociată cu niveluri ridicate de *Enterobacteriaceae*

atunci când se administrează la un subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este asociată cu niveluri ridicate de *Enterobacteriaceae*, cum ar fi boala Crohn, colita ulcerativă, dispepsia funcțională sau, mai preferabil, IBS, sau diareea, gastroenterita, infecția tractului urinar sau meningita neonatală.

5 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.

10 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.

15 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.

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

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 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.

55 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.

60 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 la 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 [xxxii]). 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.

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 [xxxiii-xxxv].

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).

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 [xxxvi- xliii], 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. [xlv]. 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. [xlv].

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 - Administrarea de inocul bacterian la șobolanii care găzduiesc microbiotă intestinală de IBS

Rezumat

Șobolanii au fost inoculați cu microbiota fecală de la un subiect uman cu IBS. Șobolanilor le-au fost administrate apoi compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției și s-a analizat colonizarea cu *Blautia hydrogenotrophica*.

Tulpină

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

Compoziții și administrare

Liofilizat de BH - administrat prin gavaj oral
Soluție de control administrată prin gavaj oral

Șobolani

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

Design-ul studiului

Ziua -14 - șobolani inoculați cu microbiota intestinală umană de la un subiect cu IBS
Zilele 0 până la 28 - doză zilnică din liofilizatul de BH, sau soluția de control
Zilele 0, 14 și 28 - qPCR a populației de BH în mostrele de fecale

Rezultate

Figura 1 prezintă rezultatele unei analize qPCR a populației de BH în mostrele de fecale de la șobolanii cărora li s-a administrat soluție de control (IBS) sau liofilizat de BH (IBS+BH). O creștere a populației de BH a fost observată în zilele 14 și 28 la șobolanii care primesc liofilizatul de BH, care confirmă colonizarea cu succes.

Concluzii

Administrarea compozițiilor cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* a condus la colonizarea cu succes.

Exemplul 2 - Administrarea de liofilizat bacterian la șobolani sănătoși și efectul pe Enterobacteriaceae

Efectele administrării unui liofilizat din tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 asupra șobolanilor cu HIM sănătoși au fost studiate și rezultatele sunt raportate în Figurile 2-5. Alte detalii referitoare la experimente sunt furnizate mai sus în descrierile figurilor. Figura 2 arată că o doză adecvată pentru BH la șobolani este de 10^9 celule per zi sau mai mare. Figura 3 arată că în aceste experimente BH nu a colonizat permanent tractul digestiv al șobolanului. Figura 4 arată că BH este găsită în primul rând în cecum. Surprinzător, Figura 5 arată că administrarea de BH induce o reducere semnificativă statistic a *Enterobacteriaceae* din fecalele de șobolan după cum s-a detectat prin qPCR.

Exemplul 3 - Administrarea de liofilizat bacterian la un model la șobolan de IBS

Efectele administrării unui liofilizat din tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 asupra unui model la șobolan de IBS au fost investigate suplimentar. Șobolani fără germeni au fost inoculați cu mostre de fecale de la pacienți C-IBS (cu constipație) sau U-IBS (nesubtipați). Rezultatele sunt raportate în Figura 6 și detalii suplimentare referitoare la experimente sunt furnizate mai sus în descrierile figurilor. Figura 6 confirmă că administrarea liofilizatului de BH determină o reducere semnificativă statistic a *Enterobacteriaceae*, care este în principal *E. coli*. După cum era de așteptat, o creștere a BH este de asemenea observată.

Exemplul 4 - Compararea *Blautia hydrogenotrophica* din microbiota pacientului

A fost efectuat un studiu clinic de Fază I în care s-a administrat *Blautia hydrogenotrophica* („Blautix“, tulpină depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294) la pacienții umani care au sindrom de colon iritabil (IBS). Pacienților le-a fost administrat Blautix în timpul unei perioade de dozare (zilele 1-16) cu perioada de eliminare fiind ziua 19-23. S-a descoperit că Blautix este atât sigur cât și bine tolerat. *Blautia hydrogenotrophica* din microbiota pacientului (Blautix) au fost măsurate în ziua 1, ziua 16 și la finalul studiului (EOS) cu următoarele rezultate:

Tabelul 1:

Pacient	Tratament	Blautix Ziua 1		Blautix Ziua 16		Blautix EOS	
		Medie	DS	Medie	DS	Medie	DS
Placebo	Sănătoși	4,30E+07	8,40E+07	4,79E+07	7,63E+07	3,59E+07	6,23E+07
Blautix	Sănătoși	2,92E+07	2,25E+07	6,35E+07	1,02E+08	2,58E+07	3,34E+07
Placebo	IBS	3,58E+07	3,45E+07	2,44E+07	3,13E+07	2,09E+07	2,47E+07
Blautix	IBS	3,17E+07	6,28E+07	8,53E+07	1,57E+08	3,71E+07	5,56E+07

Analiza prezintă tendințele nivelurilor de *Blautia hydrogenotrophica* în mostrele din fecale ale pacienților (vezi Figura 7a). Participanții care primesc Blautix au niveluri crescute de bacterii în mostrele lor din fecale după perioada de dozare (ziua 16). Aceasta demonstrează livrarea cu succes a Blautix la nivelul intestinului. Nivelurile revin la normal după perioada de eliminare (sfârșitul studiului; EOS). Astfel Blautix nu colonizează permanent intestinul o dată ce dozarea încetează. Ambele observații sunt în concordanță cu modelul pre-clinic.

Exemplul 5 - Compararea *Enterobacteria* din microbiota pacientului .

Enterobacteriile din microbiota pacientului au fost măsurate de asemenea în timpul studiului clinic de Fază I în ziua 1, ziua 16 și la finalul studiului cu rezultate după cum urmează:

Pacient	Tratament	Enterobacteria Ziua 1		Enterobacteria Ziua 16		Enterobacteria EOS	
		Medie	DS	Medie	DS	Medie	DS
Placebo	Sănătoși	5,89E+08	1,00E+09	3,32E+08	6,26E+08	2,85E+08	4,28E+08
Blautix	Sănătoși	9,96E+08	1,06E+09	4,87E+08	6,64E+08	2,70E+08	3,76E+08
Placebo	IBS	7,85E+08	1,28E+09	3,01E+08	4,92E+08	2,45E+09	2,45E+09
Blautix	IBS	8,38E+09	1,96E+10	1,12E+09	1,45E+09	6,17E+08	9,91E+08

Analiza prezintă tendințele nivelurilor de Enterobacteria în mostrele din fecale ale pacienților (vezi Figura 7b). Pacienții cu IBS tratați cu Blautix au avut o reducere în Enterobacteria. Aceasta este în concordanță cu observațiile din modelul preclinic.

Exemplul 6 - 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-răspunzători. 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.

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 8a și 8c). În contrast, 3 din 6 (50%) pacienți care au primit placebo au avut niveluri reduse de hidrogen (Figura 8b și 8c).

Figura 9 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 H₂ 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 H₂ 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 10). Astfel, media pentru grupul de 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 11).

Exemplul 7 - 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 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.

Exemplul 8 - Abilitatea *B. hydrogenotrophica* de a modifica microbiota la modelul șobolan asociat cu microbiotă umană (șobolan HMA)

Rezumat

Grupuri de 16 șobolani fără germeni (cuprinzând 8 șobolani în grupul de control și 8 șobolani în grupul de tratament) au fost inoculate cu microbiota fecală de la un subiect uman cu IBS (șobolani HMA cu IBS). Trei experimente succesive au fost efectuate utilizând mostre de fecale de la 3 pacienți cu IBS diferiți. Alte două grupuri de șobolani ($n = 10$) au fost inoculate cu mostre de fecale de subiect sănătos ($n=2$ subiecți; 2 grupuri de șobolani HMA sănătos) ca control. Astfel, au fost 24 de șobolani asociați cu microbiotă IBS (control), 24 de șobolani asociați cu microbiotă IBS tratați cu Blautix și 20 de șobolani asociați cu microbiotă sănătoasă. La jumătate din șobolanii HMA cu IBS le-a fost apoi administrată timp de 28 de zile o compoziție cuprinzând tulpina bacteriană de *B. hydrogenotrophica* conform invenției, în timp ce cealaltă jumătate de animale a primit o soluție de control. În ziua 28 după administrare, au fost analizate nivelurile microorganismelor din microbiota fecală, anterior descoperite ca fiind afectate la pacienții cu IBS.

Tulpină

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

Compoziție și administrare

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

Soluția de control a fost soluția minerală sterilă care a fost administrată zilnic (2 ml per șobolan) prin gavaj oral la grupul de control al șobolanilor HMA cu IBS.

Șobolani

Șobolani Fisher masculi fără germeni (în vârstă de 10 săptămâni) au fost inoculați cu microbiotă fecală umană de la un subiect cu IBS (șobolani HMA cu IBS). Șaisprezece șobolani au fost inoculați cu același inocul de fecale umane. Trei experimente succesive au fost efectuate cu mostre de fecale de la trei subiecți cu IBS diferiți. Două alte grupuri de zece șobolani au fost inoculate cu mostră de fecale de la 2 subiecți sănătoși (grupuri de control de normo-sensibilitate).

Design-ul studiului

Ziua -14 - Inocularea șobolanilor fără germeni cu microbiotă fecală umană.
Zilele 0 până la 28 - Doză zilnică din liofilizatul de BH (grupul de testare), sau soluția de control (grupul de control) prin gavaj oral
Zilele 0, 14 și 28 - Colectarea mostrelor de fecale pentru analiza microbiană: qPCR pentru evaluarea populației de BH și a altor grupuri comensale de microorganisme și enumerarea grupurilor funcționale de microorganisme utilizând mediul selectiv și metoda strict anaerobă.

Rezultate

Figura 12 prezintă rezultatele analizei qPCR a populației de *B. hydrogeno-trophica* în mostrele de fecale de la șobolanii HMA cu IBS care primesc soluție de control sau liofilizat de BH. O creștere semnificativă a populației de BH a fost observată la sfârșitul perioadei de administrare (D 28) la șobolanii care primesc liofilizatul de BH, care confirmă distribuirea cu succes a BH în colon.

Figura 13 raportează efectul administrării de *B. hydrogenotrophica* asupra anumitor microorganisme din microbiota fecală, descoperite anterior ca fiind afectate la pacienții cu IBS. Nivelul speciilor de *Enterobacteriaceae* a scăzut după administrarea de *B. hydrogenotrophica*.

Concluzii

Administrarea de *Blautia hydrogenotrophica* a condus la o reducere a *Enterobacteriaceae*.

Exemplul 9 - Modificări ale simptomelor pacientului în timpul studiului clinic de Fază I

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 care au sindrom de colon iritabil (IBS). Pacienților le-a fost administrat Blautix în timpul unei perioade de dozare (zilele 1-16) cu perioada de eliminare fiind ziua 19-23. Blautix a fost găsit ca fiind atât sigur cât și bine tolerat. Au fost monitorizate patru simptome, dintre care unul a fost diareea. 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 14 și 15.

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 14). Îmbunătățirea simptomelor, dintre care unul a fost diareea, susține utilizarea de Blautix pentru tratarea sau prevenirea diareei.

50% din pacienții care au primit placebo au raportat o îmbunătățire a simptomelor (Figura 14). 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 învățăminte 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 15). Agravarea simptomelor, dintre care unul este diareea, după încetarea dozării cu Blautix prin urmare susține de asemenea utilizarea de Blautix în tratarea sau prevenirea diareei.

5 Secvențe

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

10

```

1  tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacgggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccgggtgg
181 tatgagatgg acccgcgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaattattgca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggatgtaaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggg
421 acctgactaa gaagccccg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaaag gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt tttcttgag tgccggagag
601 gtaagcggaa ttctagtgt agcgggtaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcggt tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgtatgaatac taggtgttg ggagcaaacg
781 tcttcgggtg cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggaccgcac aagcggtgga gcatgtggt taattcgaag
901 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct gtgagatgtt
1021 ggggttaagt ccgcaacgag cgcaaccct atctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaagg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccc
1321 ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc

```

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

15

```

1  caagtgcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
61  gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
121 tgctaataacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
181 aagatggacc cgcgttggat tagcttgttg gtggggtaac gggccacca ggcgacgacg
241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccg
361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtacc
421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccggt gtaatacgta gggggcaagc
481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggg gtggcaagtc tgatgtgaaa
541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtoat acttgagtgc cggaggggta
601 agcgggaatt ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
721 agataccctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca

```

781 ttccggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
 901 acgcgaagaa ccttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatctttcc
 961 ttccgggacag gcgagacagg tgggtgcatgg ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcaact
 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cggatgaatac gttcccgggt
 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
 1381 tgcaaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

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

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
 CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTCATACAGGGGGATAACA
 GTTGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
 GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
 ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
 CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAATGACGG
 TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
 AAATGTTTTTCTTGAGTGCAGGAGAGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGCTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGAGCAAACGCAA
 TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTTATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTCTGAATGGAACCTT
 TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCGTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAAATG
 5 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

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

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCTTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG

CGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
 GTGGACTGCATTGGAAACGTGCATACCTTGAGTGCCGGAGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACCTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTTCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACCGTGCTACAAT
 GGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCCGACTGTAGTCTGC
 AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

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

5

1 gatgaacgct ggcgggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
 61 tttcgggttga agttttctat tgactgagtgc gcgacgggt gagtaacgag tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt
 181 cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccccc caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccacactc ctacgggagg cagcagtgag gaatatgca
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtaagga agaagtatct cggtagtaa
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgcaggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaagcgggcc tgcgtgacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaaag cattcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgca
 901 caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacggaa gaaccttacc aaatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca
 1021 tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc 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

REFERINȚE

10

[i] Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol. 9(4):279-90.

[ii] Eckburg et al. (2005) Science. 10;308(5728):1635-8.

[iii] Tap et al. (2009), Environ Microbiol, 11(10):2574-84.

15

[iv] Macpherson et al. (2001) Microbes Infect. 3(12):1021-35

[v] Macpherson et al. (2002) Cell Mol Life Sci. 59(12):2088-96.

[vi] Mazmanian et al. (2005) Cell 15;122(1):107-18.

[vii] Frank et al. (2007) PNAS 104(34):13780-5.

[viii] Scanlan et al. (2006) J Clin Microbiol. 44(11):3980-8.

20

[ix] Kang et al. (2010) Inflamm Bowel Dis. 16(12):2034-42.

- [x] Machiels et al. (2013) Gut. 63(8):1275-83.
 [xi] Lopetuso et al. (2013), Gut Pathogens, 5: 23
 [xii] WO 2013/050792
 [xiii] WO 03/046580
 5 [xiv] WO 2013/008039
 [xv] WO 2014/167338
 [xvi] Lee și Lee (2014) World J Gastroenterol. 20(27): 8886-8897.
 [xvii] Liu et al. (2008) Int J Syst Evol Microbiol 58, 1896-1902.
 [xviii] Bernalier et al. (1996) Arch. Microbiol. 166 (3), 176-183.
 10 [xx] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.
 [xxi] Srůtkova et al. (2011) J. Microbiol. Methods, 87(1):10-6.
 [xxii] Darfeuille-Michaud et al. (2004) Gastroenterology 127(2):412-21.
 [xxiii] Strus et al. (2015) Cent Eur J Immunol.40(4):420-30.
 [xxiv] Petersen et al. (2015) Scand J Gastroenterol.;50(10):1199-207.
 15 [xxv] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) J. Gen. Appl. Microbiol., 54, 9-24.
 [xxvi] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. de Day & McLellan, Humana Press.
 [xxvii] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.
 [xxviii] Mitropoulou et al. (2013) JNutr Metab. (2013) 716861.
 [xxix] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
 20 [xxx] Handbook of Pharmaceutical Excipients, ediția a 2-a, (1994), editată de A Wade și PJ Weller
 [xxxi] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [xxxii] US 2016/0067188
 [xxxiii] Handbook of Microbiological Media, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 [xxxiv] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera,
 25 Academic Press
 [xxxv] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
 [xxxvi] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
 [xxxvii] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., ed., 1998, Academic Press).
 30 [xxxviii] Methods In Enzymology (S. Colowick și N. Kaplan, ed., Academic Press, Inc.)
 [xxxix] Handbook of Experimental Immunology, Volumele I-IV (D.M. Weir și C.C. Blackwell, ed., 1986, Blackwell Scientific Publications)
 [xl] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 35 [xli] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [xlii] Ausubel et al. (ed.) (2002) Short protocols in molecular biology, ediția a 5-a (Current Protocols).
 [xlili] PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a 2-a (Newton & Graham ed., 1997, Springer Verlag)
 40 [xliv] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., ed., 1987) Supliment 30
 [xlv] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> 4D PHARMA PLC

<120> COMPOZIȚII CUPRINZÂND TULPINI BACTERIENE

<130> P068629WO

<141> 2017-07-13

<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
gcggacgggt	gagtaacgcg	tgggtaacct	gcctcataca	gggggataac	agttggaaac	120
ggctgctaata	accgcataag	cgacacggtat	cgcatgatac	agtgtgaaaa	actccggtgg	180
tatgagatgg	acccgcgtct	gattagctag	ttggaggggt	aacggccccc	caaggcgacg	240
atcagtagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gcccagactc	300
ctacggggagg	cagcagtgagg	gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	360
gcgtgaagga	agaagtatct	cgggtatgta	acttctatca	gcagggaaga	aaatgacggg	420
acctgactaa	gaagcccccg	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtataac	gtagggggca	480
agcgttatcc	ggatttactg	ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggaagagcaa	gtctgatgtg	540
aaagcctggg	gcttaacccc	aggactgcat	tggaaactgt	ttttcttgag	tgccggagag	600
gtaagcggaa	ttcctagtgt	agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	660
gaaggcggct	tactggacgg	taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	720
attagataacc	ctggtagtcc	acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgttgg	ggagcaaagc	780
tcttcgggtgc	cgcagcaaac	gcaataagta	ttccacctgg	ggagtacggt	cgcaagaatg	840
aaactcaaaag	gaattgacgg	ggacccgcac	aagcggtgga	gcatgtggtt	taattcgaag	900
caacgcgaag	aaccttacca	agtcttgaca	tcgatctgac	cggttcgtaa	tggaaaccttt	960
ccttcggggac	agagaagaca	ggtggtgcat	ggttgctcgtc	agctcgtgtc	gtgagatgtt	1020
gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaaccctt	atcctcagta	gccagcaggt	gaagctgggc	1080
actctgtgga	gactgccagg	gataacctgg	aggaaggcgg	ggacgacgtc	aaatcatcat	1140
gccccttatg	atttgggcta	cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaaggg	aagcgagccc	1200
gcgaggggga	gcaaattcca	aaaataacgt	cccagttcgg	actgcagtct	gcaactcgac	1260
tgacacgaagc	tgggaatcgct	agtaatcgcg	aatcagaatg	tcgcgggtgaa	tacgttccccg	1320
ggtcttgtac	acaccgcccg	tcacaccatg	ggagtcagta	acgcccgaag	tc	1372

<210> 2

<211> 1438

<212> ADN

<213> *Blautia wexlerae*

<220>

<221> n

<222> 19

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

<400> 2

caagtcgaac	gggaattant	ttattgaaac	ttcggctcgat	ttaattta	tctagtggcg	60
gacgggtgag	taacgcgtgg	gtaacctgcc	ttatacaggg	ggataaacagt	cagaaatggc	120
tgctaataacc	gcataagcgc	acagagctgc	atggctcagt	gtgaaaaact	ccggtgggtat	180
aagatggacc	cgcgttgat	tagcttgttg	gtggggtaac	ggcccaccaa	ggcgacgatc	240
catagccggc	ctgagaggg	gaacggccac	attgggactg	agacacggcc	cagactccta	300
cgggagggcag	cagtggggaa	tattgcacaa	tgggggaaac	cctgatgcag	cgacgcccg	360
tgaagggaaga	agtatctcgg	tatgtaaact	tctatcagca	gggaagatag	tgacgggtacc	420
tgactaagaa	gccccggcta	actacgtgcc	agcagccgcg	gtaatacgt	gggggcaagc	480
gttatccgga	tttactgggt	gtaaaaggag	cgtagacgg	gtggcaagtc	tgatgtgaaa	540
ggcatgggct	caacctgtgg	actgcattgg	aaactgtcat	acttgagtgc	cggaggggta	600
agcgggaattc	ctagtgtagc	ggtgaaatgc	gtagatatta	ggaggaacac	cagtggcgaa	660
ggcggccttac	tggacggtaa	ctgacgttga	ggctcgaaag	cgtggggagc	aaacaggatt	720
agataccctg	gtagtccacg	ccgtaaacga	tgaataacta	ggtgtcgggt	ggcaaagcca	780
ttcgggtgccg	tcgcaaacgc	agtaagtatt	ccacctgggg	agtacgttcg	caagaatgaa	840
actcaaagga	attgacgggg	acccgcacaa	cgcggtggagc	atgtggttta	attcgaagca	900
acgcgaagaa	ccttaccag	tcttgacatc	cgccctgaccg	atccttaacc	ggatctttcc	960
ttcgggacag	gcgagacagg	tggtgcatgg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt	gagatggttg	1020
gttaagtccc	gcaacgagcg	caaccctat	cctcagtagc	cagcatttaa	ggtgggcaact	1080
ctggggagac	tgccagggat	aacctggagg	aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcacatgcc	1140
ccttatgatt	tgggctacac	acgtgctaca	atggcgtaaa	caaagggag	cgagattgtg	1200
agatggagca	aatcccaaaa	ataacgtccc	agttcggact	gtagtctgca	acccgactac	1260
acgaagctgg	aatcgctagt	aatcgcggat	cagaatgccg	cgggtgaatac	gttcccggtt	1320
cttgatcacaca	ccgcccgtca	caccatggga	gtcagtaacg	cccgaagtca	gtgacctaac	1380
tgcaagaag	gagctgccga	aggcgggacc	gatgactggg	gtgaagtcgt	aacaaggt	1438

<210> 3

<211> 1481

<212> ADN

<213> *Blautia stercoris*

<220>

<221> k

<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
aagcgcacag	tatcgcatga	tacagtgtga	aaaactccgg	tggtatgaga	tggaccccg	240
tctgattagc	tagttggagg	ggtaacggcc	caccaaggcg	acgatcagta	gccggcctga	300
gagggtgaac	ggccacattg	ggactgagac	acggcccgga	ctcctacggg	aggcagcagt	360
ggggaatatt	gcacaatggg	ggaaaccctg	atgcagcgac	gccgcgtgaa	ggaagaagta	420
tctcgggtatg	taaaacttcta	tcagcagggga	agaaaatgac	ggtacctgac	taagaagccc	480
cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa	tacgtagggg	gcaagcgtta	tcgggattta	540
ctgggtgtaa	agggagcgta	gacggaagag	caagtctgat	gtgaaaggct	ggggcttaac	600
cccaggactg	cattggaaac	tgtttttctt	gagtgccgga	gaggtaaagc	gaattcctag	660
tgtagcgggtg	aaatgcgtag	atattaggag	gaacaccagt	ggcgaaggcg	gcttactgga	720
cggtaaactga	cgttgaggct	cgaagcgtg	gggagcaaac	aggattagat	accctggtag	780
tccacgccgt	aaacgatgaa	tactaggtgt	tggggagcaa	agctcttcgg	tgccgcagca	840
aacgcataaa	gtattccacc	tggggagtag	gttcgcaaga	atgaaactca	aaggaattga	900
cggggacccg	cacaagcgg	ggagcatgtg	gtttattcga	agcaacgcga	agaaccttac	960
caagtcttga	catcgatctg	accggttcgt	aatggaacct	ttccttcggg	acagagaaga	1020
caggtgggtgc	atggttgtcg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	tcccgcacacg	1080
agcgcaaccc	ctatcgtcag	tagccagcag	gtaaagctgg	gcactctgag	gagactgcc	1140
gggataacct	ggaggaaggc	ggggacgacg	tcaaatcatc	atgccctta	tgatttgggc	1200
tacacacgtg	ctacaatggc	gtaaacaaag	ggaagcgagc	ccgcgagggg	gagcaaatcc	1260
caaaaataac	gtcccagttc	ggactgcagt	ctgcaactcg	actgcacgaa	gctggaatcg	1320
ctagtaaatcg	cgaatcagaa	tgtcgcgggtg	aatacgttcc	cgggtcttgt	acacaccgcc	1380
cgtcacacca	tgggagtcag	taacgcccga	agtcagtgac	ccaaccttag	ggagggagct	1440
gccgaaggcg	ggattgataa	ctgggggtgaa	gtctaggggg	t		1481

<210> 4

<211> 1384

<212> ADN

<213> *Blautia wexlerae*

<220>

<221> n

<222> 749

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

<400> 4

ttcattgaga	cttcggtgga	tttagattct	atttctagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	60
tgggtaacct	gccttataca	gggggataac	agtcagaaat	ggctgctaata	accgcataaag	120
cgcacagagc	tgcatggctc	agtgtgaaaa	actccggtgg	tataagatgg	accgcggttg	180
gattagcttg	ttggtggggt	aacggcccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	240
ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtggg	300
gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	360
cggatatgtaa	acttctatca	gcagggaaga	tagtgacggt	acctgactaa	gaagccccgg	420
ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatat	gtagggggca	agcgttatcc	ggatttactg	480
ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggtgtggcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	540
tggactgcat	tggaaactgt	catacttgag	tgccggaggg	gtaagcggaa	ttcctagtgt	600
agcgtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaaggcggct	tactggacgg	660
taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	720
acgcggtaaa	cgatgaatac	taggtgtcng	gggagcatgg	ctcttcggtg	ccgtcgcaaa	780
cgcgaaccc	tatccacctg	gggagtacgt	tcgcaagaat	gaaactcaaa	ggaattgacg	840
gggaccogca	caagcgtggg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	900
aagtcttgac	atccgcctga	ccgacccctt	accggtatct	tccttcggga	caggcgagac	960
aggtggtgca	tggttgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgaacga	1020
gcgcaacccc	tatcctcagt	agccagcatt	taagggtggc	actctgggga	gactgccagg	1080
gataacctgg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcatcat	gccccttatg	atttgggcta	1140
cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaaggg	aagcgagatc	gtgagatgga	gcaaatccca	1200
aaaataacgt	cccagttcgg	actgtagtct	gcaacccgac	tacacgaagc	tggaatcgct	1260
agtaatcgcg	gatcagaatg	ccgcggtgaa	tacgttcccg	ggtcttgtag	acaccgcccg	1320
tcacaccatg	ggagtcagta	acgcccgaag	tcagtgcact	aactgcaaag	aaggagctgc	1380
cgaa						1384

<210> 5

<211> 1458

<212> ADN

<213> Blautia hydrogenotrophica

<220>

<221> n

<222> 1416

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

<400> 5

gatgaacgct	ggcggcgtgc	ttaacacatg	caagtcgaac	gaagcgatag	agaacggaga	60
tttcggttga	agttttctat	tgactgagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	tgggtaacct	120
gccttataca	gggggataac	agttagaaat	gactgctaata	accgcataaag	cgcacagctt	180
cgcatgaagc	ggtgtgaaaa	actgaggtgg	tataggatgg	accgcggttg	gattagctag	240
ttggtgaggt	aacggcccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	300
cacattggga	ctgagacacg	gcccacactc	ctacgggagg	cagcagtggg	gaatattgca	360
caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	cggatatgtaa	420
acttctatca	gcagggaaga	aagtgcggt	acctgactaa	gaagccccgg	ctaattacgt	480
gccagcagcc	gcggtaatat	gtaaggggca	agcgttatcc	ggatttactg	ggtgtaaagg	540
gagcgtagac	ggtttgcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	tggactgcat	600
tggaaactgt	cagacttgag	tgccggagag	gcaagcggaa	ttcctagtgt	agcggtgaaa	660
tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaaggcggcc	tgctggacgg	taactgacgt	720
tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	acgctgtaaa	780
cgatgaatac	taggtgtcgg	gtggcaaacg	cattcgggtc	cgcagcaaac	gcaataagta	840
ttcccacctg	gggagtacgt	tcgcaagaat	gaaactcaaa	ggaattgacg	gggaccgcga	900
caagcgtggg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	aaatcttgac	960
atccctctga	ccgggaagta	atgttccctt	ttcttcggaa	cagaggagac	aggtggtgca	1020
tgggtgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgaacga	gcgcaaccct	1080
tattcttagt	agccagcagg	tagagctggg	cactctaggg	agactgccag	ggataacctg	1140
gaggaagggt	gggatgacgt	caaatcatca	tgccccttat	gatttgggct	acacacgtgc	1200
tacaatggcg	taaacaagg	gaagcgaagg	ggtgacctgg	agcaaatctc	aaaaataacg	1260
tctcagttcg	gattgtagtc	tgcaactcga	ctacatgaag	ctggaatcgc	tagtaatcgc	1320
gaatcagaat	gtcgcggtga	atacgttccc	gggtcttgta	cacaccgccc	gtcacaccat	1380
gggagtcagt	aacgcccga	gtcagtgacc	caaccnaaag	gaggagctg	ccgaagggtg	1440
gactgataac	tgggggtga					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 hydrogenotrophica* având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95% identică cu SEQ ID NO:5, pentru utilizare într-o metodă de reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* patogene în tractul gastrointestinal.

2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care *Enterobacteriaceae* este *E. coli*.

3. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1 sau revendicării 2, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* în tractul gastrointestinal în tratamentul sau prevenirea sindromului colonului iritabil, bolii Crohn, colitei ulcerative, dispepsiei funcționale, diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau meningitei neonatale.

4. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1 sau revendicării 2, în care compoziția este pentru utilizare în tratarea sau prevenirea diareei, gastroenteritei, infecției tractului urinar sau a meningitei neonatale.

5. 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 în tratamentul infecțiilor cauzate de *Enterobacteriaceae* patogene din tractul gastrointestinal.

6. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 5, în care infecția cauzată de *Enterobacteriaceae* patogene este o infecție cu *E. coli*.

7. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5 sau care are secvența de ARNr 16s din SEQ ID NO:5.

8. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția cuprinde o tulpină bacteriană din specia *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 reducere a nivelului de *Enterobacteriaceae* patogene din tractul gastrointestinal la un subiect diagnosticat cu sindrom de colon iritabil.

9. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care compoziția este pentru administrare orală.

10. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic.

11. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care tulpina bacteriană este liofilizată.

12. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care tulpina bacteriană este viabilă.

13. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care compoziția cuprinde o singură tulpină.

14. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, care cuprinde tulpina bacteriană de *Blautia hydrogenotrophica* ca parte a unui consorțiu microbial.

15. Un produs alimentar cuprinzând compoziția din oricare revendicare precedentă, pentru utilizare conform oricărei revendicări precedente.

Măsurarea populației de BH prin q-PCR

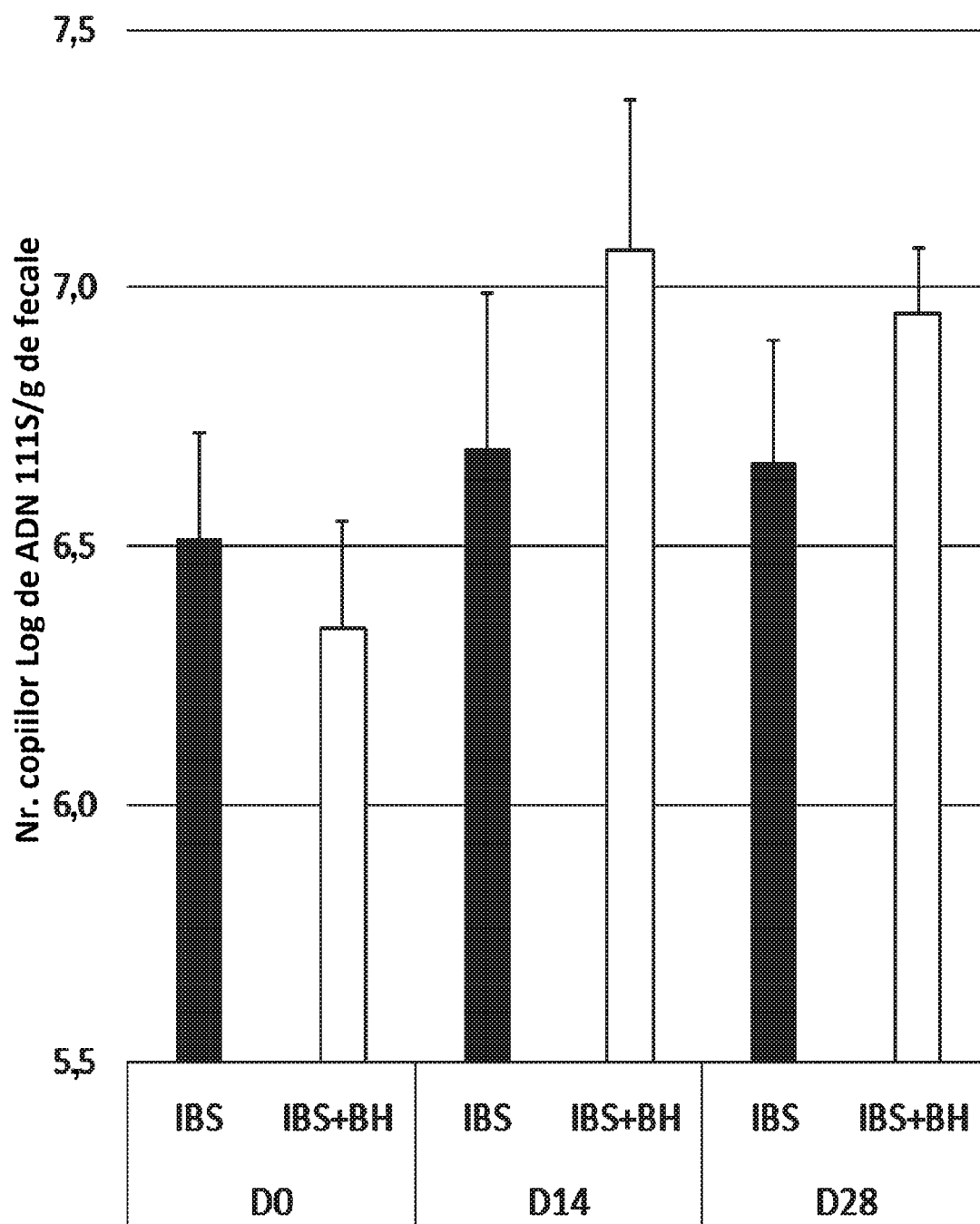
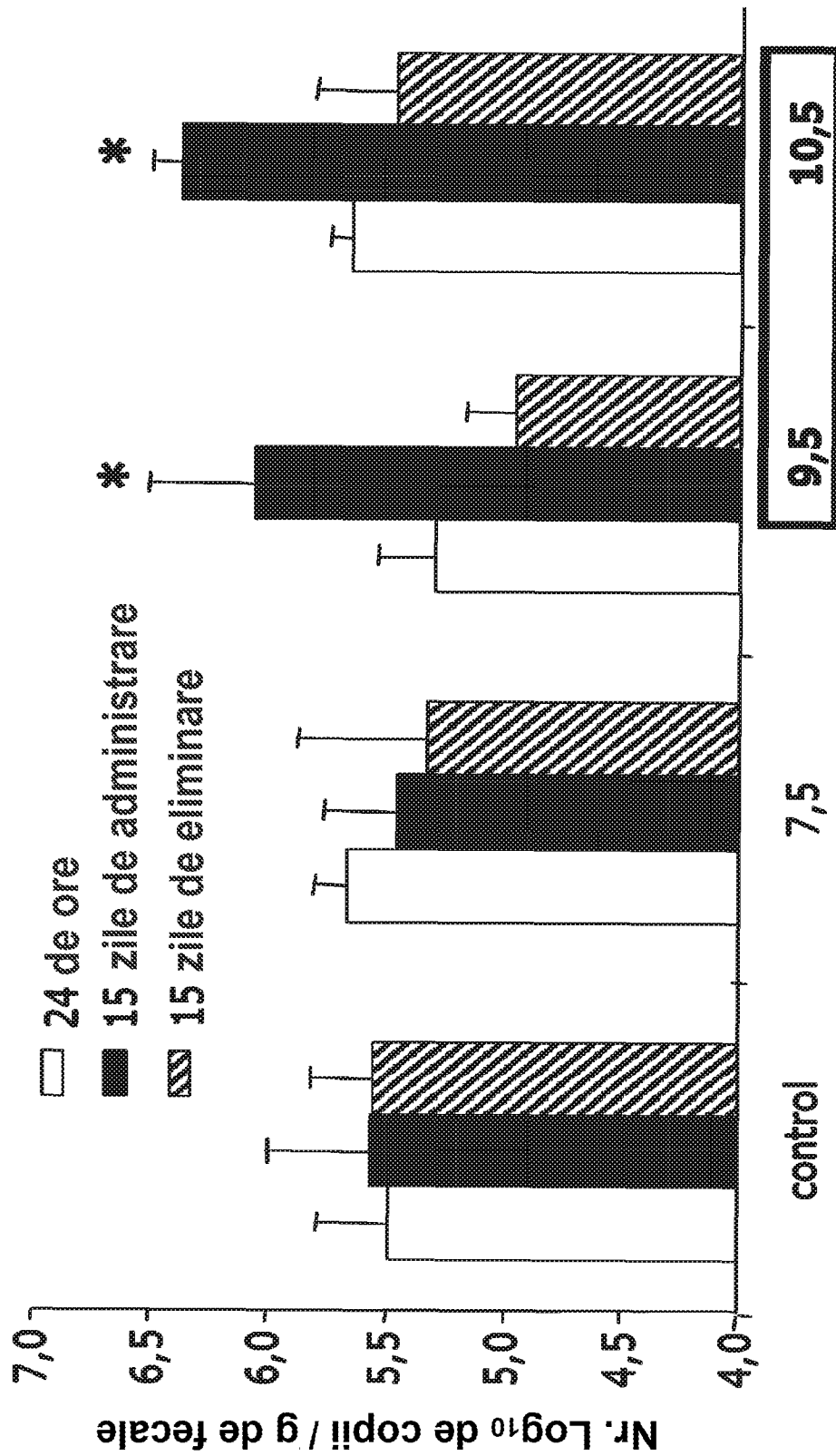


Fig. 1



B. hydrogenotrophica administrată ($\log_{10}$ per ml)

Fig. 2

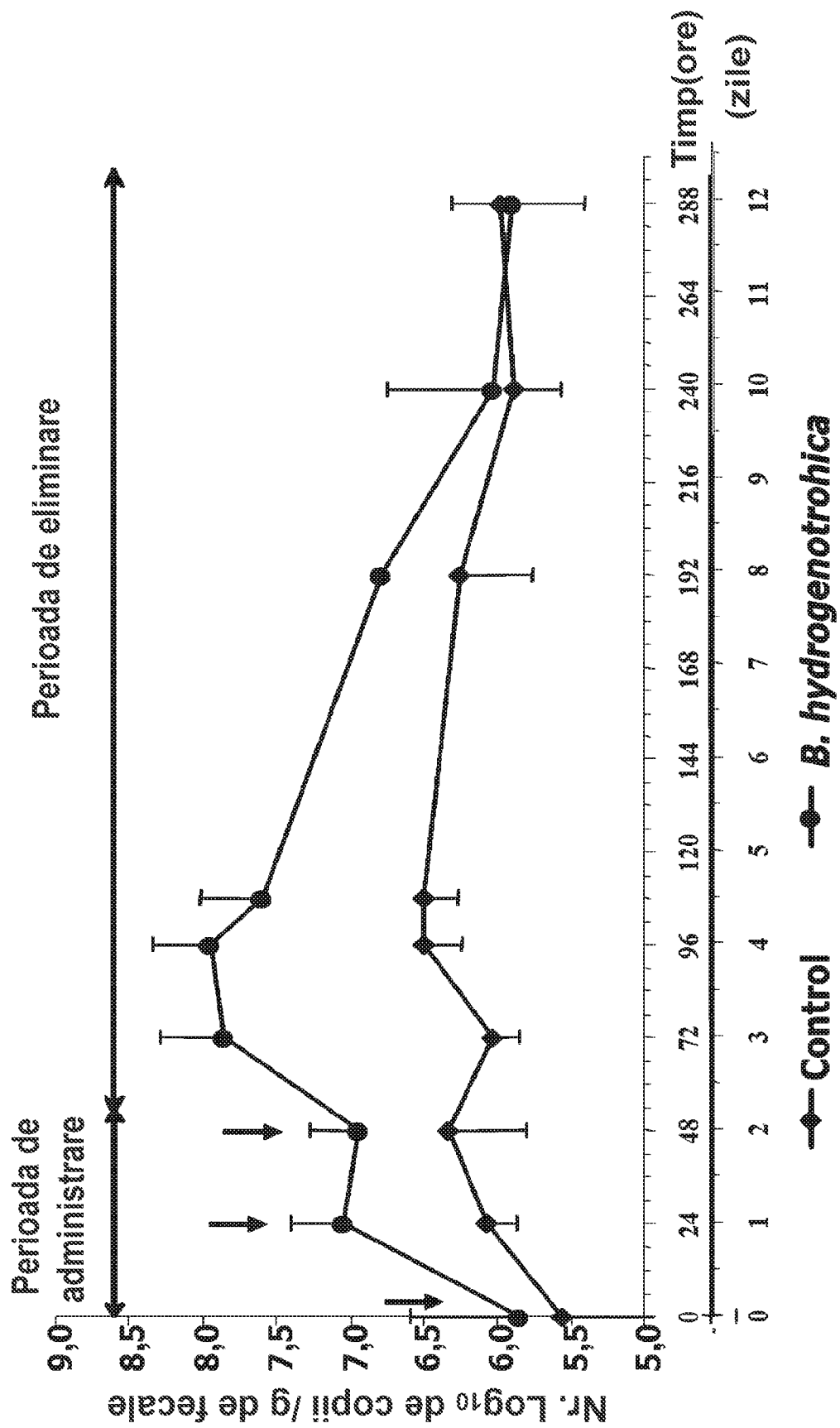


Fig. 3

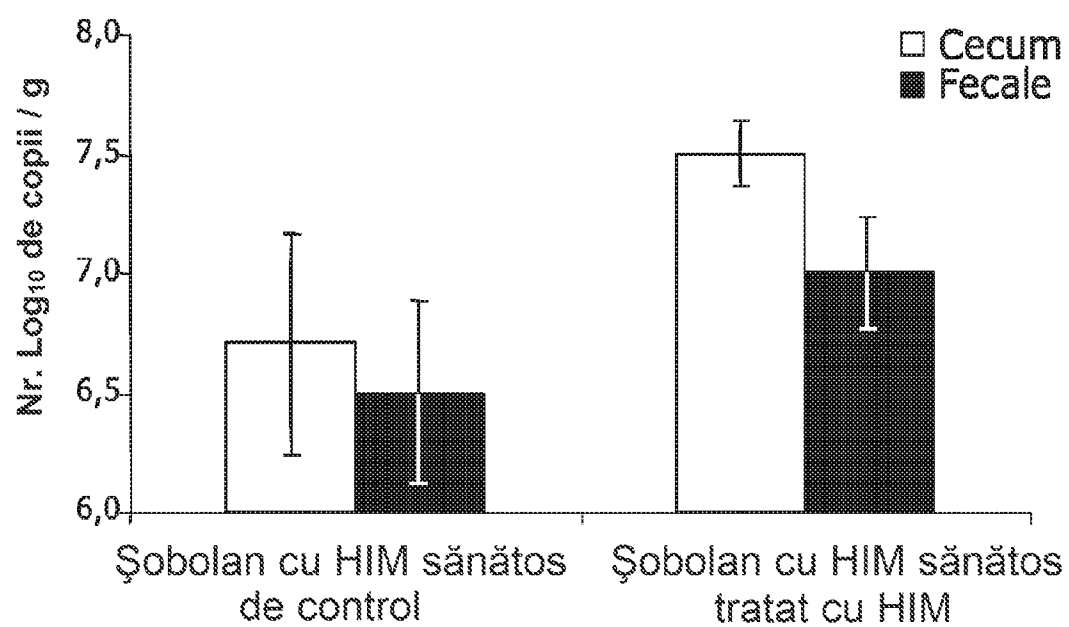


Fig. 4

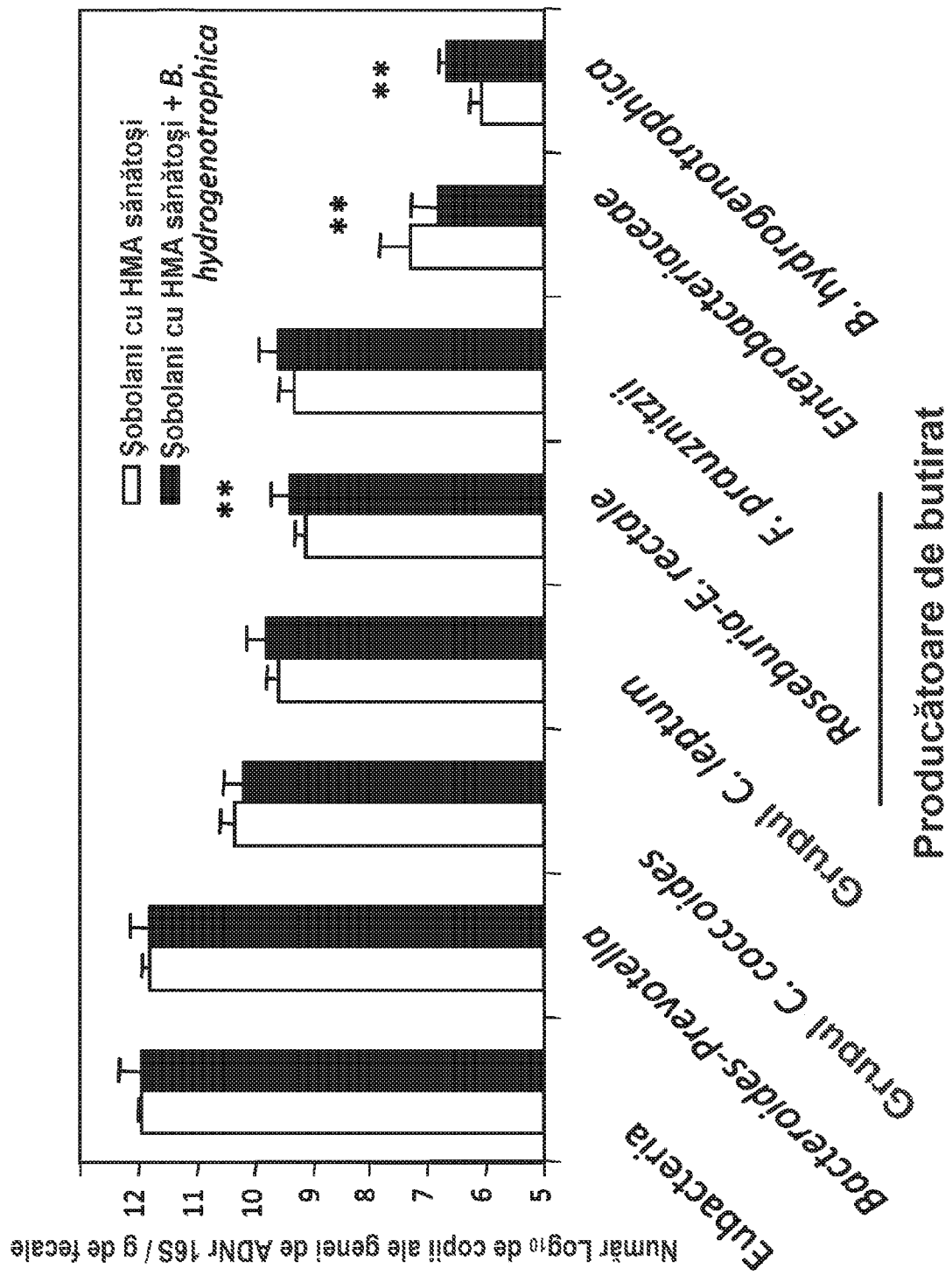


Fig. 5

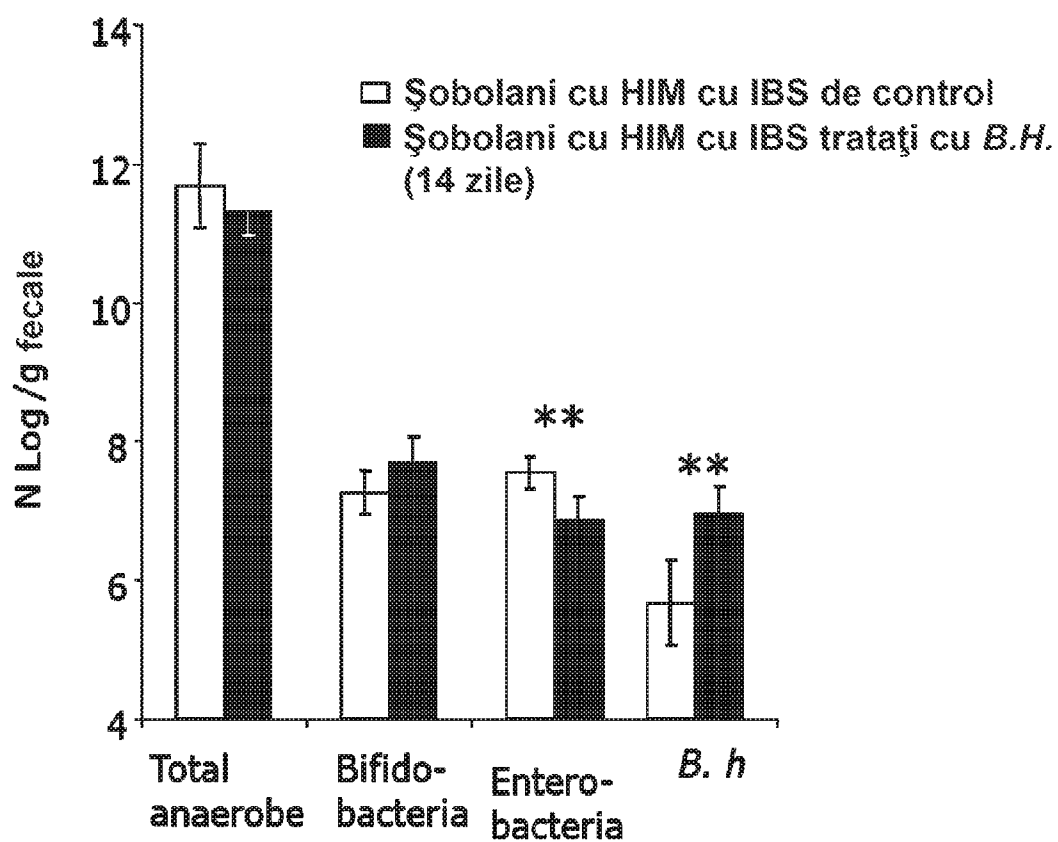


Fig. 6

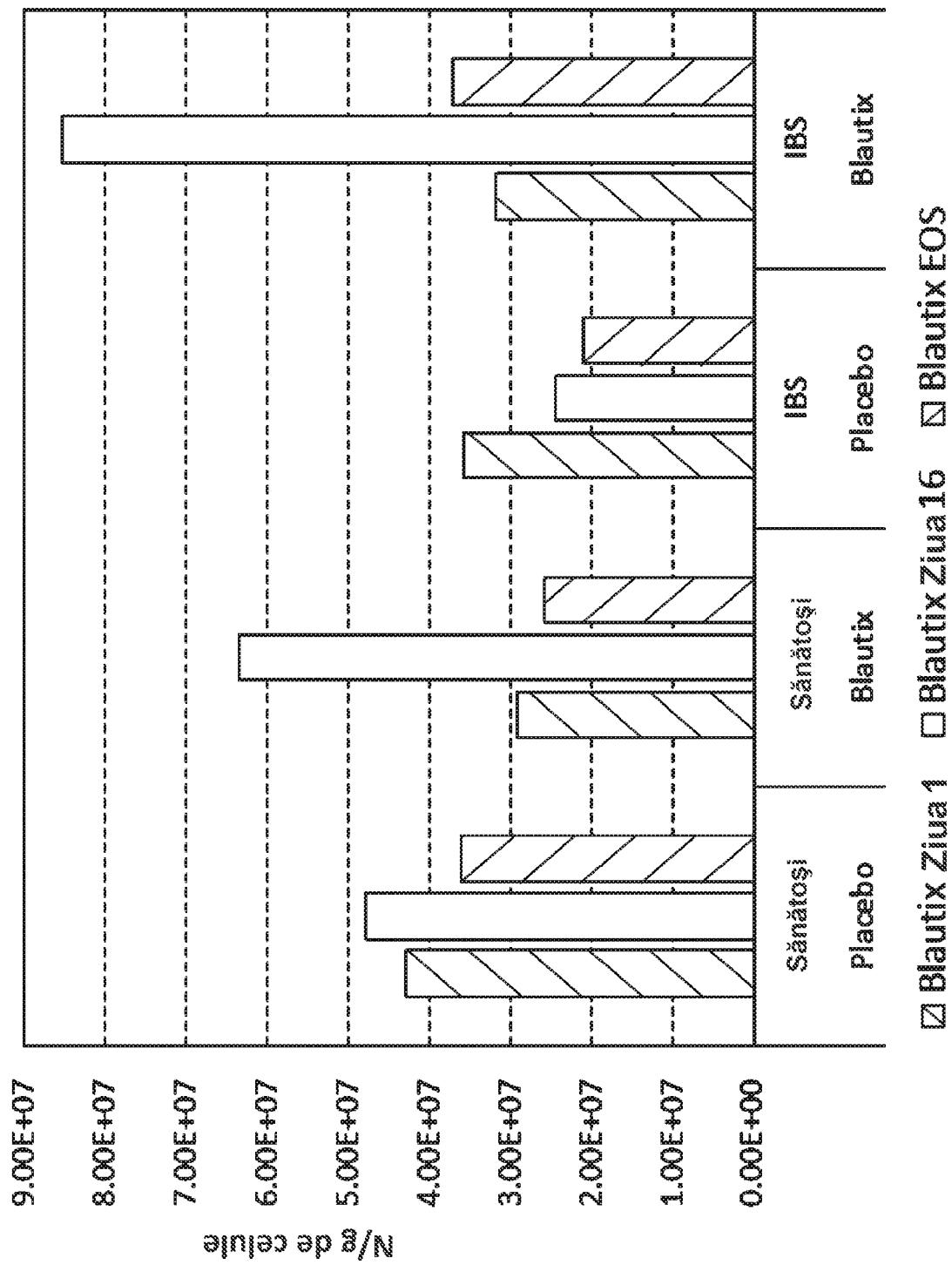


Fig. 7 (A)

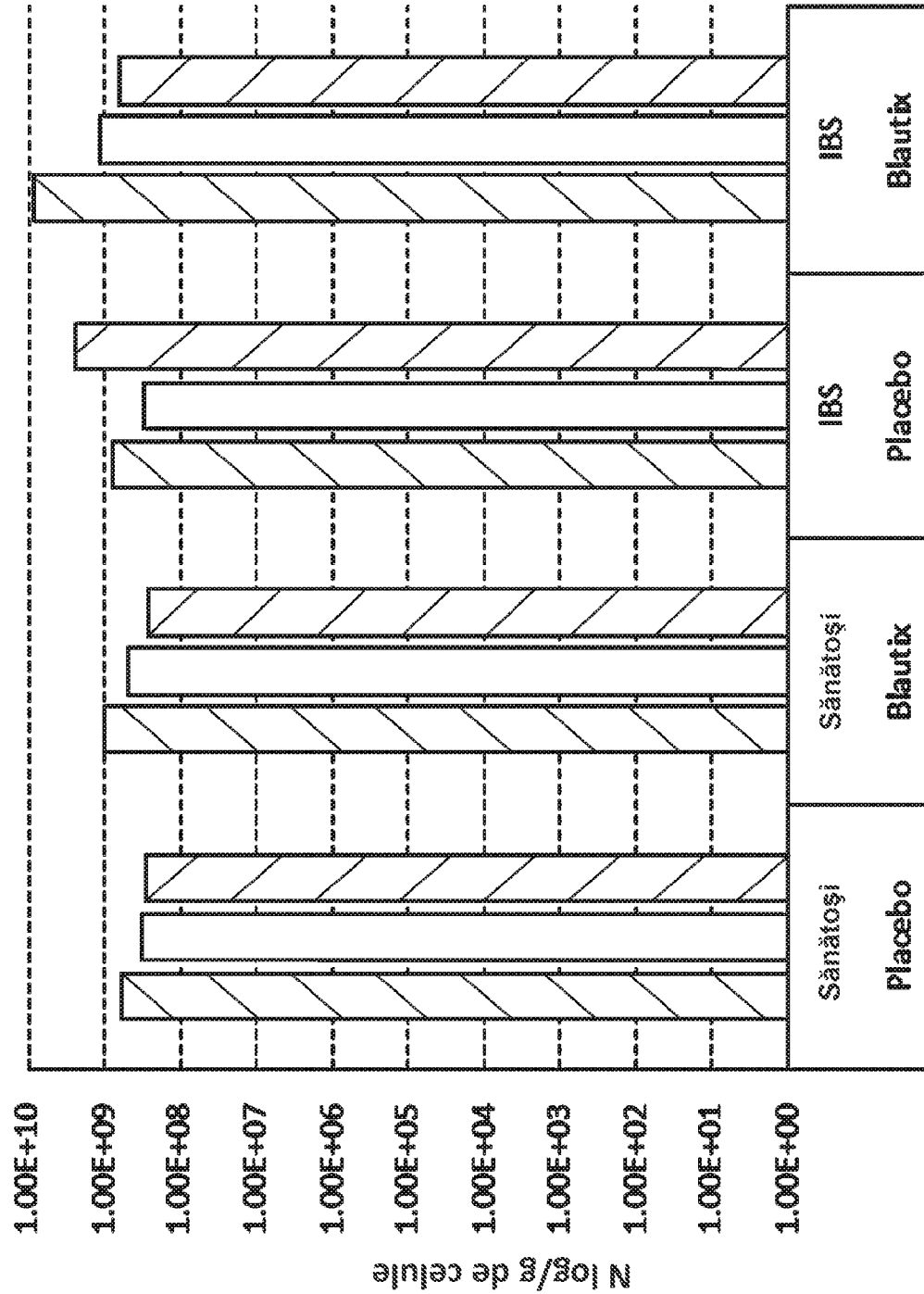


Fig. 7 (B)

▨ Enterobacteria Ziua 1 □ Enterobacteria Ziua 16

Fig. 8 (A)

	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%)

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. 8 (B)

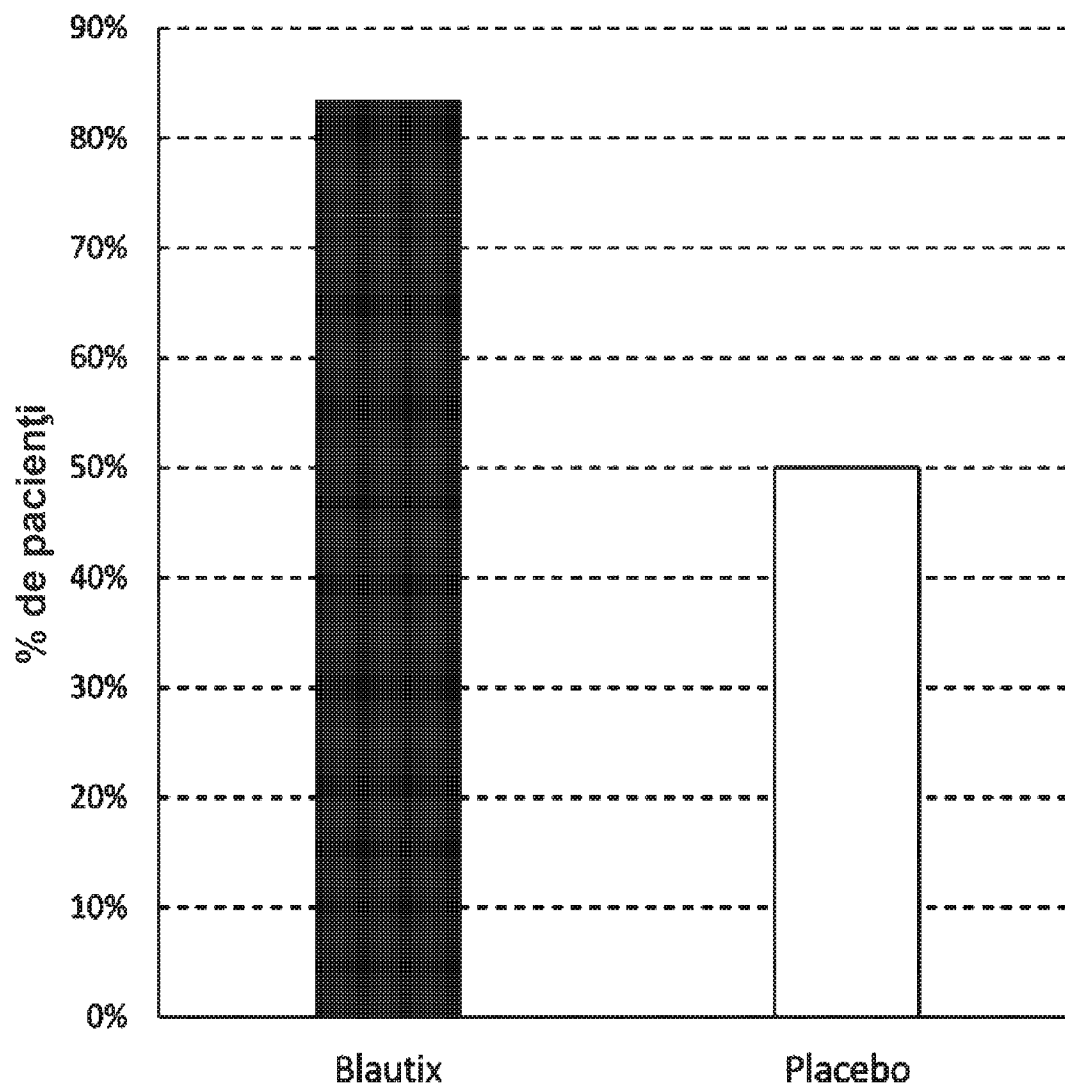
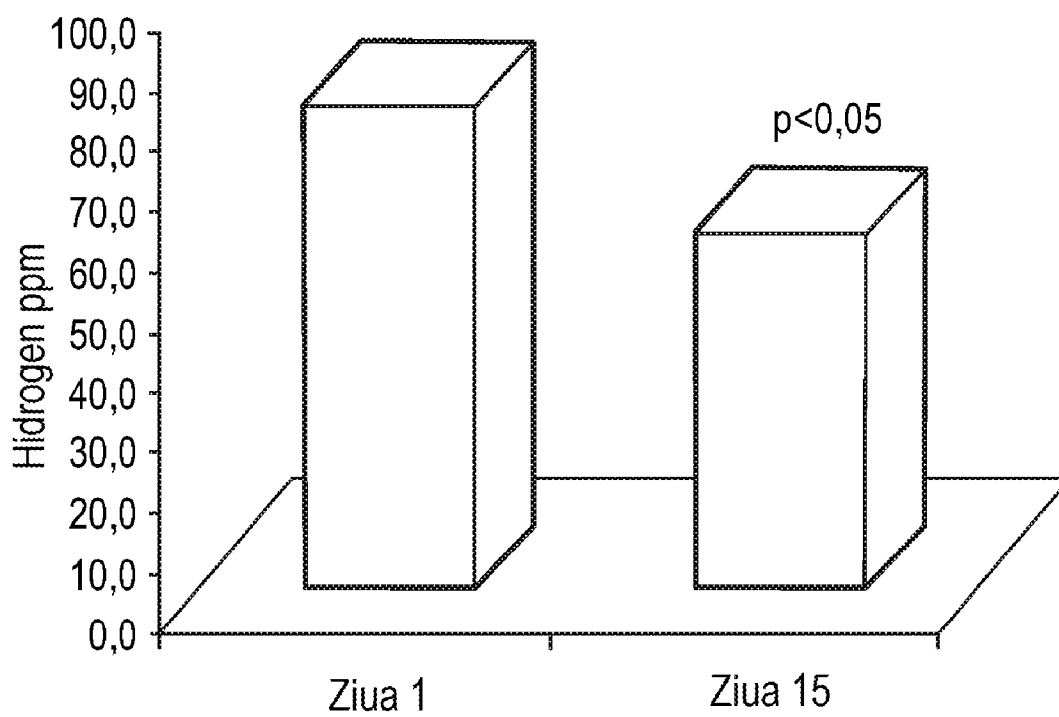


Fig. 8 (C)

Grup VERUM							
NUMĂR	ZIUA 1	ZIUA 15		H2 Corectat	NUMĂR	ZIUA 1	ZIUA 15
ALEATOR	CMAx	CMAx			ALEATOR	CMAx	CMAx
3.02	89.8	23.0			3.02	123.0	34.0
3.04	68.0	21.0			3.04	70.0	25.0
3.05	130.4	112.8			3.05	163.0	167.0
3.07	56.8	37.6			3.07	71.0	46.0
3.09	96.8	52.8			3.09	121.0	66.0
3.11	63.0	104.9			3.11	75.0	128.0
3.12	12.3	38.7			3.12	16.0	53.0
3.13	110.3	82.5			3.13	118.0	85.0
3.15	115.7	53.8			3.15	155.0	63.0
3.17	97.8	83.7			3.17	134.0	139.0
3.19	51.1	66.8			3.19	72.0	87.0
3.21	144.0	71.4			3.21	144.0	75.0
3.22	52.7	43.9			3.22	59.0	55.0
3.24	27.1	26.7			3.24	29.0	27.0
		Test T unilateral	0.02032643			Test T unilateral	0.04798585
MEDIA	Ziua 1	Ziua 15				Ziua 1	Ziua 15
	79.7	58.5			MEDIA	96.4	75.0
SD	38.7	29.5			SD	46.5	43.0
N	14	14			N	14	14
MEDIANA	78.9	53.3			MEDIANA	96.5	64.5
MIN	12.3	21.0			MIN	16.0	25.0
MAX	144.0	112.8			MAX	163.0	167.0

Fig. 9 (A)

Hidrogen necorectat**Fig. 9 (B)**

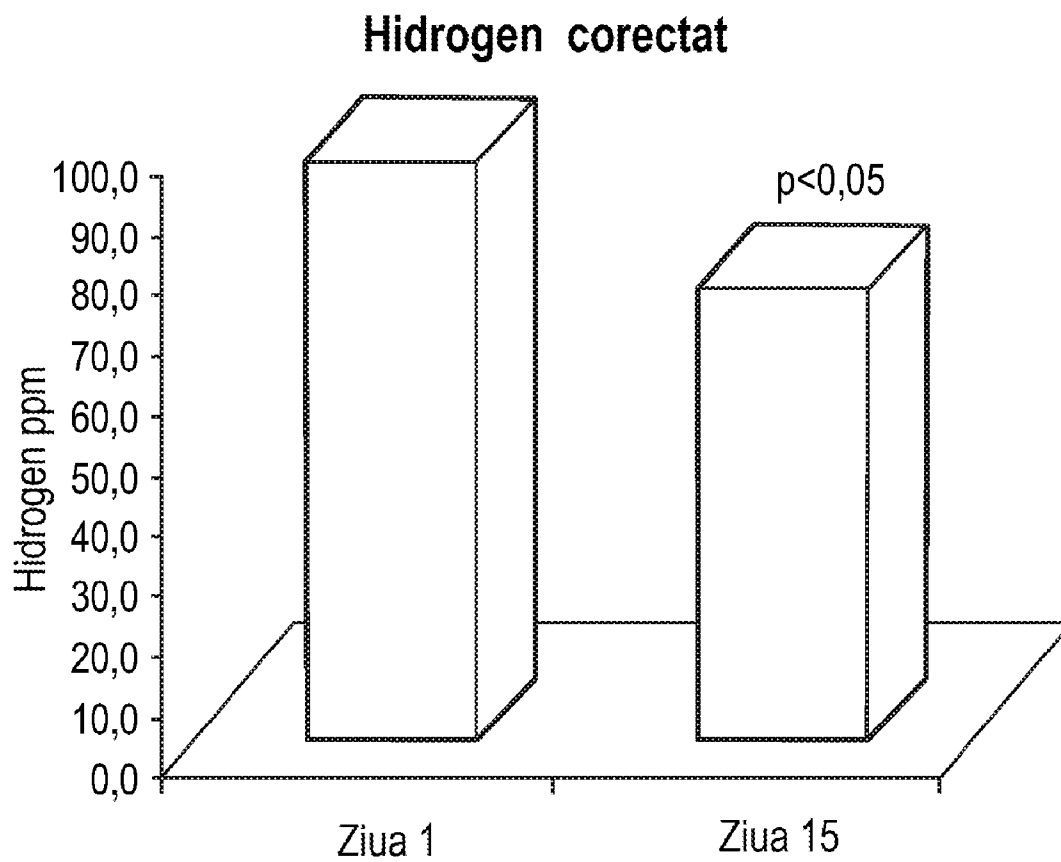


Fig. 9 (C)

Grupul PLACEBO

NUMĂR	ZIEA 1	ZIEA 15	H2 corectat	NUMĂR	ZIEA 1	ZIEA 15
ALTEATOR	CMAX	CMAX		ALTEATOR	CMAX	CMAX
3.06	103.3	81.9		3.06	126.0	86.0
3.08	42.3	43.3		3.08	55.0	58.0
3.10	97.6	84.3		3.10	124.0	107.0
3.14	35.0	42.4		3.14	55.0	53.0
3.16	59.0	80.9		3.16	98.0	123.0
3.23	41.1	62.2		3.23	58.0	79.0
4.13	53.2	25.0		4.13	58.0	25.0
		Test T unilaterial	0.41620609		Test T unilaterial	0.27096549
	ZIEA 1	ZIEA 15			ZIEA 1	ZIEA 15
MEDIA	61.7	40.0		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. 10 (A)

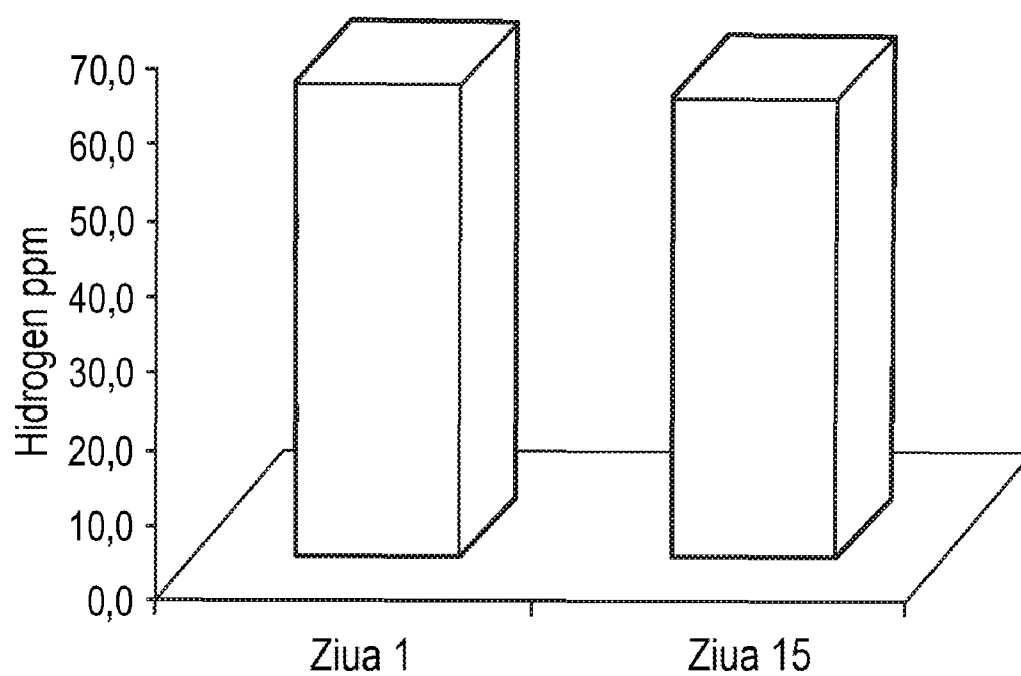
Placebo cu hidrogen necorectat

Fig. 10 (B)

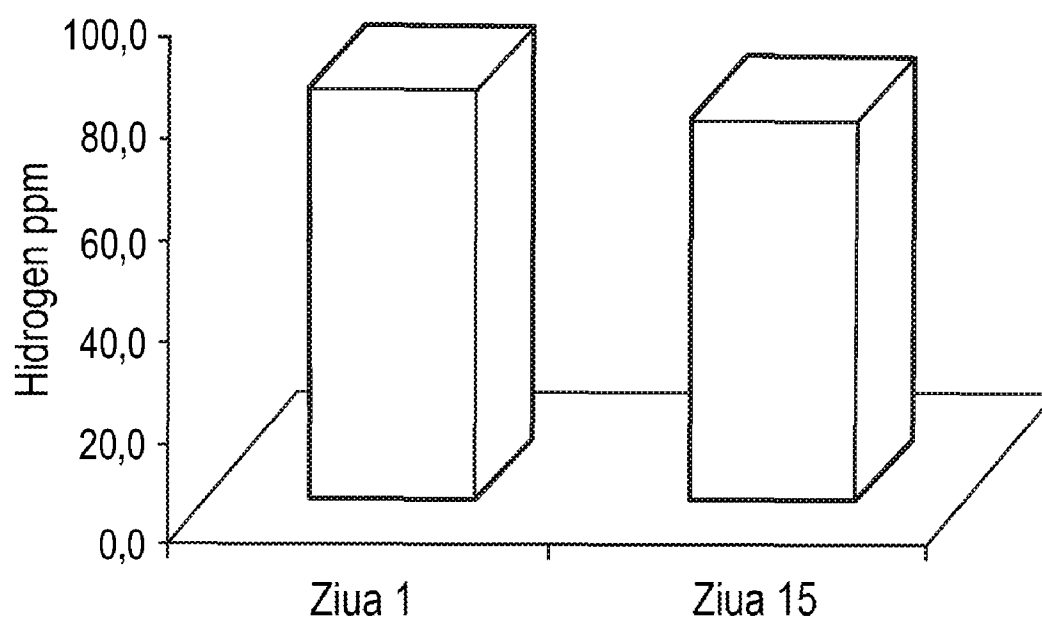
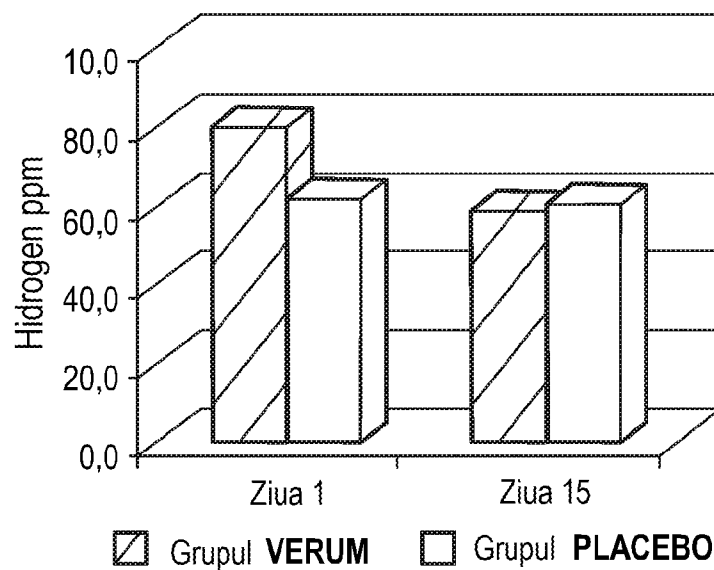
Placebo cu hidrogen corectat

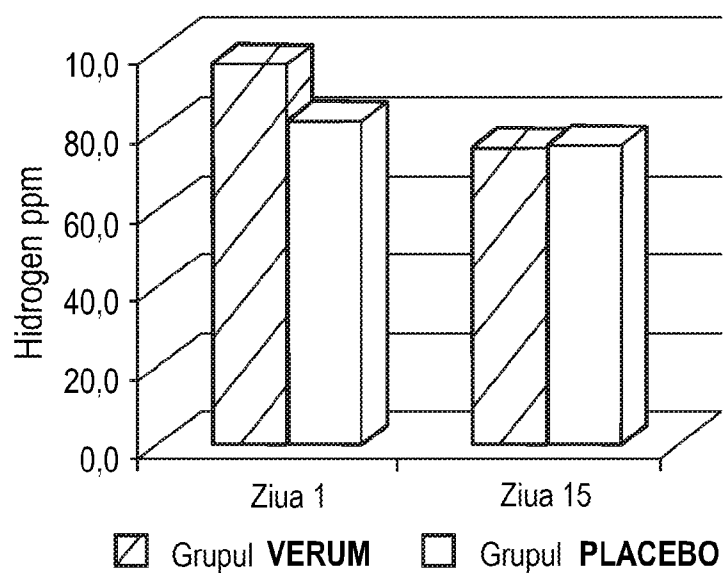
Fig. 10 (C)

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. 11**

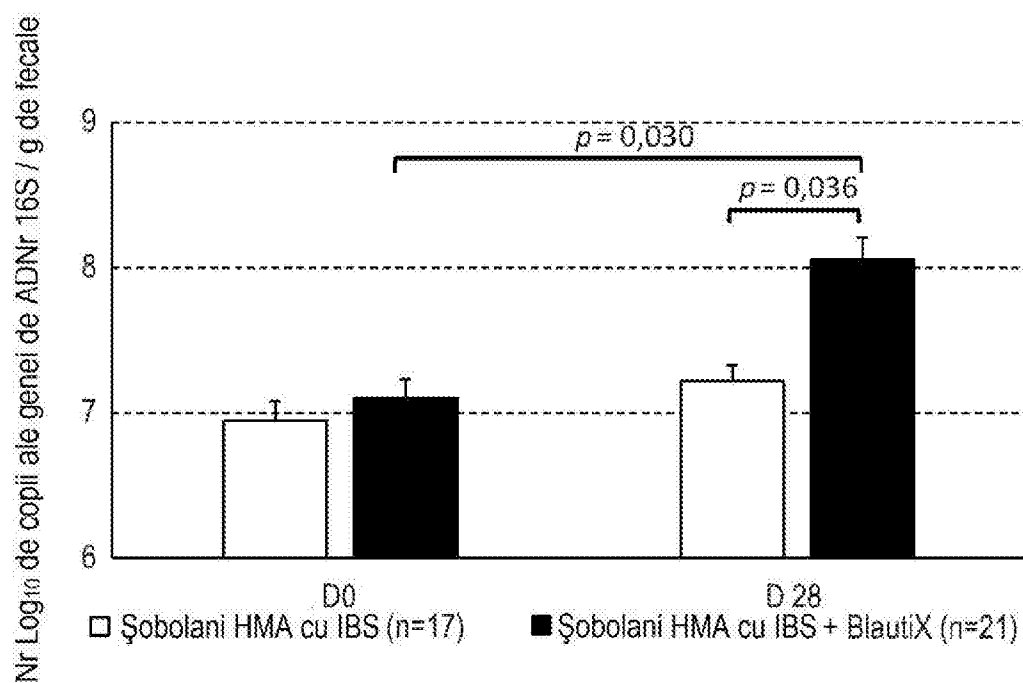


Fig. 12

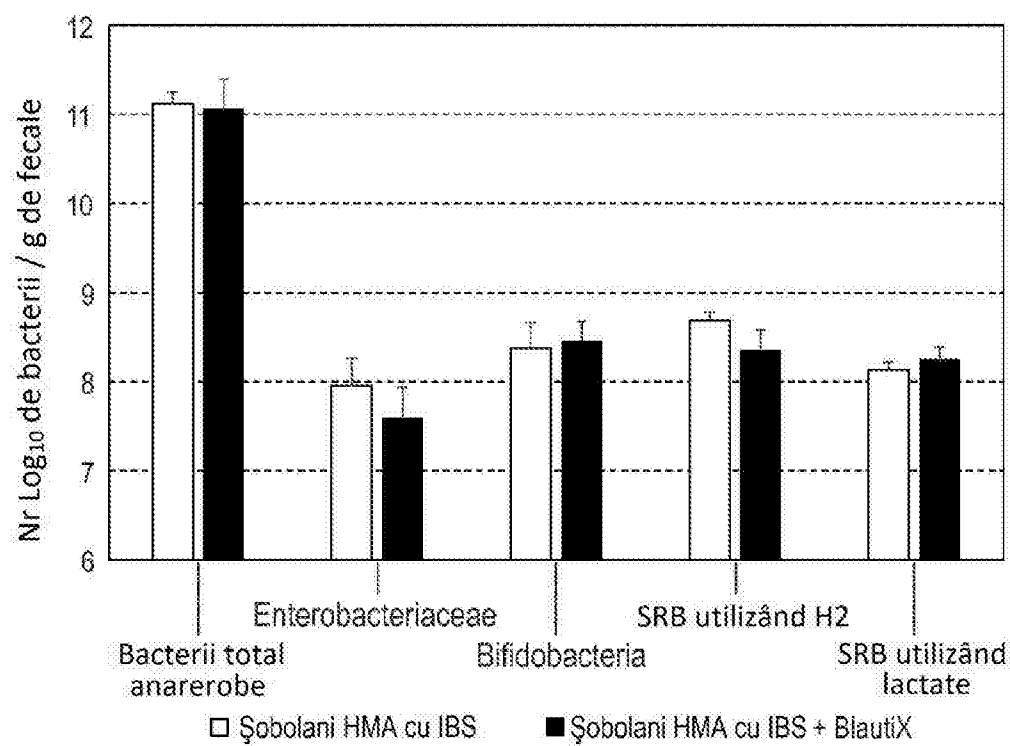


Fig. 13

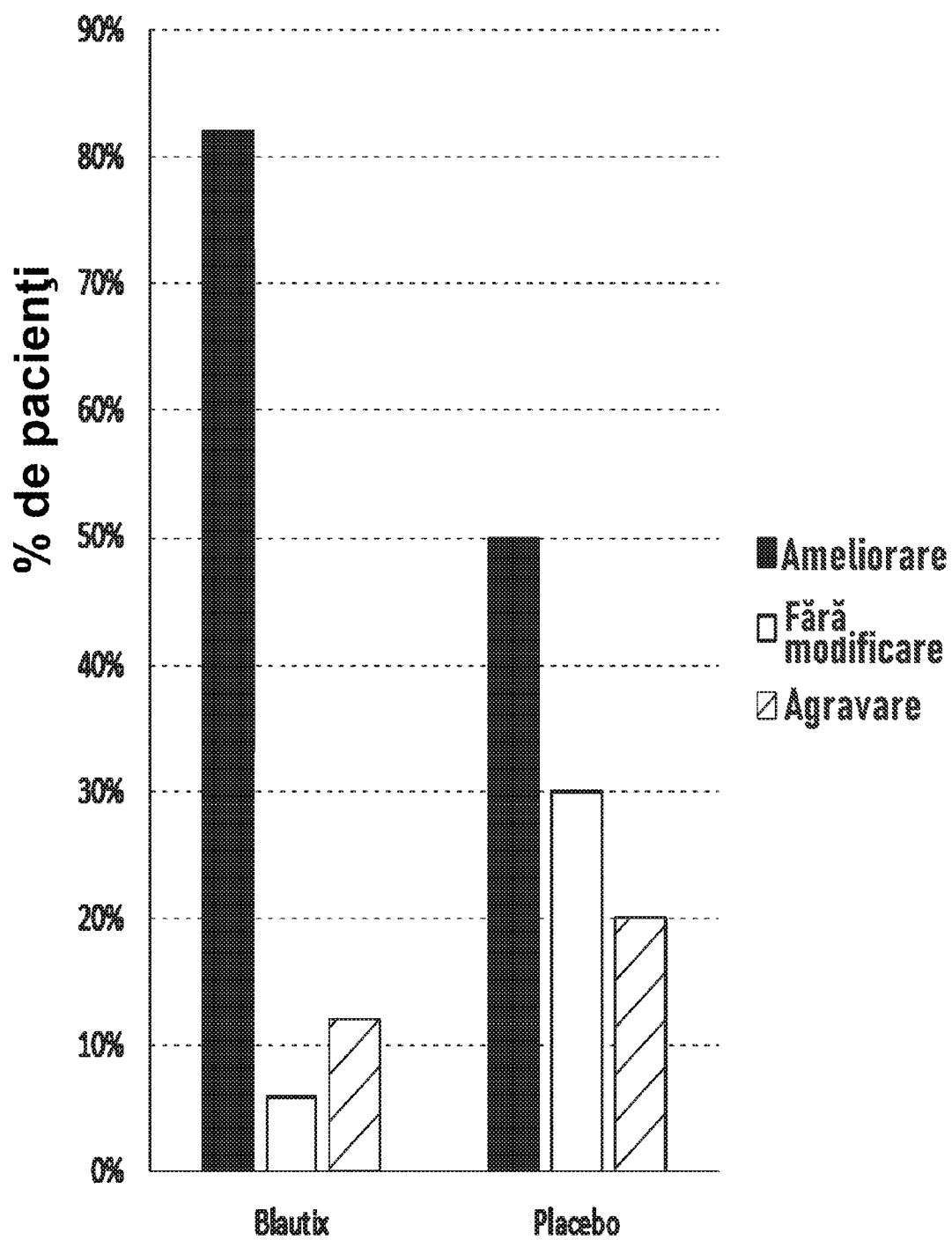


Fig. 14

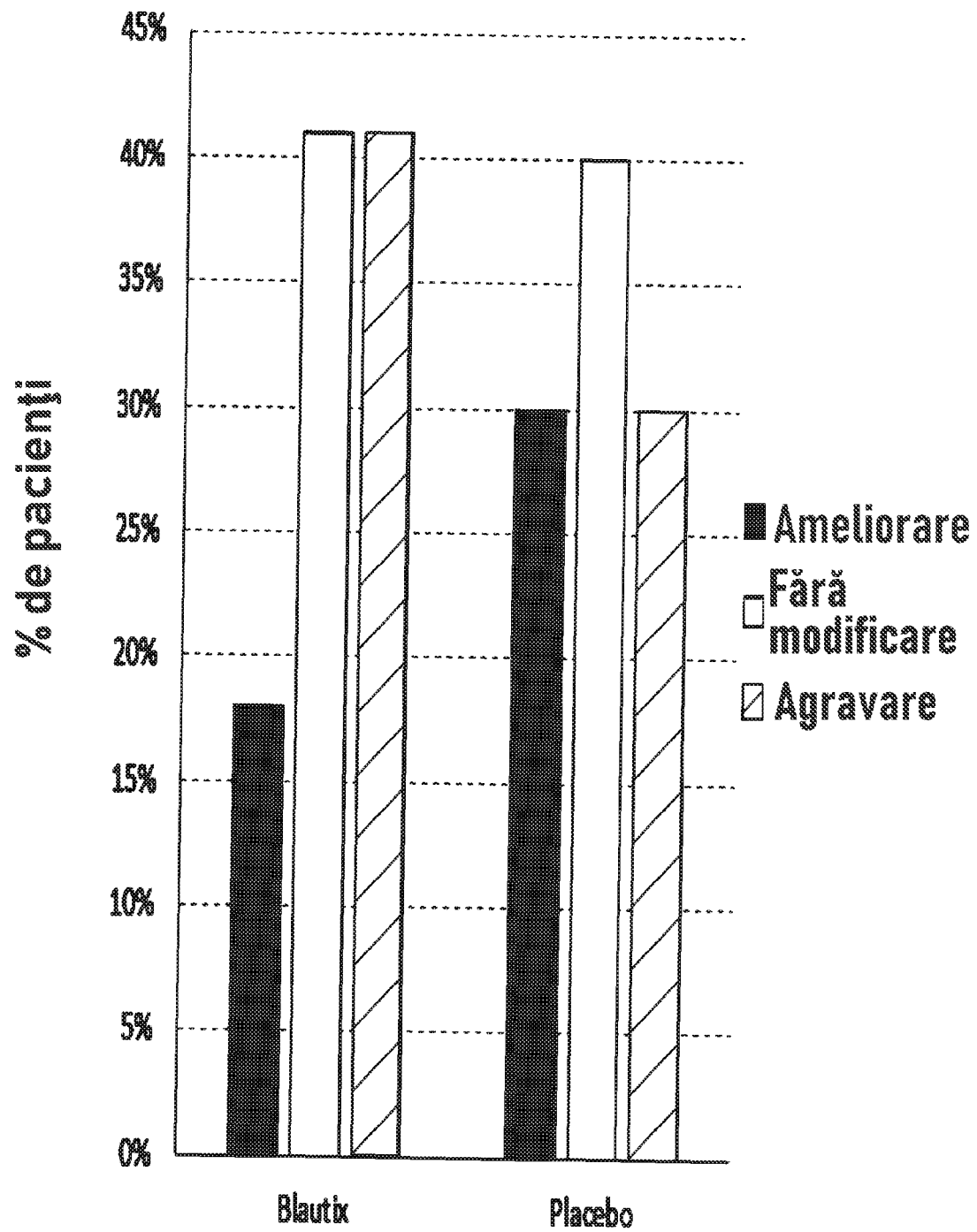


Fig. 15