



MD/EP 3630136 T2 2021.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3630136 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 35/74 (2015.01.01)

C12N 1/20 (2006.01.01)

A23L 33/135 (2016.01.01)

A61P 25/00 (2006.01.01)

A61P 25/22 (2006.01.01)

A61P 25/24 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0313 (22) Data de depozit: 2018.05.22 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18727408.9, 2018.05.22 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3630136, 2020.04.08 (31) Numărul cererii prioritare: 201708176; 201714305; 201714309; 201714298; 201716493; 201718551 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.05.22; 2017.09.06; 2017.09.06; 2017.09.06; 2017.10.09; 2017.11.09 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB; GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2021, 2021.08.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 16/2021, 2021.04.21 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2020, 2020.05.31
(71) Solicitant: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (72) Inventatori: SAVIGNAC Helene, GB; MULDER Imke Elisabeth, GB; STEVENSON Alexander James, GB (73) Titular: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții care cuprind tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

1
Invenția furnizează compoziții cuprinzând tulpini bacteriene pentru tratarea sau prevenirea leziunilor cerebrale.

2
Secvențe: 5
Revendicări: 14
Figuri: 6

MD/EP 3630136 T2 2021.08.31

(54) Compositions comprising bacterial strains**(57) Abstract:**

1

The invention provides compositions comprising bacterial strains for treating and preventing brain injury.

2

Sequences: 5

Claims: 14

Fig.: 6

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL TEHNIC**

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

BAZELE INVENȚIEI

- 10 Se consideră că intestinul uman este steril *in utero*, dar este expus la o mare varietate de microbi materni și de mediu imediat după naștere. Apoi, apare o perioadă dinamică de colonizare și succesiune microbiană, care este influențată de factori precum modul de livrare, mediul, dieta și genotipul gazdei, toate acestea având un impact asupra compoziției microbiotei intestinale, în special în timpul de la început al vieții. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine asemănătoare unui adult [1]. Microbiota intestinală umană conține mai mult de 1500 de filotipuri diferite, dominate în niveluri de abundență de două mari diviziuni bacteriene (*file*), Bacteroidetele și Firmicutele [2-3]. Relațiile simbiotice de succes care rezultă din colonizarea bacteriană a
- 15 intestinului uman au dat o mare varietate de funcții metabolice, structurale, de protecție și alte funcții benefice. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură faptul că, componentele dietei altfel nedigerabile sunt degradate prin eliberarea de produse secundare care oferă o sursă importantă de nutrienți pentru gazdă și beneficii suplimentare pentru sănătate. Similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine recunoscută și este exemplificată la animalele lipsite de germeni care au un sistem imunitar afectat, care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriilor comensale [4-6].

- 25 Modificări dramatice ale compoziției microbiotei au fost documentate în tulburările gastro-intestinale, cum ar fi boala inflamatorie a intestinului (IBD). De exemplu, nivelurile de *Clostridium* cluster XIVa de bacterii și *Clostridium* cluster XI (*F. prausnitzii*) sunt reduse la pacienții cu IBD, în timp ce numele de *E. coli* sunt crescute, sugerând o deplasare a echilibrului dintre simbioți și patobionți în interiorul intestinului [7-11].

- 30 Recunoscând potențialul efect pozitiv pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animalului, au fost propuse diferite tulpini pentru a fi utilizate în tratamentul diferitelor boli (vezi, de exemplu, [12-15]). Se știe că bacteriile intestinale umane produc acizi grași cu lanț scurt (SCFA-uri) care au fost propuși pentru tratarea tulburărilor autoimune și/sau inflamatorii [16]. O serie de tulpini, incluzând preponderent tulpinile de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru a fi utilizate în tratarea diferitelor tulburări intestinale (vezi [17] pentru o trecere în revistă). Tulpinile bacteriene, în special bacteriile butirogene, au fost propuse pentru a trata și/sau preveni infecția cu *Clostridium difficile* [18].

- 40 **S-a demonstrat că, *Clostridium butyricum* atenuează ischemia/reperfuzia cerebrală la modelele de șoareci ([19] și [20]).** Administrarea de *C. butyricum* a condus la modularea microbiotei intestinale, care s-a corelat cu modificările nivelurilor diferitelor neurotrofine și transmițătoare de monoamină care sunt implicate în funcția creierului. Datorită complexității moleculelor implicate, autorii au ajuns la concluzia că mecanismul prin care *C. butyricum* a produs aceste efecte neuroprotectoare a fost imposibil de identificat. Tratamentul cu *C. butyricum* a condus la o reducere a apoptozei prin intermediu scăderii nivelurilor de capază-3 ca răspuns la activarea PI3K/Akt. S-a raportat pe scară largă faptul că, calea PI3K/Akt participă la protecția împotriva tulburărilor psihiatrice.

- 50 Tulpini ale genului *Blautia* au fost, de asemenea, propuse pentru utilizarea în modularea echilibrului microbian al ecosistemului digestiv [21] și anumite specii au fost propuse pentru utilizarea în tratarea bolilor sistemice distanțate de intestin [22]. Cu toate acestea, relația dintre diferite tulpini bacteriene și diferite boli, precum și efectele precise ale anumitor tulpini bacteriene asupra intestinului și la nivel sistemic și asupra oricăror tipuri particulare de boli, sunt slab caracterizate.

Există o cerință pentru ca efectele potențiale ale bacteriilor intestinale să fie caracterizate astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii care utilizează bacterii intestinale.

- WO2016/203218 dezvăluie compoziții cuprinzând tulpini bacteriene pentru tratarea și prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune. US2016/143961 dezvăluie compoziții probiotice și prebiotice și utilizarea acestora în tratamentul și prevenirea bolii grefei versus gazdă.

WO2015/033305 dezvăluie utilizarea unei compoziții cuprinzând microorganisme pentru a crește producția intestinală de acid butiric, acid folic sau niacină și/sau pentru a reduce producția intestinală de acid succinic. WO2017/148596 dezvăluie compoziții care cuprind tulpini bacteriene *Blautia* pentru tratarea hipersensibilității viscerale. Ji și colab. discută despre o analiză a comunităților microbiene intestinale ale pacienților cu infarct și ischemie cerebrală pe baza tehnologiei de secvențiere cu randament ridicat și a metabolismului glucozei și lipidelor. Paven și colab. discută despre microbiomul intestinal și scleroza multiplă, Liu și colab discută despre reclasificarea *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., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. și descrierea *Blautia wexlerae* sp. nov., izolat din fecalele umane.

REZUMATUL INVENȚIEI

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea leziunilor cerebrale. În special, inventatorii au identificat faptul că tulpinile bacteriene din genul *Blautia* pot fi eficiente pentru tratarea leziunilor cerebrale. Așa cum este descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor care cuprind *Blautia hydrogenotrophica* poate trata leziunile cerebrale, ajutând recuperarea și îmbunătățind funcția neurologică, abilitățile motorii și recunoașterea socială într-un model de leziuni cerebrale de ocluzie de șoarece, la pacienți. Prin urmare, într-o primă modalitate de realizare, invenția redă o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a leziunii cerebrale.

În modalități de realizare preferate, invenția redă o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare sau prevenire a leziunii cerebrale. În modalități de realizare preferate, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea accidentului vascular cerebral. În modalități de realizare deosebit de preferate, accidentul vascular cerebral este ischemia cerebrală. În unele modalități de realizare ischemia cerebrală este un accident vascular cerebral ischemic. În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral este un accident vascular cerebral hemoragic.

În modalități de realizare preferate ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia hydrogenotrophica*. De asemenea, pot fi utilizate tulpini strans inrudite, cum ar fi tulpini 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 tulpinii bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR: 5. Cel mai preferabil, tulpina bacteriană din compoziție este tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depusă sub numărul de acces DSM 14294.

În alte modalități de realizare ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia stercoris*. De asemenea, pot fi utilizate tulpini strans inrudite, cum ar fi tulpini 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 tulpinii bacteriene de *Blautia stercoris*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR: 1 sau 3. De preferință, identitatea secvenței este cu SECV ID NR: 3. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție are secvența de ARNr 16s reprezentată de SECV ID NR: 3.

În alte modalități de realizare ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia wexlerae*. De asemenea, pot fi utilizate tulpini strans inrudite, cum ar fi tulpini 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 tulpinii bacteriene de *Blautia wexlerae*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR. 2 sau 4. De preferință, identitatea secvenței este cu SECV ID NR: 4. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție are secvența de ARNr 16s reprezentată de SECV ID NR: 4.

În anumite modalități de realizare, compoziția conform invenției este pentru administrarea orală. Administrarea orală a tulpinilor din invenție poate fi eficientă pentru tratarea leziunii cerebrale. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite eliberarea în și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

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

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

10 În anumite modalități de realizare, invenția redă un produs alimentar care cuprinde compoziția așa cum a fost descrisă mai sus.

În anumite cazuri, dezvăluirea redă o compoziție de vaccin care cuprinde compoziția așa cum a fost descrisă mai sus.

15 În plus, cazurile redau o metodă de tratare a leziunii cerebrale, cuprinzând administrarea unei compoziții care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

20 Figura 1: Analiza funcției neurologice și a abilităților motorii într-un model de I/R de ischemie-reperfuție cerebrală la șoarece folosind testul Screen inversat, la șoareci cu sau fără tratament cu *Blautia hydrogenotrophica*.

Figura 2: Analiza funcției neurologice și recunoașterea socială într-un model de șoarece I/R cu ischemie-reperfuție cerebrală folosind testul de recunoaștere socială, la șoareci cu sau fără tratament cu *Blautia hydrogenotrophica*.

25 **Figura 3:** Efectul *Blautia hydrogenotrophica* (10^{10} /zi timp de 14 zile) pentru producția de acizi grași cu lanț scurt (RMN ^1H) în conținutul cecal al șobolanilor HIM sănătoși.

Figura 4: evaluarea qPCR a populației de *B. hydrogenotrophica* în probe de fecale de șobolani IBS-HMA tratați sau nu cu o compoziție cuprinzând *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) timp de 28 de zile.

30 **Figura 5:** Concentrațiile de acizi grași cu lanț scurt (SCFA) în probe cecale de șobolani IBS-HMA tratați sau nu cu *B. hydrogenotrophica* (Blautix) timp de 28 de zile. **Figura 5A** prezintă concentrația totală de SCFA. **Figura 5B** prezintă concentrația de acid acetic, acid propionic și acid butiric.

35 **Figura 6:** Evaluarea histologică a probelor de țesut de la șoareci tratați cu compoziție bacteriană cuprinzând *B. hydrogenotrophica* (Blautix). **Figura 6A** prezintă scorul semicantitativ de picnoză a probelor de țesut histologice colorate cu H&E. Șoarecii la care s-a administrat compoziția conform invenției (5M) prezintă un scor de picnoză redus semnificativ în comparație cu șoarecii martor negativ (2M)

40 (p<0,0001). **Figura 6B** prezintă scorul semicantitativ de vacuolizare a probelor de țesut histologice colorate cu H&E. Șoarecii la care s-a administrat compoziția conform invenției (5M) prezintă un scor de vacuolizare redus semnificativ comparativ cu martorul negativ (2M) (p = 0,098). **Figura 6C** prezintă fotografiile reprezentative ale diapozitivelor colorate cu H&E - nucleii de neuroni picnotici întunecați și unele vacuole palide umflate în citoplasma unor neuroni afectați.

45 DEZVĂLUIREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

50 Compozițiile conform invenției cuprind o tulpină bacteriană din genul *Blautia*. Exemplele demonstrează că bacteriile din acest gen sunt utile pentru tratarea leziunii cerebrale. Tulpinile bacteriene preferate sunt din specia *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* și *Blautia wexlerae*. Alte tulpini bacteriene preferate pentru utilizarea în invenție sunt *Blautia producta*, *Blautia coccoides* și *Blautia hansenii*.

55 Exemple de tulpini de *Blautia* pentru utilizarea în invenție includ *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. glucerasea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* și *B. wexlerae*. Speciile *Blautia* sunt bacterii non-motile cu reacție Gram pozitivă, care pot fi fie coccoide, fie ovale și toate sunt obligatoriu anaerobe care produc acid acetic ca principal produs final al fermentării glucozei [23]. *Blautia* poate fi izolată din intestinul uman, deși *B. producta* a fost izolat dintr-o probă de septicemie.

60 *Blautia hydrogenotrophica* (cunoscută anterior sub numele de *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) a fost izolată din intestine de mamifere, este strict anaerobă și metabolizează

H₂/CO₂ la acetat, care poate fi important pentru nutriția umană. Tipul de tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* este S5a33 = DSM 14294 = JCM 14656. Numărul de acces GenBank pentru secvența genei ARNr 16S tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 este X95624.1 (dezvăluită aici ca SECV ID NR. 5). Această tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* exemplară este descrisă în [19] și [24]. Tulpina S5a33 și tulpina S5a36 corespund celor două subclone ale unei tulpini izolate dintr-o probă de fecale de la un subiect sănătos. Ele prezintă morfologie, fiziologie și metabolism identice și au secvențe identice de ARNr 16S. Astfel, în unele modalități de realizare, *Blautia hydrogenotrophica* pentru utilizarea în invenție are secvența de ARNr 16S a SECV ID NR:5.

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depusă sub numărul de acces DSM 14294 a fost testată în exemple și este denumită aici și tulpina BH și Blautix. Tulpina BH este tulpina preferată a invenției. Tulpina BH a fost depusă la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [German Microorganism Collection] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) sub numărul de acces DSM 14294 sub denumirea de "S5a33" la 10 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 cesiune. 4D Pharma Plc a autorizat, printr-un acord, 4D Pharma Research Limited să se refere la materialul biologic depus în cerere și și-a dat consimțământul fără rezerve și irevocabil pentru ca materialul depus să fie pus la dispoziția publicului.

Numărul de acces GenBank pentru secvența genei ARNr 16S a tulpinii de *Blautia stercoris* GAM6-1^T este HM626177 (dezvăluită aici ca SECV ID NR:1). O tulpină de *Blautia stercoris* exemplară este descrisă în [25]. Tipul de tulpină de *Blautia wexlerae* este WAL 14507 = ATCC BAA-1564 = DSM 19850 [19]. Numărul de acces GenBank pentru secvența genei ARNr 16S a tulpinii de *Blautia wexlerae* WAL 14507 T este EF036467 (dezvăluită aici ca SECV ID NR:2). Această tulpină de *Blautia wexlerae* exemplară este descrisă în [19].

O tulpină de *Blautia stercoris* preferată este tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42381, care este, de asemenea, denumită aici ca tulpina 830. O secvență de ARNr 16S pentru tulpina 830 este redată în SECV ID NR: 3. Tulpina 830 a fost depusă la autoritatea internațională de depozit NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) de GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) în 12 martie 2015 ca "*Blautia stercoris* 830" și i s-a atribuit numărul de acces NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. și-a schimbat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited

O tulpină de *Blautia wexlerae* preferată este tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42486, care este denumită de asemenea aici și tulpina MRX008. O secvență de ARNr 16S pentru tulpina MRX008 este redată în SECV ID NR: 4. Tulpina MRX008 a fost depusă la autoritatea internațională de depozitare NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) de către 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) în 16 noiembrie 2015 ca "*Blautia/Ruminococcus MRx0008*" și i s-a atribuit numărul de acces NCIMB 42486.

Tulpinile bacteriene strâns înrudite cu tulpina testată în exemple sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea leziunii cerebrale. În anumite modalități de realizare, tulpina bacteriană pentru utilizarea 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*. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR: 5.

În anumite modalități de realizare, tulpina bacteriană pentru utilizarea 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 stercoris*. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR: 1 sau SECV ID NR: 3. De preferință, identitatea secvenței este conform SECV ID NR: 3. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție are secvența de ARNr 16s reprezentată de SECV ID NR: 3. În anumite modalități de realizare, tulpina bacteriană pentru utilizarea 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 wexlerae*. De preferință, tulpina bacteriană pentru

utilizarea în invenție are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR: 2 sau SECV ID NR: 4. De preferință, identitatea secvenței este cu SECV ID NR: 4. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție are secvența de ARNr 16s reprezentată de SECV ID NR: 4.

5

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces DSM 14294 sau biotipurile bacteriilor depuse sub numerele de acces NCIMB 42381 și NCIMB 42486 sunt, de asemenea, de așteptat să fie eficiente pentru tratarea leziunii cerebrale. Un biotip este o tulpină strâns înrudită care are aceleași caracteristici fiziologice și biochimice sau unele deosebit de asemănătoare.

10

Tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486 și care sunt adecvate pentru utilizarea în invenție pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotide pentru o bacterie depusă sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 or NCIMB 42486. De exemplu, substanțial întregul genom poate fi secvențiat și o tulpină de biotip pentru utilizarea 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 pe întregul său genom). De exemplu, în unele modalități de realizare, o tulpină de 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 utilizarea în identificarea tulpinilor de biotip pot include hsp60 sau secvențe repetitive, cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)₅, sau REP sau [26]. Tulpinile de 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 depuse sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486. În unele modalități de realizare, 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 *Blautia hydrogenotrophica* depusă ca DSM 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 SECV ID NR: 5. În unele modalități de realizare, 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 *Blautia hydrogenotrophica* depusă ca DSM 14294 și are secvența de ARNr 16S a SECV ID NR: 5.

25

30

Alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486 și care sunt adecvate pentru utilizarea în invenție pot fi identificate prin utilizarea depozitului cu numărul de acces a DSM 14294, depozitului cu numărul de acces NCIMB 42381 sau depozitului cu numărul de acces NCIMB 42486 și analiza fragmentului de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismului de lungime a fragmentului amplificat prin fluorescență cu (FAFLP) și amprentarea repetată a elementelor de ADN (rep)-PCR, sau profilarea proteinelor, sau secvențierea parțială a ADNr 16S sau 23s. În modalități de realizare preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica altele tulpini de *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

35

40

În anumite modalități de realizare, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486 și care sunt adecvate pentru utilizarea în invenție sunt tulpini care oferă același model ca o bacterie depusă sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486 atunci când sunt analizate prin analiza de restricție a ADN-ului ribozomal amplificat (ARDRA), de exemplu atunci când se utilizează enzima de restricție Sau3AI (pentru metode exemplare și îndrumări vezi, de exemplu, [27]). Alternativ, tulpinile biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași modele de fermentare a carbohidraților ca o bacterie depusă sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486.

45

50

Alte tulpini de *Blautia* care sunt utile în compozițiile și metodele conform invenției, cum ar fi biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486, pot fi identificate folosind orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv analizele descrise în exemple. De exemplu, tulpinile pentru utilizarea în invenție pot fi identificate prin cultivarea bacteriilor și administrarea la șoareci pentru analiza prin testul de ocluzie. În special, pot fi utile în invenție, tulpini bacteriene care au modele de creștere, tip metabolic și/sau antigeni de suprafață similare cu o bacterie depusă sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486. O tulpină utilă va avea o activitate modulatorie de microbiotă comparabilă cu tulpina DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486. În special, o tulpină biotip va provoca

55

60

efecte comparabile asupra leziunilor cerebrale cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în Exemple.

O tulpină deosebit de preferată a invenției este tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depusă sub numărul de acces DSM 14294. Aceasta este o tulpină BH exemplară testată în exemple și despre care s-a demonstrat a fi eficientă pentru tratarea bolii. Prin urmare, invenția redă o celulă, cum ar fi o celulă izolată, a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* depusă sub numărul de acces DSM 14294, sau un derivat al acesteia, pentru utilizarea în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

Un derivat al tulpinii depuse sub numărul de acces DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat al unei tulpini conform invenției poate fi modificat, de exemplu, la nivel genetic, fără a abătiona activitatea biologică. În special, o tulpină derivată conform invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea o activitate modulatorie de microbiotă comparabilă cu tulpina inițială a DSM 14294, NCIMB 42381 sau NCIMB 42486. În special, o tulpină derivată va genera efecte comparabile asupra leziunii cerebrale cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate prin utilizarea unor protocoale de cultivare și administrare descrise în Exemple. Un derivat al tulpinii DSM 14294 va fi în general un biotip al tulpinii DSM 14294. Un derivat al tulpinii NCIMB 42381 va fi în general un biotip al tulpinii NCIMB 42381. Un derivat al tulpinii NCIMB 42486 va fi în general un biotip al tulpinii NCIMB 42486.

Referirile la celulele tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* depuse sub numărul de acces DSM 14294 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca și tulpinile depuse sub numărul de acces DSM 14294 și astfel de celule sunt cuprinse de invenție. Referirile la celulele tulpinii de *Blautia stercoris* depuse sub numărul de acces NCIMB 42381 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca și tulpinile depuse sub numărul de acces NCIMB 42381 și astfel de celule sunt cuprinse de invenție. Referirile la celulele tulpinii de *Blautia wexlerae* depuse sub numărul de acces NCIMB 42486 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca și tulpinile depuse sub numărul de acces NCIMB 42486 și astfel de celule sunt cuprinse de invenție.

În modalități de realizare preferate, tulpinile bacteriene din compozițiile conform invenției sunt viabile și capabile să colonizeze parțial sau total intestinul.

35 **Utilizări terapeutice**

Compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea leziunii cerebrale. Exemplele demonstrează că, compozițiile conform invenției ajută la recuperare și îmbunătățesc funcția neurologică, abilitățile motorii și recunoașterea socială într-un model de leziuni cerebrale de ocluzie la șoarece, astfel încât acestea pot fi utile pentru tratarea leziunii cerebrale.

În unele modalități de realizare, leziunea cerebrală este o leziune cerebrală traumatică. În unele modalități de realizare, leziunea cerebrală este o leziune cerebrală dobândită. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate dintr-un traumatism. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate dintr-o tumoră. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate dintr-un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate dintr-o hemoragie cerebrală. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate dintr-o encefalită. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate dintr-o hipoxie cerebrală. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale rezultate din anoxie cerebrală.

În modalități de realizare preferate, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea accidentului vascular cerebral. Efectele prezentate în exemple sunt deosebit de relevante pentru tratamentul accidentului vascular cerebral. Accidentul vascular cerebral apare atunci când fluxul sanguin către cel puțin o parte a creierului este întrerupt. Fără o aprovizionare cu o cantitate adecvată de sânge pentru a-i furniza oxigen și substanțe nutritive țesutului cerebral și pentru a elimina produsele uzate din țesutul cerebral, celulele creierului încep să moară rapid. Simptomele accidentului vascular cerebral sunt dependente de regiunea creierului care este

afectată de fluxul sanguin inadecvat. Simptomele includ paralizie, amorțeală sau slăbiciune a mușchilor, pierdere a echilibrului, amețeli, dureri bruște de cap severe, tulburări de vorbire, pierderea memoriei, pierderea capacității de raționament, confuzie bruscă, tulburări de vedere, comă sau chiar deces. Un accident vascular cerebral este, de asemenea, denumit atac cerebral sau

5 accident cerebrovascular (ACV). Simptomele accidentului vascular cerebral pot fi scurte dacă se restabilește un flux sanguin adecvat într-o perioadă scurtă de timp. Cu toate acestea, dacă fluxul sanguin inadecvat continuă o perioadă semnificativă de timp, simptomele pot fi permanente.

10 În modalități de realizare deosebit de preferate, compoziția conform invenției cuprinde o tulpină din specia de *Blautia hydrogenotrophica* și utilizarea sa în tratarea accidentului vascular cerebral.

În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral este ischemia cerebrală. Ischemia cerebrală rezultă atunci când există un flux sanguin insuficient către țesuturile cerebrale

15 pentru a satisface cererea metabolică. În unele modalități de realizare, ischemia cerebrală este ischemia cerebrală focală, adică limitată la o regiune specifică a creierului. În unele modalități de realizare ischemia cerebrală este ischemia cerebrală globală, adică cuprinde o zonă largă a țesutului cerebral. Ischemia cerebrală focală apare de obicei atunci când un vas cerebral a devenit fie parțial, fie complet blocat, reducând fluxul de sânge către o regiune specifică a creierului. În

20 unele modalități de realizare ischemia cerebrală focală este un accident vascular cerebral ischemic. În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral ischemic este trombotic, adică este provocat de un tromb sau cheag de sange, care se dezvoltă într-un vas cerebral și restricționează sau blochează fluxul sanguin. În unele modalități de realizare accidentul vascular cerebral ischemic este un accident vascular cerebral trombotic. În unele modalități de realizare, accidentul

25 vascular cerebral ischemic este embolic, adică este cauzat de un embol, sau de o masă neatașată care se deplasează prin fluxul sanguin și restricționează sau blochează fluxul de sânge într-un loc îndepărtat de punctul său de origine. În unele modalități de realizare accidentul vascular cerebral ischemic este un accident vascular cerebral embolic. Ischemia cerebrală globală apare de obicei atunci când fluxul de sânge către creier ca un întreg este blocat sau redus. În unele modalități de

30 realizare ischemia cerebrală globală este cauzată de hipoperfuzie, adică datorită unui șoc. În unele modalități de realizare ischemia cerebrală globală este rezultatul unui stop cardiac.

În unele modalități de realizare subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o ischemie cerebrală. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a

35 suferit o ischemie cerebrală focală. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un accident vascular cerebral ischemic. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit accident vascular cerebral trombotic. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un accident vascular cerebral embolic. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o ischemie cerebrală globală. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o hipoperfuzie. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un stop cardiac. Exemplele demonstrează că, compozițiile conform invenției pot fi deosebit de utile pentru a ajuta la recuperare în urma unor astfel de leziuni

40 cerebrale. În modalități de realizare deosebit de preferate, compoziția conform invenției cuprinde o tulpină din specia de *Blautia hydrogenotrophica* și este pentru utilizarea pentru tratarea unui

45 pacient care a suferit o ischemie cerebrală.

În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea ischemiei cerebrale. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt

50 pentru utilizarea la tratarea ischemiei cerebrale focale. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea accidentului vascular cerebral ischemic. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea accidentului vascular cerebral trombotic. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea accidentului vascular cerebral embolic. În unele

55 modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea ischemiei cerebrale globale. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea hipoperfuziei.

În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral este un accident vascular

60 cerebral hemoragic. Accidentul vascular cerebral hemoragic este cauzat de sangerări în sau în jurul creierului, având ca rezultat tumefierea, presiunea și deteriorarea celulelor și țesuturilor cerebrale.

Accidentul vascular cerebral hemoragic este de obicei rezultatul unui vas de sânge slăbit care se rupe și sângerează în creierul din jur. În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral hemoragic este o hemoragie intracerebrală, adică cauzată de sângerări în țesutul cerebral în sine. În unele modalități de realizare hemoragia intracerebrală este cauzată de o hemoragie intraparenchimală. În unele modalități de realizare hemoragia intracerebrală este cauzată de o hemoragie intraventriculară. În unele modalități de realizare accidentul vascular cerebral hemoragic este o hemoragie subarahnoidă, adică sângerare care apare în afara țesutului cerebral, dar încă în interiorul craniului. În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral hemoragic este rezultatul angiopatiei amiloide cerebrale. În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral hemoragic este rezultatul unui anevrism cerebral. În unele modalități de realizare, accidentul vascular cerebral hemoragic este un rezultat al malformației arteriovenoase cerebrale (AVM).

În unele modalități de realizare subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un accident vascular cerebral hemoragic. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o hemoragie intracerebrală. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o hemoragie intraparenchimală. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o hemoragie intraventriculară. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o hemoragie subarahnoidă. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o angiopatie amiloidă cerebrală. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un anevrism cerebral. În unele modalități de realizare, subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un AVM cerebral

În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unui accident vascular cerebral hemoragic. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei hemoragii intracerebrale. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei hemoragii intraparenchimale. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei hemoragii intraventriculare. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei hemoragii subarahnoidiene. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei angiopatii amiloide cerebrale. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unui anevrism cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unui AVM cerebral.

Restaurarea fluxului sanguin adecvat către creier după o perioadă de întrerupere, deși eficientă în ameliorarea simptomelor asociate cu un accident vascular cerebral, poate conduce, paradoxal, la deteriorarea ulterioară a țesutului cerebral. În timpul perioadei de întrerupere, țesutul afectat suferă de o lipsă de oxigen și substanțe nutritive, iar restabilirea bruscă a fluxului sanguin poate conduce la inflamații și distrugerii oxidative prin inducerea stresului oxidativ. Aceasta este cunoscută sub numele de leziune de reperfuzie și este bine documentată nu numai după un accident vascular cerebral, ci și după un atac de cord sau alte leziuni ale țesuturilor atunci când aportul de sange revine în țesut după o perioadă de ischemie sau lipsă de oxigen. În unele modalități de realizare subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit o leziune de reperfuzie ca rezultat al accidentului vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea leziunii de reperfuzie ca rezultat al accidentului vascular cerebral.

Un atac ischemic tranzitoriu (TIA), denumit adesea mini-accident vascular cerebral, este un semn de avertizare recunoscut pentru un accident vascular cerebral mai grav. Prin urmare, subiecții care au suferit unul sau mai multe TIA-uri prezintă un risc mai mare de accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul diagnosticat cu leziune cerebrală a suferit un TIA. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unui TIA. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale la un subiect care a suferit un TIA.

Hipertensiunea arterială, colesterolul ridicat în sânge, antecedentele familiale de accident vascular cerebral, bolile de inimă, diabetul, anevrismele cerebrale, malformațiile arteriovenoase, boala cu celule seceră, vasculita, tulburările de sângerare, utilizarea unor medicamente antiinflamatoare nesteroidiene (NSAID-uri), fumatul de tutun, băutul unor cantități mari de alcool,

consumul de droguri ilegal, obezitatea, lipsa activității fizice și o dietă nesănătoasă sunt toate considerate a fi factori de risc pentru accident vascular cerebral. În special, scăderea tensiunii arteriale s-a dovedit a fi concludentă pentru a preveni atât accidentele vasculare cerebrale ischemice, cât și cele hemoragice [28, 29]. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la tratarea unei leziuni cerebrale la un subiect care are cel puțin un factor de risc în ceea ce privește un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul are doi factori de risc în ceea ce privește un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul are trei factori de risc în ceea ce privește un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul are patru factori de risc în ceea ce privește un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul are mai mult de patru factori de risc în ceea ce privește un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul are hipertensiune arterială. În unele modalități de realizare subiectul are colesterol crescut în sânge. În unele modalități de realizare subiectul are antecedente familiale de accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare subiectul o boală de inimă. În unele modalități de realizare subiectul are diabet. În unele modalități de realizare subiectul are un anevrism cerebral. În unele modalități de realizare subiectul are malformații arteriovenoase. În unele modalități de realizare subiectul are vasculită. În unele modalități de realizare subiectul are o boală cu celule seceră. În unele modalități de realizare subiectul are o tulburare de sângerare. În unele modalități de realizare subiectul are antecedente de utilizare a unor medicamente antiinflamatoare nonsteroidiene (NSAID-uri). În unele modalități de realizare subiectul fumează tutun. În unele modalități de realizare subiectul bea cantități mari de alcool. În unele modalități de realizare subiectul utilizează droguri ilegale. În unele modalități de realizare subiectul este obez. În unele modalități de realizare subiectul este supraponderal. În unele modalități de realizare subiectul are o lipsă de activitate fizică. În unele modalități de realizare subiectul are o dietă nesănătoasă.

Exemplele demonstrează că, compozițiile conform invenției pot fi utile pentru tratarea leziunii cerebrale și pentru a ajuta la recuperare atunci când sunt administrate înainte de apariția evenimentului de leziune. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi deosebit de utile pentru tratarea leziunilor cerebrale atunci când sunt administrate subiecților cu risc de leziuni cerebrale, cum ar fi accidentul vascular cerebral. În modalități de realizare preferate, compoziția conform invenției cuprinde o tulpină din specia de *Blautia hydrogenotrophica* și este pentru utilizarea la tratarea unui pacient identificat cu risc de accident vascular cerebral.

În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea la reducerea distrugerilor provocate de o potențială leziune cerebrală, preferabil de un accident vascular cerebral. Compozițiile pot reduce distrugerile provocate, atunci când sunt administrate înainte de apariția potențialei leziuni cerebrale, în special atunci când sunt administrate unui pacient identificat ca fiind expus unui risc de leziune cerebrală.

Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție conform invenției reduce deteriorarea motorie după un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției tratează leziunea cerebrală prin reducerea distrugerii motorii. Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție conform invenției îmbunătățește funcția motorie după un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției tratează leziunea cerebrală prin îmbunătățirea funcției motorii. Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție conform invenției îmbunătățește forța musculară după un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției tratează leziunea cerebrală prin îmbunătățirea forței musculare. Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție conform invenției îmbunătățește memoria după un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției tratează leziunea cerebrală prin îmbunătățirea memoriei. Exemplele arată că tratamentul cu o compoziție conform invenției îmbunătățește recunoașterea socială după un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției tratează leziunea cerebrală prin îmbunătățirea recunoașterii sociale. Exemplele demonstrează că tratamentul cu o compoziție conform invenției îmbunătățește funcția neurologică după un accident vascular cerebral. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției tratează leziunea cerebrală prin îmbunătățirea funcției neurologice.

Așa cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene conform invenției pot fi eficiente pentru tratarea leziunii cerebrale. În anumite modalități de realizare, compoziția poate fi sub forma unei culturi bacteriene. În unele modalități de realizare, compoziția poate fi de preferință un liofilizat.

Tratamentul leziunii cerebrale se poate referi, de exemplu, la ameliorarea severității simptomelor. Tratamentul leziunii cerebrale se poate referi, de asemenea, la reducerea afecțiunilor neurologice după accident vascular cerebral. Compozițiile conform invenției pentru utilizare în
 5 tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate subiectului înainte de debutul accidentului vascular cerebral, de exemplu la un pacient identificat ca fiind cu risc de accident vascular cerebral. Compozițiile conform invenției pentru utilizarea în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate după apariția unui accident vascular cerebral, de exemplu, în timpul recuperării. Compozițiile conform invenției pentru utilizarea în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi
 10 furnizate în timpul fazei acute de recuperare (adică până la o săptămână după un accident vascular cerebral). Compozițiile conform invenției pentru utilizarea în tratarea unui accident vascular cerebral pot fi furnizate în timpul fazei subacute de recuperare (adică de la o săptămână până la trei luni după un accident vascular cerebral). Compozițiile conform invenției pentru utilizarea în tratarea unui accident vascular cerebral pot fi furnizate în timpul fazei cronice de recuperare (de la
 15 trei luni după un accident vascular cerebral).

În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea în combinație cu un agent activ secundar. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizarea în combinație cu aspirină sau un activator plasminogen tisular (tPA). Alți agenți secundari includ alte antiplachetare (cum ar fi clopidogrel), anticoagulante (cum
 20 ar fi heparine, warfarină, apixaban, dabigatran, edoxaban sau rivaroxaban), antihipertensive (cum ar fi diuretice, inhibitori ai ACE, blocante ale canalelor de calciu, beta-blocante sau alfa-blocante) sau statine. Compozițiile conform invenției pot îmbunătăți răspunsul pacientului la agentul activ secundar.

Deși există multe mecanisme asociate cu patogeneza accidentului vascular cerebral, numeroase studii au arătat că stresul oxidativ, inflamația și apoptoza sunt factorii cheie pentru progresarea patogenă a acestuia [30, 31]. Se înțelege că o creștere rapidă a speciilor reactive de
 30 oxigen (ROS) imediat după un accident vascular cerebral depășește apărările antioxidante existente provocând leziuni tisulare. Astfel de ROS stimulează, de asemenea, eliberarea de citokine inflamatorii și metaloproteinaze matrice care cresc permeabilitatea barierei hematoencefalice și traficul de leucocite. Superoxid dismutaza (SOD) este un antioxidant endogen care joacă un rol în prevenirea leziunii oxidative. Prin urmare, îmbunătățirea activităților
 35 antioxidante din creier, cum ar fi cele ale SOD, este benefică pentru ameliorarea distrugerii neuronale. În plus, reacțiile inflamatorii agravează leziunile cerebrale în timpul și după un accident vascular cerebral. Stresul oxidativ și inflamația pot avea ca rezultat apoptoza neuronală, care poate fi responsabilă de moartea celulelor neuronale după un accident vascular cerebral.

Butiratul este un acid gras cu lanț scurt (SCFA), sintetizat prin fermentarea fibrelor altfel nedigerabile de către bacteriile din colon. A fost sugerat că butiratul este neuroprotector, că reduce permeabilitatea barierei hematoencefalice după un accident vascular cerebral, că reduce stresul
 40 oxidativ, că are efecte antiinflamatorii, că inhibă apoptoza neuronală și că promovează supraviețuirea celulară generală, repararea țesuturilor și recuperarea după un accident vascular cerebral [32, 33, 34, 35, 36].

În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc scorul de picnoză și/sau vacuolizare al unui țesut. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc scorul de picnoză și/sau vacuolizare al unui țesut care a fost supus ischemiei. Exemplele demonstrează că, compozițiile conform invenției reduc deteriorarea
 50 țesutului, măsurată prin picnoză și vacuolizare. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției reduc efectul ischemiei asupra țesuturilor. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției reduc gradul de deteriorare a țesuturilor cauzată de ischemie. În anumite modalități de realizare, țesuturile deteriorate de ischemie sunt țesuturile cerebrale. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției reduc necroza sau numărul de
 55 celule necrotice. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției reduc apoptoza sau numărul de celule apoptotice. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției reduc numărul de celule necrotice și apoptotice. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției previn moartea celulelor prin necroză și/sau apoptoză. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției previn moartea celulelor prin necroză și/sau
 60 apoptoză cauzată de ischemie. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc recuperarea țesutului deteriorat de ischemie. În anumite modalități de realizare,

compozițiile conform invenției îmbunătățesc viteza de eliminare a celulelor necrotice și/sau a celulelor apoptotice. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc eficacitatea eliminării celulelor necrotice și/sau a celulelor apoptotice. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc înlocuirea și/sau regenerarea celulelor din țesuturi. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc înlocuirea și/sau regenerarea celulelor din țesuturile deteriorate de ischemie. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției îmbunătățesc histologia globală a țesutului (de exemplu, la o biopsie).

10 **Moduri de administrare**

Preferabil, compozițiile conform invenției trebuie să fie administrate în tractul gastro-intestinal pentru a permite eliberarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană din invenție. În general, compozițiile conform invenției sunt administrate pe cale orală, dar pot fi administrate rectal, intranazal sau pe cale bucală sau sublinguală.

15 În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției pot fi administrate sub formă de spumă, sub formă de spray sau gel.

20 În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției pot fi administrate ca supozitor, cum ar fi un supozitor rectal, de exemplu sub forma unui ulei de teobrom (unt de cacao), grăsimi sintetice dure (de exemplu, suppicire, witepsol), compoziție de glicero-gelatină, de polietilen glicol sau săpun glicerină.

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

30 Compozițiile conform invenției pot fi administrate o singură dată sau pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției trebuie administrate zilnic. Exemplele demonstrează că administrarea oferă o colonizare de succes și beneficii clinice în tratamentul leziunii cerebrale.

35 În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt administrate regulat, cum ar fi zilnic, la fiecare două zile sau săptămânal, pentru o perioadă extinsă de timp, cum ar fi cel puțin o săptămână, două săptămâni, o lună, două luni, șase luni, sau un an. Exemplele demonstrează că administrarea de BH este posibil să nu aibă ca rezultat colonizarea permanentă a intestinelor, astfel încât administrarea regulată pentru perioade lungi de timp poate oferi beneficii terapeutice mai mari.

40 În unele modalități de realizare compozițiile conform invenției sunt administrate timp de 7 zile, 14 zile, 16 zile, 21 zile sau 28 zile sau nu mai mult de 7 zile, 14 zile, 16 zile, 21 zile sau 28 zile. De exemplu, în unele modalități de realizare compozițiile conform invenției sunt administrate timp de 16 zile. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt administrate timp de 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 luni, peste 6 luni sau peste 1 an.

50 În anumite modalități de realizare ale invenției, tratamentul conform invenției este însoțit de evaluarea microbiotei intestinale a pacientului. Tratamentul poate fi repetat dacă nu se obține eliberarea și/sau colonizarea parțială sau totală cu tulpina conform invenției, astfel încât eficacitatea nu este respectată sau tratamentul poate fi încetat dacă liberarea și/sau colonizarea parțială sau totală au succes și se observă eficacitatea.

55 În anumite modalități de realizare, compoziția conform invenției poate fi administrată unui animal gestant, de exemplu un mamifer, cum ar fi un om, pentru a trata leziunile cerebrale care se dezvoltă la copilul său *in utero* și/sau după ce se naște.

60 Compozițiile conform invenției pot fi administrate unui pacient care a fost diagnosticat cu leziune cerebrală sau cu o boală sau afecțiune asociată cu leziunea cerebrală sau care a fost identificat ca având un risc de leziune cerebrală.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate unui pacient care a fost identificat ca

având o microbiotă intestinală anormală. De exemplu, pacientul poate avea o colonizare redusă sau absentă cu *Blautia*, și în particular *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

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

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

15 În unele modalități de realizare, subiectul căruia i se administrează compoziția este un om adult. În unele modalități de realizare, subiectul căruia i se administrează compoziția este un copil sugar.

Compoziții

20 În general, compoziția conform invenției cuprinde bacteria. În modalități de realizare preferate ale invenției, compoziția este formulată sub formă uscată prin înghețare. De exemplu, compoziția conform invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină tare, cuprinzând o tulpină bacteriană conform invenției.

25 Preferabil, compoziția conform invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine stabilită și o ghidare relevantă este disponibilă, de exemplu, în referințe [37-39]. Compozițiile liofilizate pot fi deosebit de eficiente. În modalități de realizare preferate, compoziția conform invenției cuprinde bacterii liofilizate și este pentru tratamentul leziunii cerebrale.

30 Alternativ, compoziția conform invenției poate cuprinde o cultură bacteriană vie, activă. În unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției nu a fost inactivată, de exemplu, nu a fost inactivată termic. În unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției nu a fost ucisă, de exemplu, nu a fost ucisă la căldură. În unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției nu a fost atenuată, de exemplu, nu a fost atenuată la căldură. De exemplu, în unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției nu a fost ucisă, inactivată și/sau atenuată. De
35 De exemplu, în unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției este vie. De exemplu, în unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției este viabilă. De exemplu, în unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției este capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul. De exemplu,
40 în unele modalități de realizare, tulpina bacteriană din compoziția conform invenției este viabilă și capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul.

În unele modalități de realizare, compoziția cuprinde un amestec de tulpini bacteriene vii și tulpini bacteriene care au fost ucise.

45 În modalități de realizare preferate, compoziția conform invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinii bacteriene în intestin. Încapsularea protejează compoziția împotriva degradării până la eliberarea în locația țintă prin, de exemplu, ruperea cu stimuli chimici sau fizici, cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificările de pH. Poate fi utilizată orice metodă adecvată de încapsulare. Tehnici de încapsulare
50 exemplare includ prinderea într-o matrice poroasă, atașarea sau adsorbția pe suprafețe purtătoare solide, autoagregarea prin floclare sau cu agenți de reticulare și oprirea mecanică în spatele unei membrane microporoase sau a unei microcapsule. Ghidare privind încapsularea care pot fi utile pentru prepararea compozițiilor conform invenției sunt disponibile, de exemplu, în referințe [40-
55 41].

60 Compoziția poate fi administrată oral și poate fi sub formă de tabletă, capsulă sau pulbere. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece *Blautia* sunt anaerobe. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse drept captatori de oxigen și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți eliberarea și/sau colonizarea parțială sau totală și supraviețuirea *in vivo*. Alternativ, compoziția probiotică conform invenției poate fi administrată pe cale orală ca produs

alimentar sau nutrițional, cum ar fi lapte sau produs lactat din zer fermentat, sau ca produs farmaceutic.

Compoziția poate fi formulată ca un probiotic.

O compoziție conform invenției include o cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană din invenție. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a rezulta în eliberarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului pacientului.

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

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

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

Tipic, un probiotic, cum ar fi într-o compoziție conform invenției, este opțional combinat cu cel puțin un compus prebiotic adecvat. Un compus prebiotic este de obicei un carbohidrat nedigerabil, cum ar fi un oligo- sau polizaharidă, sau un alcool de zahăr, care nu este degradat sau absorbit în tractul digestiv superior. Prebioticele cunoscute includ produse comerciale precum inulina și transgalacto-oligozaharidele.

În anumite modalități de realizare, compoziția probiotică conform prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 la aproximativ 30% în greutate, în raport cu greutatea totală a compoziției, (de exemplu de la 5 la 20% în greutate). Carbohidrații pot fi selectați din grupul constând din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu lanț scurt, inulină, izomalț-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitozan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, amidon gumăarabică modificată și amidonuri rezistente, polidextroză, D-tagatoză, fibre de acacia, roșcove, ovăz și fibre de citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharidele cu lanț scurt (pentru simplitate prezentate mai jos ca FOS-c.c); respectivele FOS-c.c. menționate nu sunt carbohidrați digerabili, obținuți în general prin conversia zahărului de sfeclă și incluzând o moleculă de zaharoză la care sunt legate trei molecule de glucoză.

Compozițiile conform invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemple de astfel de excipienți pot fi găsiți în referința [42]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru uz terapeutic sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referința [43]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metilceluloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și alții asemenea. Exemple de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi selectată în ceea ce privește calea de administrare intenționată și practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau, în plus față de, purtător, excipient sau diluant orice liant(i) adecvat(i), lubrifiant(i), agent(i) de suspendare, agent(i) de acoperire, agent(i) de solubilizare. Exemple de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale cum ar fi glucoză, lactoză anhidră, lactoză având curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitori de porumb, gume naturale și sintetice, cum ar fi acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetilceluloză și polietilenglicol. Exemple de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și alții asemenea. În compoziția farmaceutică pot fi furnizați conservanți, stabilizatori, coloranți și chiar agenți de aromatizare. Exemple de conservanți includ benzoat de sodiu, acid sorbic, cisteină și esteri ai acidului p-hidroxibenzoic, de exemplu, în unele modalități de realizare, conservantul este selectat dintre benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri ai acidului p-hidroxibenzoic. Pot fi utilizați de

asemenea antioxidanți și agenți de suspendare. Un alt exemplu de purtător adecvat este zaharoza. Un alt exemplu de conservant este cisteina.

Compozițiile conform invenției pot fi formulate ca un produs alimentar. De exemplu, un produs alimentar poate oferi beneficii nutriționale pe lângă efectul terapeutic al invenției, cum ar fi într-un supliment nutritiv. Similar, un produs alimentar poate fi formulat pentru a spori gustul compoziției conform invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă de consumat, fiind mai asemănătoare cu un produs alimentar comun, mai degrabă decât cu o compoziție farmaceutică. În anumite modalități de realizare, compoziția conform invenției este formulată ca un produs pe bază de lapte. Termenul "produs pe bază de lapte" înseamnă orice produs pe bază de lapte sau zer, lichid sau semisolid, 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 nicio prelucrare sau un produs prelucrat, cum ar fi iaurt, lapte cașat, caș, lapte acru, lapte acru integral, lapte cu unt și alte produse din lapte acru. Un alt grup important include băuturile din lapte, cum ar fi băuturile din zer, laptele fermentat, laptele condensat, laptele pentru sugari sau bebeluși; lapte aromat, înghețată; alimente care conțin lapte, cum ar fi dulciurile.

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

În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției conțin o singură tulpină sau specie bacteriană și nu conțin alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot cuprinde numai *de minimis* sau cantități irelevante din punct de vedere biologic din alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial liberă de alte specii de organisme. În unele modalități de realizare, astfel de compoziții pot fi un liofilizat care este substanțial liber de alte specii de organisme.

În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene din genul *Blautia*, de exemplu, o *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin niciun alt gen bacterian sau care cuprind numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii dintr-un alt gen. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind o singură specie de *Blautia*, de exemplu, o *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin alte specii bacteriene sau care cuprind numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii din altă specie. În anumite modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind o singură tulpină de *Blautia*, de exemplu, de *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin alte tulpini sau specii bacteriene sau cuprind numai *de minimis* sau cantități biologice irelevante de bacterii de la o altă tulpină sau specie.

În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind mai mult de o specie sau tulpină bacteriană. De exemplu, în unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind mai mult de o tulpină din cadrul 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 tulpini), și, opțional, nu conțin bacterii din nicio altă specie. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind mai puțin de 50 tulpini din cadrul 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 nicio altă specie. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, sau 31-50 tulpini din cadrul aceleiași specii și, opțional, nu conțin bacterii din nicio altă specie. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind mai mult de o specie din cadrul 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 specii), și, opțional, nu conțin bacterii din niciun alt gen. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind mai puțin de 50 specii din cadrul 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 niciun alt gen. În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției cuprind 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, sau 31-50 specii din cadrul aceluiași gen și, opțional, nu conțin bacterii din niciun alt gen. Invenția cuprinde orice combinație a celor de mai sus.

În unele modalități de realizare, compoziția cuprinde un consorțiu microbian. De

exemplu, în unele modalități de realizare, compoziția cuprinde tulpina bacteriană de *Blautia* ca parte a unui consorțiu microbial. De exemplu, în unele modalități de realizare, tulpina bacteriană *Blautia* este prezentă în combinație cu una sau mai multe (de exemplu, cel puțin 2, 3, 4, 5, 10, 15 sau 20) alte tulpini bacteriene din alte genuri cu care poate trăi simbiotic *in vivo* în intestin. De exemplu, în unele modalități de realizare, compoziția cuprinde o tulpină bacteriană de *Blautia hydrogenotrophica* în combinație cu o tulpină bacteriană dintr-un gen diferit. În unele modalități de realizare, consorțiul microbial cuprinde două sau mai multe tulpini bacteriene obținute dintr-o probă de fecale dintr-un singur organism, de exemplu, un om. În unele modalități de realizare, consorțiul microbial nu se găsește împreună în natură. De exemplu, în unele modalități de realizare, consorțiul microbial cuprinde tulpini bacteriene obținute din probe de fecale de la cel puțin două organisme diferite. În unele modalități de realizare, cele două organisme diferite provin din aceeași specie, de exemplu doi oameni diferiți. În unele modalități de realizare, cele două organisme diferite sunt un sugar uman și un adult uman. În unele modalități de realizare, cele două organisme diferite sunt un mamifer uman și unul non-uman.

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

În unele modalități de realizare în care compoziția conform invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, specie sau gen, tulpinile, speciile sau genurile bacteriene individuale pot fi pentru administrarea separată, simultană sau secvențială. De exemplu, compoziția poate cuprinde toate cele mai mult de o tulpină, specie sau gen bacteriene, sau tulpinile, speciile sau genurile bacteriene pot fi stocate separat și administrate separat, simultan sau secvențial. În unele modalități de realizare, toate cele mai mult de o tulpină, specie sau gen bacterian sunt depozitate separat dar sunt amestecate împreună înainte de utilizare.

În unele modalități de realizare, tulpina bacteriană pentru utilizarea în invenție este obținută din fecale de la un adult uman. În unele modalități de realizare în care compoziția conform invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, în care toate tulpinile bacteriene sunt obținute din fecale de la un adult uman sau dacă sunt prezente alte tulpini bacteriene, acestea sunt prezente numai în cantități *de minimis*. Este posibil ca bacteriile să fi fost cultivate după ce au fost obținute din fecale de adult uman și utilizate într-o compoziție conform invenției.

În unele modalități de realizare, respectiva una sau mai multe tulpinile bacteriene de *Blautia* este/sunt singurul(i) agent(i) activ(i) terapeutic dintr-o compoziție conform invenției. În unele modalități de realizare, tulpina(ile) bacteriană(e) din compoziție este/sunt singurul(i) agent(i) terapeutic(i) activ(i) dintr-o compoziție conform invenției.

Compozițiile pentru utilizarea în conformitate cu invenția pot necesita sau nu aprobarea de punere pe piață.

În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană menționată este liofilizată. În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană menționată este uscată prin pulverizare. În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care este vie. În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care este viabilă. În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care este capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul. În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau uscată prin pulverizare și în care 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 se efectuează prin utilizarea unui diluant descris aici.

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

- 5 În anumite modalități de realizare, invenția redă o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană conform invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare atunci când este administrată unui subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este leziunea cerebrală.
- 10 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de la aproximativ 1×10^3 la aproximativ 1×10^{11} unități formatoare de colonie pe gram față de greutatea compoziției.
- 15 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care compoziția este administrată la o doză de 1 g, 3 g, 5 g sau 10 g.
- 20 În anumite modalități de realizare, invenția redă 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.
- 25 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un purtător selectat din grupul constând din lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol și sorbitol.
- 30 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză având curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitor de porumb, acacia, tragacant, alginat de sodiu, carboximetilceluloză, polietilenglicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.
- 35 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând în plus cel puțin unul dintre un conservant, un antioxidant și un stabilizator.
- 40 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un conservant selectat din grupul constând din benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri ai acidului p-hidroxibenzoic.
- 45 În anumite modalități de realizare, invenția redă compoziția farmaceutică de mai sus, în care atunci când compoziția este depozitată într-un container sigilat la aproximativ 4°C sau aproximativ 25°C și containerul este plasat într-o atmosferă cu 50% umiditate relativă, rămâne cel puțin 80% din tulpina bacteriană măsurată în unități formatoare de colonii, după o perioadă de cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.
- 50 În unele modalități de realizare, compoziția conform invenției este furnizată într-un container sigilat cuprinzând o compoziție așa cum este descrisă aici. În unele modalități de realizare, containerul sigilat este un săculeț sau o sticlă. În unele modalități de realizare, compoziția conform invenției este furnizată într-o seringă care cuprinde o compoziție așa cum este descrisă aici.
- 55 Compoziția conform prezentei invenții poate fi, în unele modalități de realizare, furnizată ca o formulare farmaceutică. De exemplu, compoziția poate fi furnizată sub formă de tabletă sau capsulă. În unele modalități de realizare, capsula este o capsulă de gelatină ("gel-cap").
- 60 În unele modalități de realizare, compozițiile conform invenției sunt administrate oral. Administrarea orală poate presupune înghițirea, astfel încât compusul să intre în tractul gastro-

intestinal și/sau administrarea bucală, linguală sau sublinguală prin care compusul pătrunde în fluxul sanguin direct din gură.

Formulările farmaceutice adecvate pentru administrare orală includ dopuri solide, microparticule solide, semi-solide și lichide (incluzând faze multiple sau sisteme dispersate), cum ar fi tablete; capsule moi sau dure care conțin multi sau nano particule sau, lichide (de exemplu, soluții apoase), emulsii sau pulberi; pastile (inclusiv umplute cu lichid); produse pentru mestecat; geluri; forme de dozare cu dispersare rapidă; filme; ovule; spray-uri; și plasturi bucali/mucoadezivi.

În unele modalități de realizare formularea farmaceutică este o formulare enterică, adică o formulare gastro-rezistentă (de exemplu, rezistentă la pH gastric) care este adecvată pentru eliberarea compoziției conform invenției în intestin prin administrare orală. Formulările enterice pot fi deosebit de utile atunci când bacteriile sau o altă componentă a compoziției este sensibilă la acid, de exemplu predispus la degradare în condiții gastrice.

În unele modalități de realizare, formularea enterică cuprinde o acoperire enterică. În unele modalități de realizare, 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 eliberarea orală. Formularea poate cuprinde o acoperire cu film, de exemplu, un strat subțire de film dintr-un polimer enteric, de exemplu un polimer insolubil în acid.

În unele modalități de realizare, formularea enterică este enterică intrinsec, de exemplu, gastro-rezistentă fără a fi necesară o acoperire enterică. Astfel, în unele modalități de realizare, formularea este o formulare enterică care nu cuprinde o acoperire enterică. În unele modalități de realizare, formularea este o capsulă obținută dintr-un material termogelifiant. În unele modalități de realizare, materialul termogelifiant este un material celulozic, cum ar fi metilceluloza, hidroximetilceluloza sau hidroxipropilmetilceluloza (HPMC). În unele modalități de realizare, capsula cuprinde o carcasă care nu conține nici un polimer care formează film. În unele modalități de realizare, capsula cuprinde o carcasă, iar carcasa cuprinde hidroxipropilmetilceluloză și nu cuprinde niciun polimer care formează film (de exemplu, vezi [44]). În unele modalități de realizare, formularea este o capsulă enterică intrinsecă (de exemplu, Vcaps® de la Capsugel).

În unele modalități de realizare, formularea este o capsulă moale. Capsulele moi sunt capsule care, datorită adăugărilor de agenți de înmuiere, cum ar fi, de exemplu, glicerol, sorbitol, maltitol și polietilenglicoli, prezenți în carcasa capsulei, au 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 de administrare, cum ar fi, de exemplu, orală sau rectală, capsulele moi pot avea diferite forme, 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 de picurare sau suflare.

Metode de cultivare

Tulpinile bacteriene pentru utilizarea în prezenta invenție pot fi cultivate folosind tehnici standard de microbiologie, așa cum sunt detaliate în, de exemplu, referințele [45-47].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi de exemplu agar YCFA sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (pe 100 ml, 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), resazurină (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).

General

Practicarea prezentei invenții va folosi, cu excepția cazului în care este indicat altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în cadrul abilităților din domeniu. Astfel de tehnici sunt explicate pe deplin în literatura de specialitate. Vezi, de exemplu, referințele [48-55], etc.

Termenul "cuprinzand" cuprinde "incluzand", 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 raport cu o valoare numerică x este opțional și înseamnă, de exemplu, $x \pm 10\%$.

Cuvantul "substanțial" nu exclude "complet" *de exemplu* o compoziție care este "substanțial liberă" de Y poate fi complet liberă de Y. Acolo unde este necesar, cuvântul "substanțial" poate fi omis din definiția invenției.

Referirile la o identitate procentuală a secvenței între două secvențe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, acel procent de nucleotide este același la compararea celor două secvențe. Această aliniere și procentul de omologie sau identitate de secvență pot fi determinate utilizând programe software cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [56]. O aliniere preferată este determinată de algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman folosind o căutare de decalaj afină cu o penalizare de decalaj deschis de 12 și o penalizare de extensie a decalajului de 2, matricea BLOSUM de 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este dezvăluit în ref. [57].

Cu excepția cazului în care este menționat specific, un procedeu sau o metodă care cuprinde numeroase etape poate cuprinde etape suplimentare la începutul sau la sfârșitul metodei sau poate cuprinde etape suplimentare intermediare. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau efectuate într-o ordine alternativă, dacă este cazul.

Sunt descrise aici diferite modalități de realizare ale invenției. Se va aprecia că, caracteristicile specificate în fiecare modalitate de realizare pot fi combinate cu alte caracteristici specificate, pentru a furniza alte modalități de realizare. În special, modalitățile de realizare evidențiate aici ca fiind adecvate, tipice sau preferate pot fi combinate între ele (cu excepția cazului în care se exclud reciproc).

MODURI DE EFECTUARE A INVENȚIEI

Exemplul 1 - Testarea stabilității

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

Exemplul 2 - Efecte protectoare asupra ischemiei cerebrale la șoareci

Rezumat

Au fost testate cinci grupuri (1M, 2M, 3M, 4M și 5M) de 15-20 șoareci. Numai animalele cu un comportament normal au fost incluse în studiu. Prima zi de dozare a fost Ziua -14. Grupurile 1M și 2M au primit zilnic o soluție martor de PBS din prima zi de dozare până la terminare. Grupul 4M a primit zilnic un martor de pulbere liofilizată din prima zi de dozare până la terminare. Grupul 5M a primit zilnic bacterii uscate prin înghețare din prima zi de dozare până la terminare. Toate tratamentele au fost administrate în a doua jumătate a zilei de lucru. Ordinea de tratament a grupurilor a fost alternată aleatoriu în fiecare zi de studiu. În ziua 1, toți șoarecii au fost anesteziați. În partea ventrală a gâtului s-a efectuat o incizie pe linia mediană, pentru a expune arterele carotide comune dreaptă și stângă. Apoi în grupurile 2M, 3M, 4M și 5M a fost indus un model I/R de ischemie-reperfuzie cerebrală prin ocluzia bilaterală a arterei carotide comune (BCCAO) folosind cleme vasculare, timp de 15 minute. La sfârșitul fiecărei ocluzii, clemele au fost îndepărtate. Grupul 1M, grupul fals operat, a suferit aceeași procedură chirurgicală, dar fără ocluzie a arterelor carotide. Grupul 3M a primit o injecție de MK-801 ca martor pozitiv imediat după operație. Pentru a menține tratamentul cât mai similar posibil, grupurile 1M, 2M, 4M și 5M au fost, de asemenea, injectate cu soluție salină steril imediat după operație. Jumătate din fiecare grup a fost terminată în ziua 15 și cealaltă jumătate a fost terminată în ziua 29.

Tulpina

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depusă sub numărul de acces DSM 14294.

Program de administrare

Grup Nr.	Nr. de animale	Tratament	Nivel doză (mg/kg)	Volume (ml/kg ml/animal)	doză sau	Cale de administrare
1M	15	PBS (martor fals operat)	n/a	10		PO
2M	20	PBS (martor negativ)	n/a	10		
3M	20	MK-801 (martor pozitiv)	3mg/kg (imediat după operația chirurgicală)	10		IP
4M	20	Pulbere uscată prin înghețare	7,8 mg în 100 μ l	100 μ l pe animal		PO
5M	20	Bacterii uscate prin înghețare	15,6 mg în 100 μ l (doză bacterii = 2×10^8)	100 μ l pe animal		

5 **Model de studiu**

Zilele -14 la 14: Doza zilnică de martor PBS (grupuri 1M și 2M), martor pulbere uscată prin înghețare (grupul 4M) sau bacterii uscate prin înghețare (grupul 5M).

10 Ziua 1: Modelul I/R de ischemie-reperfuzie cerebrală indusă în grupurile 2M, 3M, 4M și 5M prin intervenție chirurgicală; grupul 1M (martor operat fals) a fost operat, dar fără ocluzia arterelor carotide. Grupul 3M a primit MK-801, iar grupurile 1M, 2M, 3M și 5M au primit soluție salină sterilă, imediat după operație.

15 Ziua 15: Jumătate din șoarecii din fiecare grup au fost terminați.

Ziua 15 la 28: Doza zilnică de PBS martor (grupurile 1M și 2M), pulbere uscată prin înghețare martor (grupul 4M) sau bacterii liofilizate (grupul 5M) pentru șoarecii rămași din fiecare grup.

20 Ziua 29: Terminarea șoarecilor rămași.

Alte variabile de studiu

Mortalitatea și morbiditatea tuturor șoarecilor au fost verificate de două ori pe zi.

25 Măsurătorile greutateilor corporale ale tuturor șoarecilor au fost efectuate de două ori pe săptămână.

30 Probe de sânge (100 μ L fiecare) au fost colectate în decurs de 2-3 ore într-o ordine randomizată în tuburi de litiu-heparină de la fiecare șoarece, înainte de tratament până în ziua -14. În ziua 15, au fost prelevate 150 μ L probe de sânge de la toți șoarecii, jumătate din cantitate a fost luată în tuburi de Li-heparină și cealaltă jumătate în tuburi EDTA. După prelevarea de sânge, jumătate din șoareci au fost terminați. În ziua 29, aceeași procedură de prelevare de sânge a fost aplicată pentru a doua jumătate dintre șoareci.

35 Peletele de fecale au fost, de asemenea, colectate la trei momente de timp: Ziua -14, Ziua 15 și Ziua 29. Fiecare prelevare a fost efectuată într-un mediu steril (complet aseptice = curățat între animale), fiecare șoarece fiind scos din cușcă și plasat separat într-o nouă cutie sterilă pentru recoltarea individuală a peletelor. Au fost colectate cat mai multe pelete posibil pentru a se atinge un minim de 80 mg și, de preferință, 100 mg de material pe șoarece.

40 **Test cu ecran inversat**

Un test cu ecran inversat a fost efectuat în Ziua -2/-1 (linia de bază), Ziua 14 și Ziua 28. Într-un test cu ecran inversat exemplar ([58], [59]), șoarecii neinstruiți sunt așezați individual deasupra unui ecran din plasă de sârmă care este montat orizontal pe o tijă metalică deasupra unei suprafețe captușite. Tijă este apoi rotită cu 180° astfel încât șoarecii să fie pe partea de jos a

ecranului. Se înregistrează timpul necesar ca șoarecele să cadă din partea de jos a ecranului pe suprafața căptușită.

- 5 Un test cu ecran inversat poate măsura timpul în câteva secunde sau poate utiliza scorul de deficit neurologic: căderea între 1-10 secunde = 1; care se încadrează între 11-25 sec = 2; care se încadrează între 26-60 sec = 3; care se încadrează între 61-90 sec = 4; căderea după 90 sec = 5.

Test de recunoaștere socială

- 10 Un test de recunoaștere socială a fost efectuat în ziua -2/-1 (linia de bază), ziua 14 și ziua 28. Într-un test de recunoaștere socială exemplar (60), fiecare șoarece de testat este plasat individual într-o cușcă care are o dimensiune similară cu aceea a cuștii de acasă și lăsat să se aclimatizeze în cușcă timp de aproximativ 30 de minute. Un al doilea șoarece țință este apoi plasat în cușcă cu șoarecele de testat. Durata totală a investigației sociale, definită ca adulmecare și urmărire apropiată (<2 cm distanță de baza cozii) a șoarecului țință sunt înregistrate pe o perioadă de 2 minute. Timpul petrecut investigând șoarecele țință în primul test este notat T1. Testul este apoi repetat o oră mai târziu folosind același șoarece țință. Timpul petrecut investigând șoarecele țință în al doilea test este notat T2. Un șoarece de testat cu un T2 mai mic decât T1 demonstrează recunoaștere socială (adică recunoașterea unui șoarece țință familiar în testul de repetare duce la mai puțină investigație și un T2 mai mic decât T1).

Rezultate

- 20 Rezultatele testului ecranului inversat sunt prezentate în Figura 1. Axa y din Figura 1 reprezintă valoarea de la linia de bază în secunde minus valoarea ulterioară în secunde (Ziua 14 sau 28 în funcție de axa x). Axa y reprezintă prin urmare schimbarea timpului înainte de cădere, în raport cu linia de bază. Deoarece axa y scade valoarea ulterioară din valoarea de bază, o valoare pozitivă a axei y este reprezentativă pentru o reducere a timpului înainte de cădere (adică o performanță mai slabă în test) și o valoare negativă a axei y este reprezentativă pentru o creștere de timp înainte de cădere (adică o performanță îmbunătățită în test). Grupul tratat (5M) a prezentat o îmbunătățire clară în raport cu grupul martor cu vehicul 2M, demonstrând că, compoziția conform invenției a ajutat la recuperarea și îmbunătățirea funcției neurologice și a abilităților motorii în urma leziunii cerebrale induse.

- 35 Rezultatele testului de recunoaștere socială sunt prezentate în Figura 2. Axa y din Figura 2 reprezintă T1-T2. Prin urmare, cu cât valoarea T2 este mai mică (ceea ce demonstrează o recunoaștere socială mai mare), cu atât este mai mare valoarea axei y. În Ziua 14 și Ziua 28, grupul tratat (5M) a prezentat cea mai înaltă recunoaștere socială, demonstrând că, compoziția conform invenției a ajutat la recuperarea și îmbunătățirea funcției neurologice și a recunoașterii sociale în urma leziunii cerebrale induse.

Exemplul 3 - Efectele liofilizatului bacterian asupra producției de SCFA la șobolani sănătoși

- 40 Au fost studiate efectele administrării cronice a unui liofilizat de tulpină de *Blautia hydrogenotrophica* DSM 14294 asupra producției de SCFA la șobolani HIM sănătoși și rezultatele sunt raportate în Figura 3. Mai multe detalii privind experimentele sunt redată mai sus în descrierile din figură. Figura 3 arată că administrarea de BH induce o creștere semnificativă a producției de acetat, precum și a celei de butirat.

Exemplul 4 - Eficacitatea *B. hydrogenotrophica* studiată pentru microbiota umană pe un modelul de șobolan asociat (șobolan HMA)

Rezumat

- 50 Grupuri de 16 șobolani liberi de germenii (cuprinzând 8 șobolani în grupul martor și 8 șobolani în grupul de tratament) au fost inoculați cu microbiota fecală de la un subiect IBS uman (șobolani IBS-HMA). Trei experimente succesive au fost efectuate folosind probe fecale de la 3 pacienți IBS diferiți. Alte două grupuri de șobolani (n = 10) au fost inoculați cu probe fecale de subiecți sănătoși (n=2 subiecți; 2 grupuri de șobolani HMA sănătoși) ca martori ai sensibilității viscerale. Astfel, au existat 24 de șobolani asociați cu microbiota IBS (martor), 24 de șobolani asociați cu microbiota IBS tratați cu Blautix și 20 de șobolani asociați cu microbiota sănătoasă. Jumătate din șobolani IBS-HMA au fost apoi administrați timp de 28 de zile cu o compoziție cuprinzând tulpina bacteriană de *B. hydrogenotrophica* conform invenției, în timp ce cealaltă jumătate dintre animale au primit o soluție martor.

Tulpina***Blautia hydrogenotrophica* (BH) tulpina DSM 14294.****Compoziție și administrare**

5 Liofilizatul BH a fost suspendat în soluție minerală sterilă la o concentrație de 10^{10} bacterii per ml. Doi ml din această suspensie s-au administrat zilnic pe șobolan IBS-HMA, prin gavaj oral, pentru o perioadă de 28 de zile.

10 Soluția martor a fost soluția minerală sterilă care a fost administrată zilnic (2 ml pe șobolan) prin gavaj oral la grupul martor de șobolani IBS-HMA.

Șobolani

15 Șobolanii Fisher masculi liberi de germeni (cu vârsta de 10 săptămâni) au fost inoculați cu microbiota fecală umană de la un subiect IBS (șobolani IBS-HMA). Șaisprezece șobolani au fost inoculați cu același inocul fecal uman. Au fost efectuate trei experimente succesive cu probe fecale de la trei subiecți IBS diferiți. Alte două grupuri de zece șobolani au fost inoculate cu probe fecale de la 2 subiecți sănătoși (grupuri martor de normosensibilitate).

Model de studiu

20 Ziua -14 - Inocularea șobolanilor liberi de germeni cu microbiotă fecală umană.

25 Zilele 0 - 28 - Doză zilnică de liofilizat de BH (grup de analiză) sau soluție martor (grup martor) prin gavaj oral

Intre zilele 14 și 22 - operație de implantare a electrodului în abdomen (pentru analiza de distensie)

25 Zilele 22-28 - Adaptarea șobolanilor pentru a evita stresul asociat testului de distensie.

25 Ziua 28 - testul analiza de distensie și eutanasierea animalelor pentru colectarea probelor cecale pentru analize de sulfuri și acizi grași cu lanț scurt (SCFA).

30 Zilele 0, 14 și 28 - Colectarea de probe fecale pentru analiza microbiană: qPCR pentru evaluarea populației BH și a altor grupuri de microorganisme comensale și enumerarea grupurilor funcționale de microorganisme utilizând medii selective și metoda strict anaerobă.

Rezultate

35 Figura 4 prezintă rezultatele analizei qPCR a populației de *B. hydrogenotrophica* în probe fecale de la șobolani IBS-HMA care primesc soluție martor sau liofilizat de BH. O creștere semnificativă a populației de BH a fost observată la sfârșitul perioadei de administrare (D 28) la șobolanii cărora li s-a administrat liofilizat de BH, ceea ce confirmă eliberarea cu succes a BH în colon.

40 Figura 5 raportează impactul administrării de BH asupra principalilor metaboliți fermentativi, acizii grași cu lanț scurt, în probe cecale de șobolani IBS-HMA. Administrarea de BH a avut ca rezultat o creștere semnificativă a concentrației de acetat, precum și la o creștere semnificativă a concentrației de butirat (Figura 5B).

45 ***Exemplul 5 - Evaluarea histologică a efectului B. hydrogenotrophica asupra țesuturilor cerebrale în modelul de ischemia-reperfuzia cerebrală I/R la șoareci***

Rezumat

50 Un număr de șoareci au fost supuși modelului de ischemie-reperfuzie cerebrală I/R așa cum este evidențiat în Exemplul 2 de mai sus. La terminarea experimentului, fie în ziua 15, fie în ziua 29, țesuturile cerebrale ale șoarecilor au fost supuse unor examinări histopatologice. Modelul de ischemie determină o restricție a alimentării cu sânge a țesuturilor cerebrale, ceea ce determină o lipsă de oxigen și glucoză necesare pentru metabolismul celular și, prin urmare, pentru a menține țesutul viu. Prin urmare, acest model imită patologia accidentului vascular cerebral.

55 Pentru a se determina dacă compozițiile conform invenției au redus efectul modelului de ischemie-reperfuzie asupra țesuturilor cerebrale, la terminarea modelului de ischemie-reperfuzie a fost studiată histologia țesuturilor. Țesuturile au fost studiate în ceea ce privește scorul picotic (care evaluează gradul de necroză și moarte celulară) și în ceea ce privește vacuolizarea (care evaluează gradul de degenerare similară cu apoptoza). În consecință, aceștia sunt markerii cheie ai numărului de celule care au intrat în procese de apoptoză sau necroză, adică numărul de celule care mor. Acest lucru apare după un accident vascular cerebral și un accident vascular cerebral

experimental, din cauza deteriorării celulelor, ca urmare a lipsei de sange/oxigen. Cu cat acești parametri sunt mai ridicați, cu atât distrugerea indusă de un accident vascular cerebral este mai mare. Cu cat acești parametri sunt mai scăzuți, cu atât compoziția conform invenției este mai bună pentru a preveni distrugerea in timpul accidentului vascular cerebral sau pentru a ajuta la recuperarea după un accident vascular cerebral.

Tulpină

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depusă sub numărul de acces DSM 14294.

Modelul și protocolul studiului

Modelul de ischemie-reperfuzie a fost realizat ca în Exemplul 2. Numărul de animale luate pentru examinarea histologică în fiecare grup de studiu este prezentat mai jos.

Grup Nr.	Tratament	Nr. de animale	
		În ziua 15	În ziua 29
1M	PBS (martor fals operat)	6	5
2M	PBS (martor negativ)	9	8
3M	MK-801 (martor pozitiv)	8	6
4M	Pulbere uscată prin înghețare	5	7
5M	Bacterii uscate prin înghețare	6	5

Prepararea țesuturilor pentru analiza histologică

La terminare animalele au fost sacrificate prin asfixiere cu CO₂. Acolo unde este posibil, jumătate din animale au fost sacrificate în ziua 15, iar cealaltă jumătate au fost sacrificate în ziua 29. După perfuzie numai cu soluție salină, de la fiecare șoarece au fost recoltate ileonul, cecumul și colonul, transferate in tuburi sterile marcate separate și depozitate la - 80°C. Creierile au fost, de asemenea, recoltate după perfuzie salină. Emisfera dreaptă a fiecărui creier a fost fixată cu 2,5% paraformaldehidă și stocată la 2-8°C. Emisfera stângă a fiecărui creier a fost stocată la -80°C.

Secțiunile din emisfera dreaptă a tuturor animalelor pe grup au fost încărcate pe lamele urmate de examinarea histologică. Țesuturile au fost tăiate, încorporate în parafină, secționate la o grosime de aproximativ 5 microni și colorate cu hematoxilină și eozină (H&E) (precum și cu reactivi TUNEL) folosind protocoale standardizate. Lamelele au fost examinate la un microscop cu lumină. Fotografiiile au fost realizate cu ajutorul microscopului (Olympus BX60) la mărimi X10, X20 și X40. Aparatul fotografic utilizată a fost Olympus DP-73.

Protocol de evaluare histologică

Au fost numărate celulele cu cariopicioză și apoptotice, și au fost calculate valorile medii. Numărarea neuronilor a fost efectuată manual în emisfera dreaptă a hipocampusului șoarecilor. Au fost evaluate zece câmpuri de mărimi X20 pentru scorul de picnoză și vacuolizare după cum urmează.

Scoruri semicantitative de picnoză și vacuolizare:

1. Gradul 0 = fără celule afectate
2. Gradul 1 = până la 10 celule afectate
3. Gradul 2 = >10 și < 20 celule afectate
4. Gradul 3 = >20 și < 30 celule afectate
5. Gradul 4 = >30 și < 40 celule afectate
6. Gradul 5 = >40 și < 50 celule afectate
7. Gradul 6 = >50 celule afectate

S-a determinat un scor pentru fiecare câmp de mărire X20 pentru fiecare șoarece dintr-un grup de probe dat. Scorurile pentru fiecare grup de probe au fost apoi mediate pentru a da valoarea medie afișată în graficele rezultatelor (Figurile 6A și 6B).

Rezultate**Picnoza**

Figura 6A prezintă scorul semicantitativ de picnoză după colorarea histologică H&E. După cum era de așteptat, șoarecii cu martor negativ PBS (2M) supuși testului de ischemie-reperfuzie au prezentat o creștere semnificativă a numărului de celule necrotice și/sau muribunde comparativ cu martorul fals negativ (1M *adică* șoareci care nu au fost supuși testului de ischemie-reperfuzie și care au prezentat un scor sub Gradul 1). În plus, șoarecii cărora li s-a administrat martorul pozitiv MK-801 (3M) au prezentat un scor scăzut de picnoză, care indică un număr redus de celule necrotice. Surprinzător, șoarecii cărora li s-a administrat compoziția conform invenției (5M) au prezentat un scor de picnoză chiar mai redus, care a fost, de asemenea, redus semnificativ în comparație cu grupul martor negativ PBS (2M) și redus față de cel al șoarecilor cărora li s-a administrat pulberea liofilizată (4M). În consecință, șoarecii cărora li s-a administrat compoziția conform invenției prezintă o tendință semnificativă de necroza tisulară redusă cauzată de ischemie.

Vacuolizare

Figura 6B demonstrează scorul semicantitativ al vacuolizării după colorarea histologică H&E. Din nou, așa cum era de așteptat, șoarecii martor negativ PBS (2M) supuși testului de ischemie-reperfuzie au prezentat o creștere semnificativă a numărului de celule necrotice și/sau muribunde comparativ cu martorul negativ simulat (1M), care a prezentat un scor chiar peste Gradul 0. Contrar observațiilor pentru scorul de picnoză, administrarea martorului pozitiv (3M) nu a redus scorul de vacuolizare, indicând faptul că MK-801 nu reușește să reducă gradul morții celulare declanșate de apoptoză. Cu toate acestea, șoarecii cărora li s-a administrat compoziția conform invenției (5M) au demonstrat o reducere semnificativă a scorului de vacuolizare, mai mică decât toate celelalte grupuri. În consecință, compozițiile conform prezentei invenții reduc gradul morții celulare apoptotice cauzate de ischemie.

Histologie reprezentativă

Figura 6C redă fotografii reprezentative ale lamelelor colorate H&E de la fiecare dintre animalele testate. Aceste imagini au fost folosite pentru a pregăti scorurile semicantitative discutate mai sus. Grupul 5M (cărui i s-a administrat compoziția conform prezentei invenții) prezintă o densitate și un număr mai mare de celule și o vacuolizare redusă, comparativ cu grupul 4M (martor cu pulbere uscată prin înghețare) și sunt mai asemănătoare cu martorul pozitiv MK-801. Într-adevăr, șoarecii cărora li s-a administrat compoziția bacteriană conform prezentei invenții prezintă o histologie tisulară mult îmbunătățită comparativ cu martorul negativ al modelului de șoareci ischemici (2M).

Concluzii

Tulpina de *B. hydrogenotrophica* conform prezentei invenții îmbunătățește semnificativ histologia țesutului cerebral la șoarecii supuși testului de ischemie-reperfuzie comparativ cu ambii martori negativi. În sensul acesteia, compoziția bacteriană a redus numărul de celule necrotice și moarte, precum și numărul de celule care suferă apoptoză (vacuolizare). Deși pulberea liofilizată a cauzat, de asemenea, o ușoară reducere a scorurilor de picnoză și vacuolizare, această reducere nu a fost observată în aceeași măsură în acest grup experimental, în care grupului i s-a administrat compoziția bacteriană conform invenției. Un posibil motiv pentru histologia îmbunătățită în martorul liofilizat este acela că pulberea liofilizată conține zaharuri care ar putea avea un efect asupra recuperării celulelor supuse unui nivel redus de oxigen și metaboliți (datorită testului de ischemie-reperfuzie). Cu toate acestea, tulpina bacteriană conform prezentei invenții prezintă o histologie îmbunătățită clar atât în ceea ce privește scorurile de picnoză cât și în ceea ce privește vacuolizarea, comparativ cu martorul negativ cu pulbere liofilizată. În consecință, această tulpină bacteriană demonstrează capacitatea de a preveni moartea celulară în țesuturile cerebrale (prin necroză sau apoptoză) și/sau ajută la recuperarea țesutului cerebral după distrugerile induse de ischemie.

Secvențe

SECV ID NR:1 (Genă ARN ribozomală 16S a tulpinii de *Blautia stercoris*, secvență parțială HM626177

```

1  tgcaagtcga gccaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacgggtat cgcatagatac agtgtgaaaa actccgggtgg
181 tatgagatgg acccggtctt gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaattattgca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc
361 gcgtgaagga agaagtattt cgggtatgtaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gttagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt tttcttgag tgccggagag
601 gtaagcggaa ttctagtggt agcgggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcgggt tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg ggagcaaagc
781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggaccgcac aagcgtgga gcatgtggtt taattcgaag
901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcgtgct gtgagatggt
1021 ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc

1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccc
5  1321 ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc

```

SECV ID NR: 2 (Genă ARN ribozomală 16S WAL 14507 a tulpinii de *Blautia wexlerae*
secvență parțială EF036467

```

1  caagtcgaac ggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
61  gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
181 aagatggacc cgcgttgat tagcttggtg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc
241 catagccggc ctgagagggg gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg
361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca ggaagatag tgacggtacc
421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc
481 gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggg gtggcaagtc tgatgtgaaa
541 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
601 agcgaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
721 agataccctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
841 actcaaagga attgacgggg acccgacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
901 acgcaagaa ccttaccag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggatctttcc
961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctctgtcgtg gagatgttgg
1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcact
1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
1141 cttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cgggtgaatac gttcccggtg
1321 cttgtacaca ccgccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

```

SECV ID NR:3 (secvență ARNr 16S consens pentru tulpina 830 de *Blautia stercoris*)

```

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTCATAACAGGGGGATAACA
GTTGGAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
CCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG

```

TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
 AAAGTGTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCAA
 TAAGTATTTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGGAACCTT
 TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

SECV ID NR:4 (secvență ARNr 16S consens pentru tulpina MRX008 de *Blautia wexlerae*)

TTCATTGAGACTTCGGTGCATTTAGATTCTATTTCTAGTGGCGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
 CGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
 GTGGACTGCATTGGAAGTGTCTACTTGGAGTGCCGGAGGGGTAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAAGTACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAACGCGAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAAAT
 GGCGTAAACAAAGGGAACGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
 AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

5

SECV ID NR:5 (genă ARN ribozomală 16S S5a36 a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica*, secvență parțială X95624.1)

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
 61 tttcgggttga agttttctat tgactgagtg ggcgacgggt gagtaacgcg tgggtaacct
 121 gccctatata gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt

181 cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca
 361 caatggggga aacctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggatatgaa
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcggtataac gtaaggggca agcggttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcggtgc cgcagcaaac gcaataagta
 841 tccccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgca
 901 caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca
 1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaactc aaaaaaacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctcttga cacaccgccc gtcacaccat
 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaagggtg
 1441 gactgataac tggggtga

REFERINȚE

- 5 [1] Spor și colab. (2011) Nat Rev Microbiol. 9(4):279-90.
- [2] Eckburg și colab. (2005) Science. 10;308(5728):1635-8.
- [3] Tap și colab. (2009) Environ Microbiol, 11(10):2574-84
- [4] Macpherson și colab. (2001) Microbes Infect. 3(12):1021-35
- 10 [5] Macpherson și colab. (2002) Cell Mol Life Sci. 59(12):2088-96.
- [6] Mazmanian și colab. (2005) Cell 15;122(1):107-18.
- [7] Frank și colab. (2007) PNAS 104(34): 13780-5.
- [8] Scanlan și colab. (2006) J Clin Microbiol. 44(11):3980-8.
- [9] Kang și colab. (2010) Inflamm Bowel Dis. 16(12):2034-42.
- 15 [10] Machiels și colab. (2013) Gut. 63(8):1275-83.
- [11] Lopetuso și colab. (2013), Gut Pathogens, 5: 23
- [12] WO 2013/050792
- [13] WO 03/046580
- [14] WO 2013/008039
- 20 [15] WO 2014/167338
- [16] US2016/143961
- [17] Lee and Lee (2014) World J Gastroenterol. 20(27): 8886-8897.
- [18] WO2014/150094
- [19] Sun și colab. 2015 Neuroscience letters 613, 30-35
- 25 [20] Sun și colab. 2016 Brain research 1642, 180-188
- [21] WO 01/85187
- [22] WO 2016/203218
- [23] Liu și colab. (2008) Int J Syst Evol Microbiol 58, 1896-1902.
- [24] Bernalier și colab. (1996) Arch. Microbiol. 166 (3), 176-183.
- 30 [25] Park și colab. (2012) Int J Syst Evol Microbiol. 62(Pt 4):776-9.
- [26] Masco și colab. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.

- [27] Srůtkova și colab. (2011) J. Microbiol. Methods, 87(1): 10-6.
 [28] Psaty și colab. (2003) JAMA, 289(19):2534-44.
 [29] Lancet. (1995) 346(8991-8992): 1647-53.
 [30] Li și colab. (2013) Neuroscience, 252:346-358.
 5 [31] Zhao și colab. (2008) Brain Research 1229:224-232.
 [32] Park și colab. (2016) J. Neuroinflammation 13:300.
 [33] Sun și colab. (2015) BioMed Res. Int. Article ID.
 [34] Bourassa și colab. (2016) Neurosci. Lett. 625:56-63.
 [35] Chuang și colab. (2009) Trends Neurosci. 32 (11):591-601
 10 [36] Fischer și colab. (2007) Nature 447(7141):178-182
 [37] Miyamoto-Shinohara și colab. (2008) J. Gen. Appl. Microbiol., 54, 9-24.
 [38] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
 [39] Leslie și colab. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.
 [40] Mitropoulou și colab. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.
 15 [41] Kailasapathy și colab. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
 [42] Handbook of Pharmaceutical Excipients, Ediția a 2-a, (1994), Edited by A Wade și PJ Weller
 [43] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [44] US 2016/0067188
 [45] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 20 [46] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
 [47] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
 [48] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
 25 [49] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream și colab., eds., 1998, Academic Press).
 [50] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 [51] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 30 [52] Sambrook și colab. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 [53] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [54] Ausubel și colab. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, ediția a 5-a (Current Protocols).
 35 [55] PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [56] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel și colab., eds., 1987) Supplement 30
 [57] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
 [58] Kondziela (1964) Int. Pharmacodyn. 152:277-284
 40 [59] Coughenour și colab. (1977) Pharmacol Biochem Behav. 6(3):351-3
 [60] Jacobs și colab. (2016) Bio-Protocol 6(9)e1804

LISTA DE SECVENȚE

- 45 <110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED
 <120> COMPOZIȚII CARE CUPRIND TULPINI BACTERIENE
 <130> P071370
 <141> 2018-05-22
 <150> GB 1708176.1
 50 <151> 2017-05-22
 <150> GB 1714305.8
 <151> 2017-05-222017-09-06
 <150> GB 1714309.0
 <151> 2017-09-06
 55 <150> GB 1714298.5
 <151> 2017-09-06
 <150> GB 1716493.0
 <151> 2017-10-09
 <150> GB 1718551.3
 60 <151> 2017-11-09
 <160> 5

<170> SeqWin2010, versiunea 1.0

<210>

<211>

<212>

5 <213> *Blautia stercoris*

<400>

tgcaagtcga	gcgaagcgct	tacgacagaa	ccttcggggg	aagatgtaag	ggactgagcg	60
gcggacgggt	gagtaacgag	tgggtaacct	gcctcatata	gggggataac	agttggaaac	120
ggctgctaata	accgcataag	cgacaggtat	cgcatgatac	agtgtgaaaa	actccgggtg	180
tatgagatgg	acccgcgtct	gattagctag	ttggaggggt	aacggcccac	caaggcgacg	240
atcagtagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	300
ctacgggagg	cagcagtggt	gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	360
gcgtgaagga	agaagtatct	cggtatgtaa	acttctatca	gcagggaaga	aaatgacggt	420
acctgactaa	gaagccccgg	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatac	gtagggggca	480
agcgttatcc	ggatttactg	ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggaagagcaa	gtctgatgtg	540
aaaggctggg	gcttaacccc	aggactgcat	tggaaactgt	ttttcttgag	tgccggagag	600
gtaagcggaa	ttcctagtgt	agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	660
gaaggcggct	tactggacgg	taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	720
attagatacc	ctggtagtcc	acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgttgg	ggagcaaagc	780
tcttcgggtg	cgagcaaac	gcaataagta	ttccacctgg	ggagtacgtt	cgcaagaatg	840
aaactcaag	gaattgacgg	ggacccgcac	aagcggtgga	gcatgtggtt	taattcgaag	900
caacgcgaag	aaccttacca	agtcttgaca	tcgatctgac	cggttcgtaa	tggaaacctt	960
ccttcgggac	agagaagaca	ggtggtgcat	ggttgtcgtc	agctcgtgtc	gtgagatgtt	1020
gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaacccct	atcctcagta	gccagcaggt	gaagctgggc	1080
actctgtgga	gactgccagg	gataacctgg	aggaaggcgg	ggacgacgtc	aaatcatcat	1140
cccccttatg	atttgggcta	cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaaggg	aagcagagccc	1200
gcgaggggga	gcaaatccca	aaaataacgt	cccagttcgg	actgcagtct	gcaactcgac	1260
tgcacgaagc	tggaatcgct	agtaatcgcg	aatcagaatg	tcgcgggtgaa	tacgttcccc	1320
ggtcttgtac	acaccgccc	tcacaccatg	ggagtcaagta	acgcccgaag	tc	1372

<210>

<211>

10 <212>

<213> *Blautia wexlerae*

<400>

caagtcgaac	gggaattant	ttattgaaac	ttcgggtcgat	ttaatttaat	tctagtggcg	60
gacgggtgag	taacgcgtgg	gtaacctgcc	ttatacaggg	ggataacagt	cagaaatggc	120
tgctaatacc	gcataagcgc	acagagctgc	atggctcagt	gtgaaaaact	ccggtgggtat	180
aagatggacc	cgcggttgat	tagcttgttg	gtggggtaac	ggcccaccaa	ggcgacgatc	240
catagccggc	ctgagagggt	gaacggccac	attgggactg	agacacggcc	cagactccta	300
cgggaggcag	cagtggggaa	tattgcacaa	tgggggaaac	cctgatgcag	cgacgcccg	360
tgaaggaaga	agtatctcgg	tatgtaaact	tctatcagca	gggaagatag	tgacgggtacc	420
tgactaagaa	gccccggcta	actacgtgcc	agcagcccg	gtaatacgt	gggggcaagc	480
gttatccgga	tttactgggt	gtaaaggagg	cgtagacggg	gtggcaagtc	tgatgtgaaa	540
ggcatgggct	caacctgtgg	actgcattgg	aaactgtcat	acttgagtgc	cggaggggta	600
agcgggaattc	ctagtgtagc	ggtgaaatgc	gtagatatta	ggaggaacac	cagtggcgaa	660
ggcggcttac	tggacggtaa	ctgacgttga	ggctcgaaag	cgtggggagc	aaacaggatt	720
agataccctg	gtagtccacg	ccgtaaacga	tgaataacta	ggtgtcgggt	ggcaaaagcca	780
ttcgggtgcc	tcgcaaacgc	agtaagtatt	ccacctgggg	agtacgttcg	caagaatgaa	840
actcaaagga	attgacgggg	acccgcacaa	gcgggtggagc	atgtggttta	attcgaagca	900
acgcgaagaa	ccttaccaa	tcttgacatc	cgctgacccg	atccttaacc	ggatctttcc	960
ttcgggacag	gcgagacagg	tggtgcatgg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt	gagatgttgg	1020
gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccttat	cctcagtagc	cagcatttaa	ggtgggcact	1080
ctggggagac	tgccagggat	aacctggagg	aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcacatgcc	1140
ccttatgatt	tgggctacac	acgtgctaca	atggcgtaaa	caaagggaag	cgagattgtg	1200
agatggagca	aatcccaaaa	ataacgtccc	agttcggact	gtagtctgca	acccgactac	1260
accgaagctg	aatcgctagt	aatcgcggt	cagaatgccg	cgggtgaatac	gttcccgggt	1320
cttgtacaca	ccgcccgtca	caccatggga	gtcagtaaac	cccgaagtca	gtgacctaac	1380
tgcaaagaag	gagctgccga	aggcggggacc	gatgactggg	gtgaagtcgt	aacaagggt	1438

<210>

15 <211>

<212>

<213> *Blautia stercoris*

<220>

<221>

k

<222>							4
<223> a, t, c sau g							
<400>							3
tttktgtctgg	ctcaggatga	acgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcgaagc	60	
gcttacgaca	gaaccttcgg	gggaagatgt	aagggactga	gcggcggacg	ggtgagtaac	120	
gcgtgggttaa	cctgcctcat	acagggggat	aacagttgga	aacggctgct	aataccgcat	180	
aagcgcacag	tatcgcatga	tacagtgtga	aaaactccgg	tggtagaga	tggaccgcg	240	
tctgattagc	tagttggagg	ggtaacggcc	caccaaggcg	acgatcagta	gccggcctga	300	
gagggatgaac	ggccacattg	ggactgagac	acggcccaga	ctcctacggg	aggcagcagt	360	
ggggaatatt	gcacaatggg	ggaaaccctg	atgcagcgac	gccgcgtgaa	ggaagaagta	420	
tctcggtatg	taaaacttcta	tcagcaggga	agaaaatgac	ggtacctgac	taagaagccc	480	
cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa	tacgtagggg	gcaagcgta	tccggattta	540	
ctgggtgtaa	agggagcgtg	gacggaagag	caagtctgat	gtgaaaggct	ggggcttaac	600	
cccaggactg	cattggaaac	tgtttttctt	gagtgccgga	gaggtaaagc	gaattcctag	660	
tgtagcgggtg	aaatgcgtag	atattaggag	gaacaccagt	ggcgaaggcg	gcttactgga	720	
cggtaactga	cgttgaggct	cgaagcgtg	gggagcaaac	aggattagat	accctggtag	780	
tccacgccgt	aaacgatgaa	tactaggtgt	tggggagcaa	agctcttcgg	tgccgcagca	840	
aacgcaataa	gtattccacc	tggggagtag	gttcgcaaga	atgaaactca	aaggaattga	900	
cggggacccg	cacaagcggg	ggagcatgtg	gtttattcga	agcaacgcga	agaaccttac	960	
caagtcttga	catcgatctg	accggttcgt	aatggaacct	ttccttcggg	acagagaaga	1020	
caggtggtgc	atggttgctg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	tcccgaacg	1080	
agcgaacccc	ctatcgtcag	tagccagcag	gtaaagctgg	gcactctgag	gagactgcca	1140	
gggataacct	ggaggaaggc	ggggacgacg	tcaaatacatc	atgcccctta	tgatttgggc	1200	
tacacacgtg	ctacaatggc	gtaaacaaag	ggaagcgagc	ccgcgagggg	gagcaaatcc	1260	
caaaaataac	gtcccagttc	ggactgcagt	ctgcaactcg	actgcacgaa	gctggaatcg	1320	
ctagtaatcg	cgaatcagaa	tgtcgcgggtg	aatacgttcc	cgggtcttgt	acacaccgcc	1380	
cgtcacacca	tgggagtcag	taacgcccg	agtcagtgac	ccaaccttag	ggagggagct	1440	
gccgaaggcg	ggattgataa	ctgggggtgaa	gtctaggggg	t		1481	
<210>							4
<211>							1384
<212>							ADN
<213> Blautia wexlerae							
<220>							
<221>							
<222>							
<223>							
<400>							4
ttcattgaga	cttcgggtgga	tttagattct	atttctagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	60	
tgggtaacct	gccttatata	gggggataac	agtcagaaat	ggctgcta	accgcataag	120	
cgcacagagc	tgcattggctc	agtgtgaaaa	actccgggtg	tataagatgg	accgcgttg	180	
gattagcttg	ttggtggggg	aacggcccac	caaggcgcag	atccatagcc	ggcctgagag	240	
ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtggt	300	
gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	360	
cggtagttaa	acttctatca	gcagggaaga	tagtgacggt	acctgactaa	gaagccccgg	420	
ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatac	gtagggggca	agcgttatcc	ggatttactg	480	
ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggtgtggcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	540	
tggactgcat	tggaaactgt	catacttgag	tgcgggagg	gtaagcggaa	ttcctagtgt	600	
agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaaggcggct	tactggacgg	660	
taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	720	
acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgtcng	gggagcatgg	ctcttcgggt	ccgtcgcaaa	780	
cgcagtaagt	attccacctg	gggagtacgt	tcgcaagaat	gaaactcaaa	ggaattgacg	840	
gggaccgcga	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	900	
aagtcttgac	atccgcctga	ccgatacctt	accggatctt	tccttcggga	caggcgagac	960	
agggtggtgca	tgggtgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgcacaga	1020	
gcgcaacccc	tatcctcagt	agccagcatt	ttaagggtggc	actctgggga	gactgccagg	1080	
gataaacctg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aatcatcat	gccccttatg	atttgggcta	1140	
cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaagg	aagcgagatc	gtgagatgga	gcaaatccca	1200	
aaaataacgt	cccagttcgg	actgtagtct	gcaacccgac	tacacgaagc	tggaatcgct	1260	
agtaatcgcg	gatcagaatg	ccgcgggtgaa	tacgttcccc	ggtcttgtag	acaccgccc	1320	
tcacaccatg	ggagttagta	acgcccgaag	tcagtgcact	aactgcaaag	aaggagctgc	1380	
cgaa						1384	

<210>						5
<211>						1458
<212>						ADN
<213>	Blautia hydrogenotrophica					
5	<220>					
	<221>					n
	<222>					1416
	<223>	a, t, c sau g				
	<400>					5
	gatgaacgct	ggcggcgtgc	ttaacacatg	caagtcgaac	gaagcgatag	agaacggaga 60
	tttcggttga	agttttctat	tgactgagtg	gcggaacggg	gagtaacgag	tgggtaacct 120
	gccctataca	gggggataac	agttagaaat	gactgctaata	accgcataag	cgcacagctt 180
	cgcatagaag	ggtgtgaaaa	actgaggtgg	tataggtatg	acccgcgttg	gattagctag 240
	ttggtgaggt	aacggccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc 300
	cacattggga	ctgagacacg	gcccacaaactc	ctacgggagg	cagcagtgag	gaatattgca 360
	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	cggtatgtaa 420
	acttctatca	gcagggaaga	aagtgacggg	acctgactaa	gaagccccgg	ctaattacgt 480
	gccagcagcc	gcggttaatac	gtaaggggca	agcgttatcc	ggatttactg	ggtgtaaagg 540
	gagcgtagac	ggtttggcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	tggactgcat 600
	tggaaactgt	cagacttgag	tgccggagag	gcaagcggaa	ttcctagtgt	agcggtgaaa 660
10	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaagggcgcc	tgctggacgg	taactgacgt 720
	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	acgctgtaaa 780
	cgatgaatac	taggtgtcgg	gtggcaaaag	cattcggtgc	cgcagcaaac	gcaataagta 840
	ttcccacctg	gggagtacgt	tcgcaagaat	gaaactcaaa	ggaattgacg	gggacccgca 900
	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	aaatcttgac 960
	atccctctga	ccgggaagta	atgttcctct	ttcttcggaa	cagaggagac	aggtggtgca 1020
	tggttgctgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tggtttaaag	cccgcacaga	gcgcaaccct 1080
	tattcttagt	agccagcagg	tagagctggg	cactctaggg	agactgccag	ggataacctg 1140
	gaggaagggt	gggatgacgt	caaatacatc	tgccccttat	gatttgggct	acacacgtgc 1200
	tacaatggcg	taaacaaagg	gaagcgaagg	ggtgacctgg	agcaaatctc	aaaaataacg 1260
	tctcagttcg	gattgttagt	tgcaactcga	ctacatgaag	ctggaatcgc	tagtaatcgc 1320
	gaatcagaat	gtcgcgggtga	atagcttccc	gggtcttgta	cacaccgccc	gtcacaccat 1380
	gggagtcagt	aacgcccga	gtcagtgacc	caaccnaaag	gagggagctg	ccgaagggtg 1440
	gactgataac	tgggggtga				1458

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WENZHEN JI ET AL: "Analysis of intestinal microbial communities of cerebral infarction and ischemia patients based on high throughput sequencing technology and glucose and lipid metabolism", MOLECULAR MEDICINE REPORTS, vol. 16, no. 4, 11 August 2017 (2017-08-11), pages 5413-5417, XP055495331, GR ISSN: 1791-2997, DOI: 10.3892/mmr.2017.7227
- WO-A1-2015/033305
- BHARGAVA PAVAN ET AL: "Gut Microbiome and Multiple Sclerosis", CURRENT NEUROLOGY AND NEUROSCIENCE REPORTS, PHILADELPHIA, PA. : CURRENT SCIENCE INC, US, vol. 14, no. 10, 10 September 2014 (2014-09-10), pages 1-8, XP035394087, ISSN: 1528-4042, DOI: 10.1007/S11910-014-0492-2 [retrieved on 2014-09-10]
- WO-A1-2016/203218
- 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-A1-2017/148596
- US-A1- 2016 143 961

(57) Revendicări:

1. Compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a leziunii cerebrale.

2. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 1, în care leziunea cerebrală este un accident vascular cerebral.

3. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 2, în care accidentul vascular cerebral este:

- (a) ischemie cerebrală;
- (b) ischemie cerebrală focală;
- (c) accident vascular cerebral ischemic; sau
- (d) accident vascular cerebral hemoragic.

4. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția este pentru utilizarea în tratarea leziunii cerebrale la un subiect diagnosticat ca fiind cu risc de accident vascular cerebral.

5. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 4, în care subiectul are cel puțin un factor de risc de accident vascular cerebral.

6. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 5, în care respectivul cel puțin un factor de risc este hipertensiunea arterială sau diabetul.

7. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 4-6, în care subiectul a suferit cel puțin un atac ischemic tranzitoriu.

8. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care tulpina bacteriană este:

- (a) de *Blautia hydrogenotrophica*;
- (b) de *Blautia stercoris*; sau
- (c) de *Blautia wexlerae*.

9. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este:

(a) 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*, în care opțional tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SECV ID NR: 5 sau care are secvența de ARNr 16s din SECV ID NR: 5;

(b) cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia stercoris*; sau

(c) cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia wexlerae*.

10. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 1, în care compoziția cuprinde:

(a) o tulpină bacteriană din specia de *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a leziunilor cerebrale;

(b) o tulpină bacteriană din specia *Blautia stercoris*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a leziunii cerebrale; sau

(c) o tulpină bacteriană din specia *Blautia wexlerae*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a leziunii cerebrale.

11. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care:

- (a) compoziția este pentru administrarea orală;
- (b) compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic;
- (c) tulpina bacteriană este liofilizată.; și/sau
- (d) tulpina bacteriană este viabilă.

12. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția cuprinde o singură tulpină din genul *Blautia*.

13. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, care cuprinde tulpina bacteriană de *Blautia* ca parte a unui consorțiu microbian.

14. Produs alimentar care cuprinde compoziția conform oricăreia dintre revendicările precedente, pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente.

FIG. 1

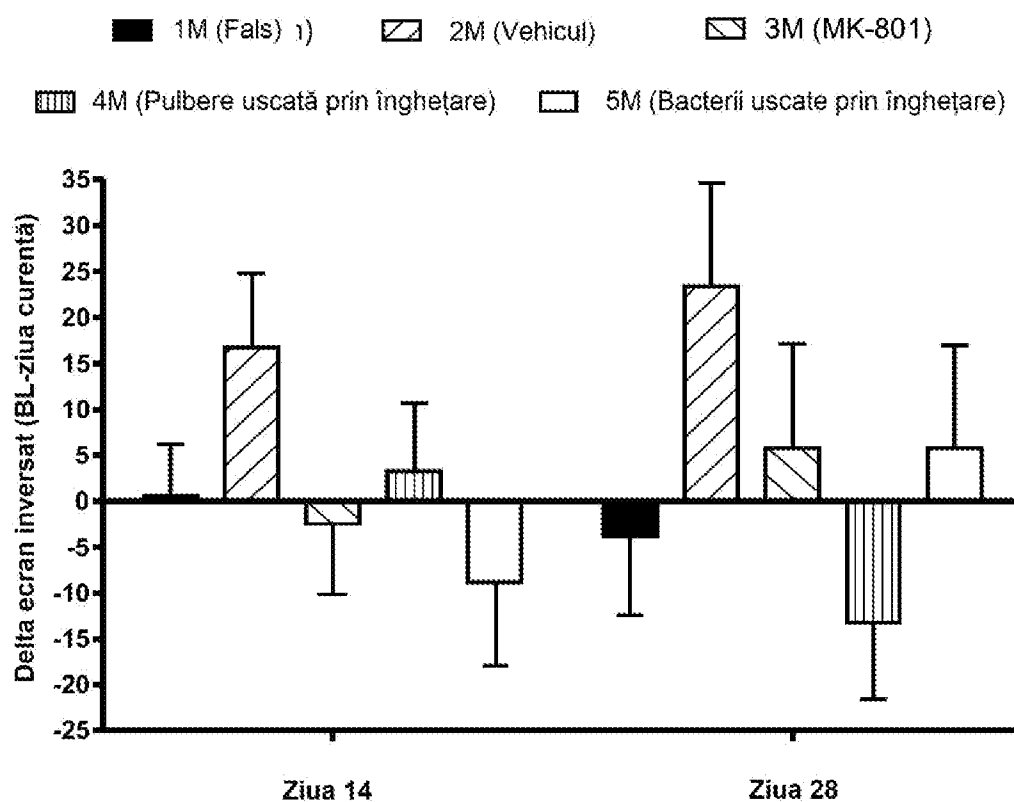


FIG. 2

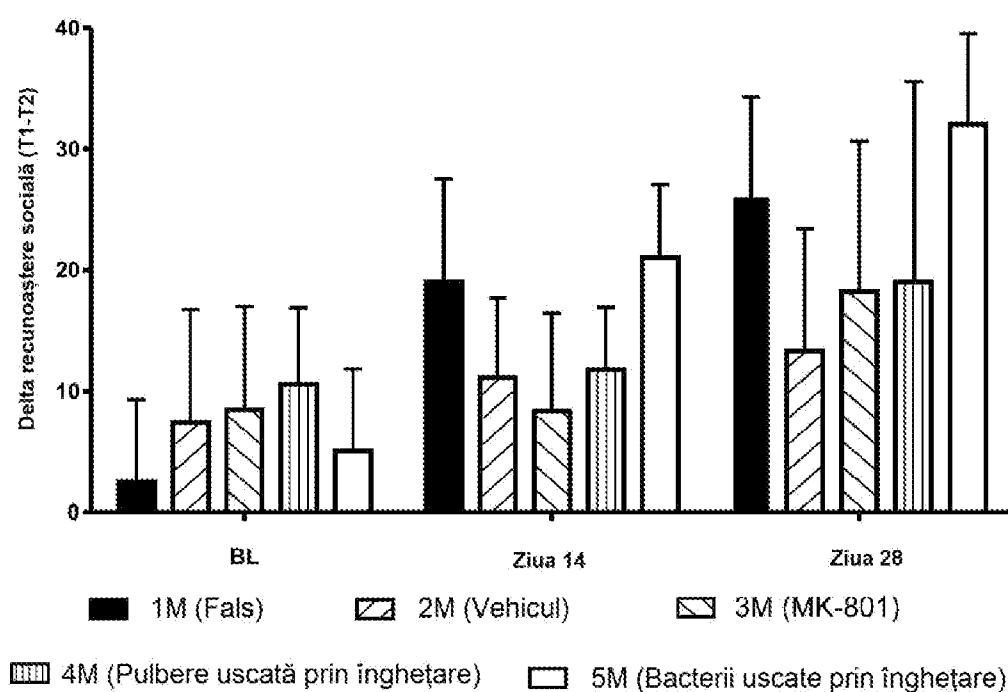


FIG. 3

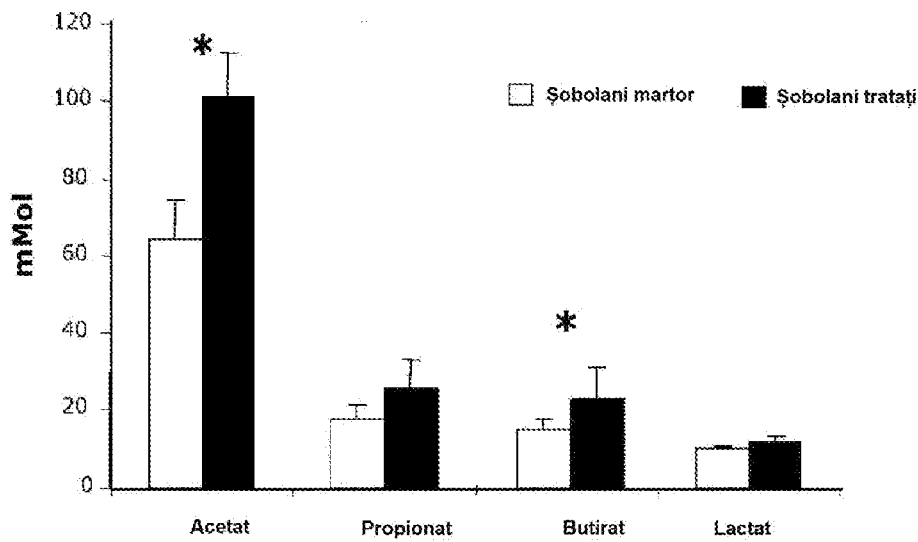


FIG. 4

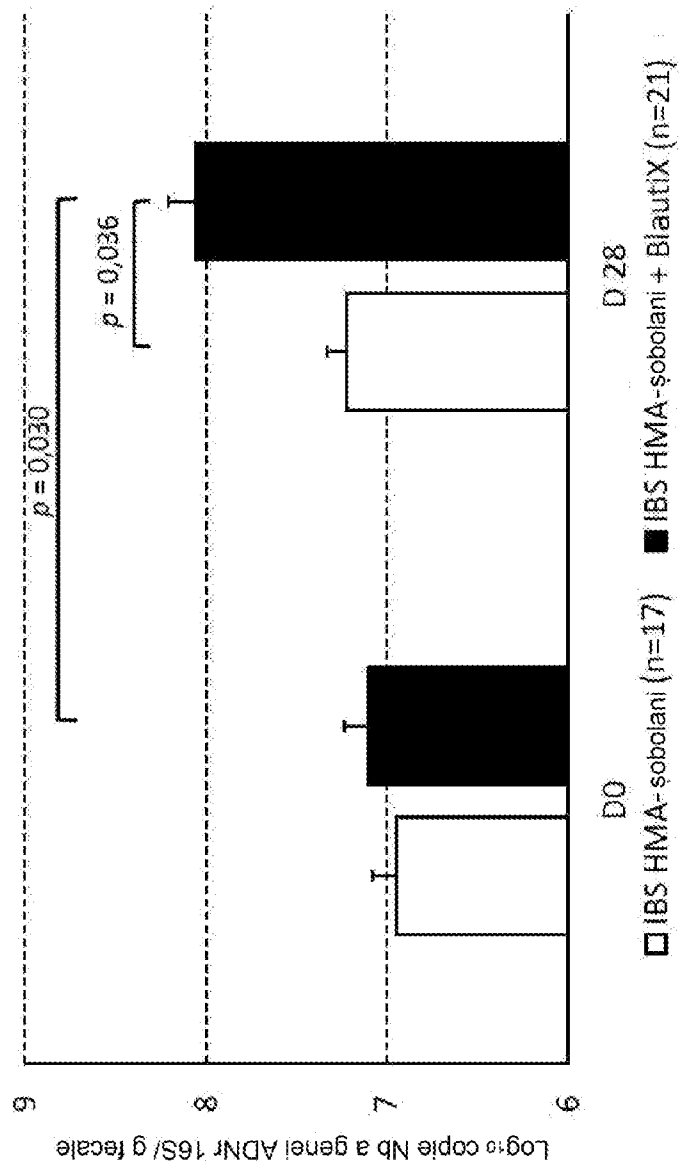
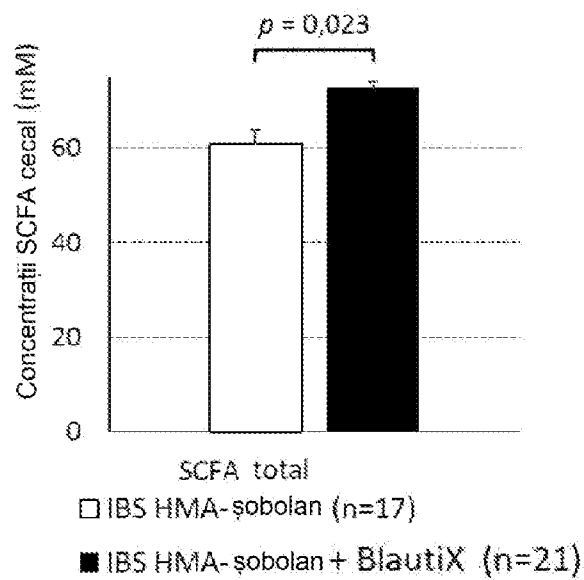


FIG. 5A

SCFA Total

**FIG. 5B**

SCFA Major

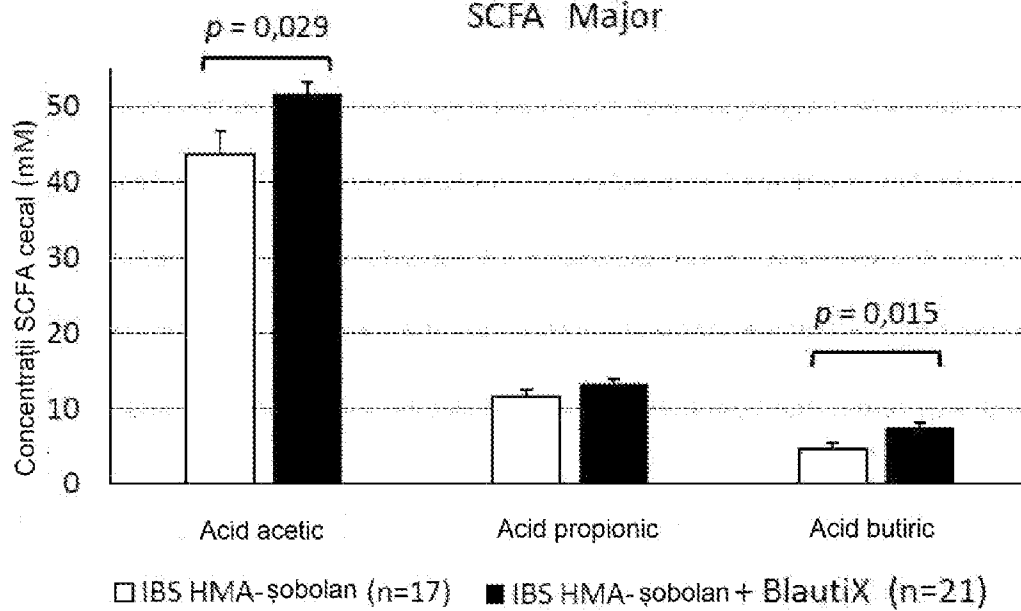


FIG. 6B

Scor histologic semicantitativ la colorare H&E

p=0.098

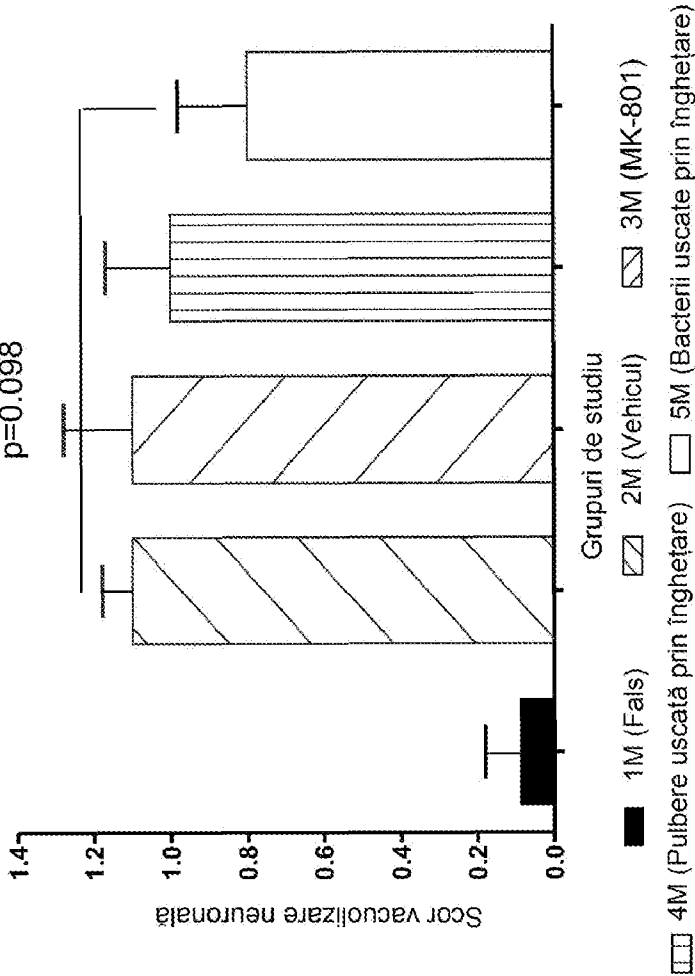


FIG. 6A

Scor histologic semicantitativ la colorare H&E

p<0.0001

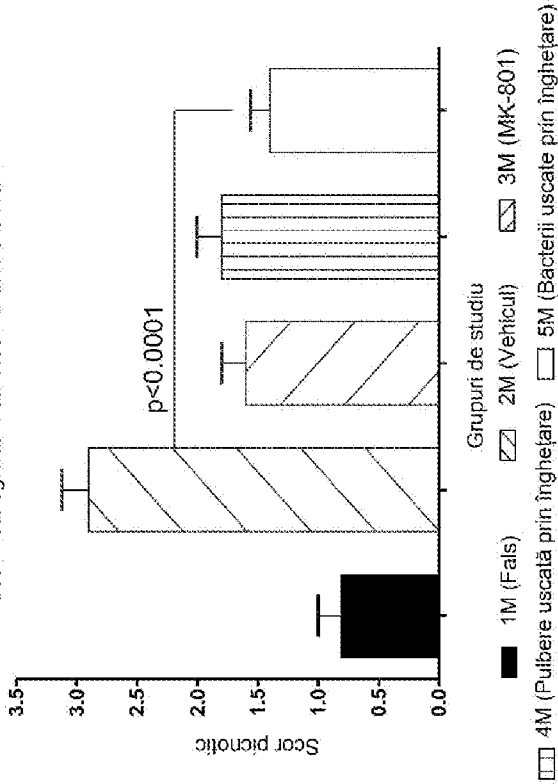


FIG. 6C

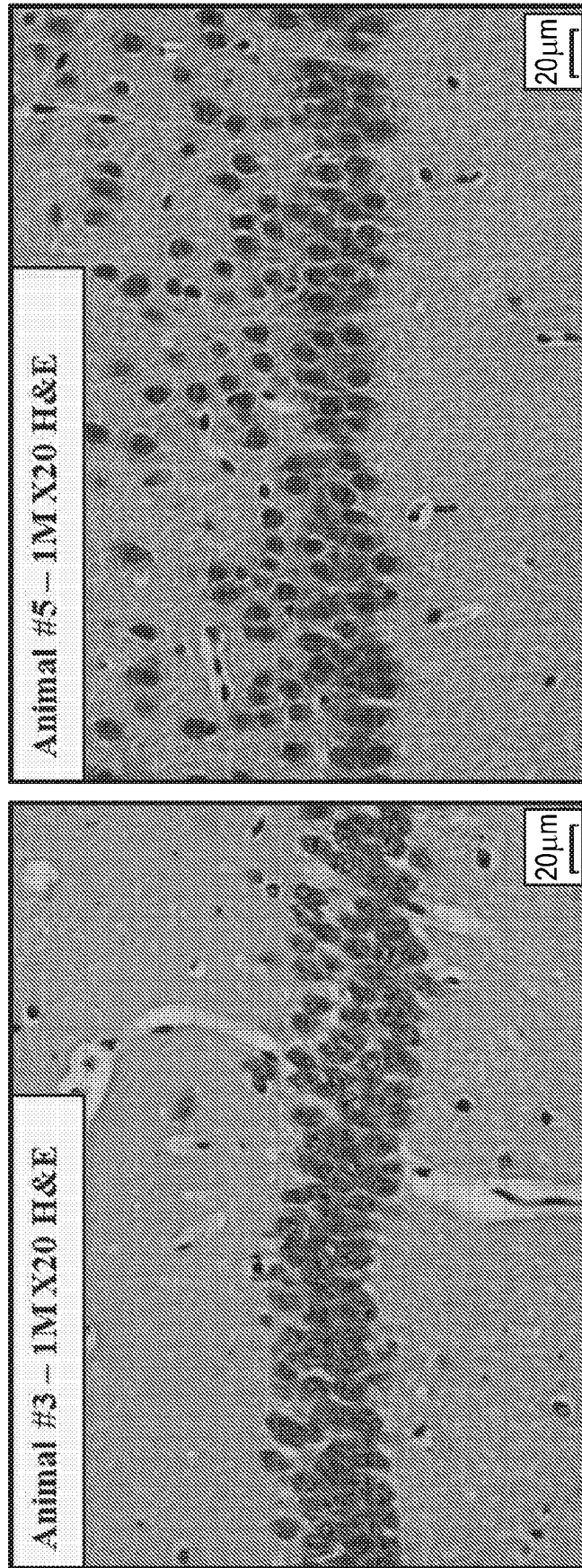


FIG. 6C (cont.)

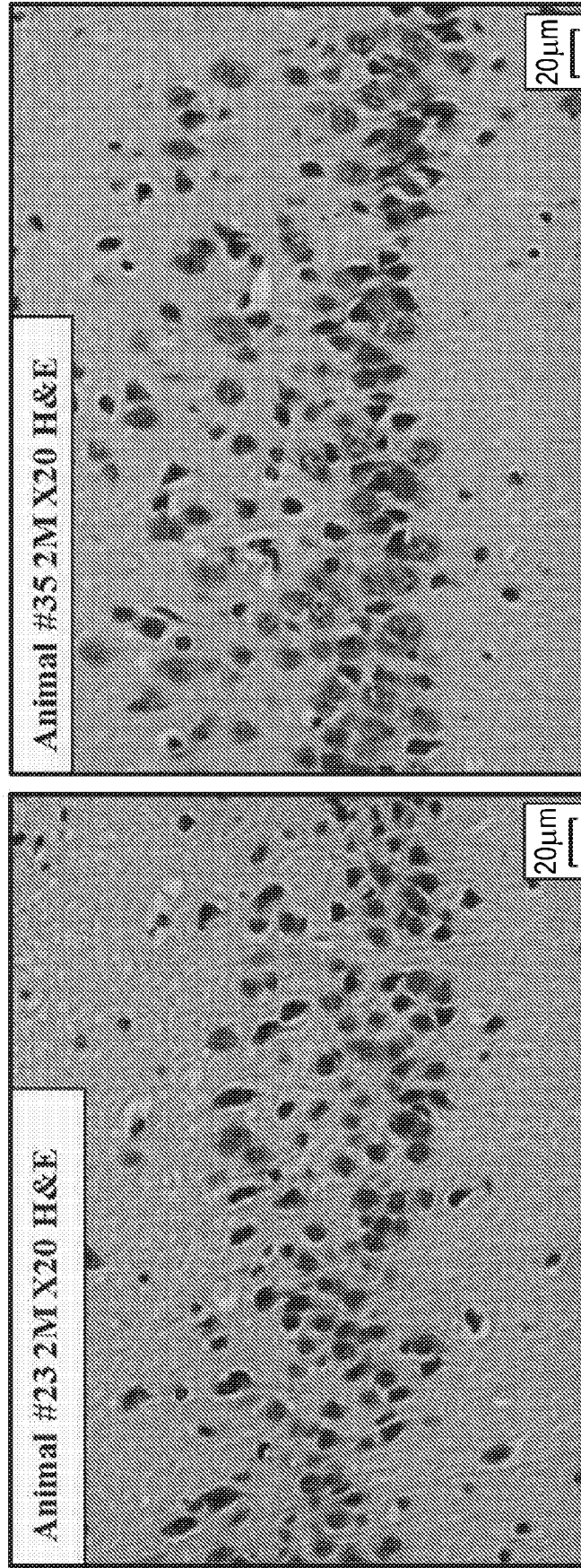


FIG. 6C (cont.)

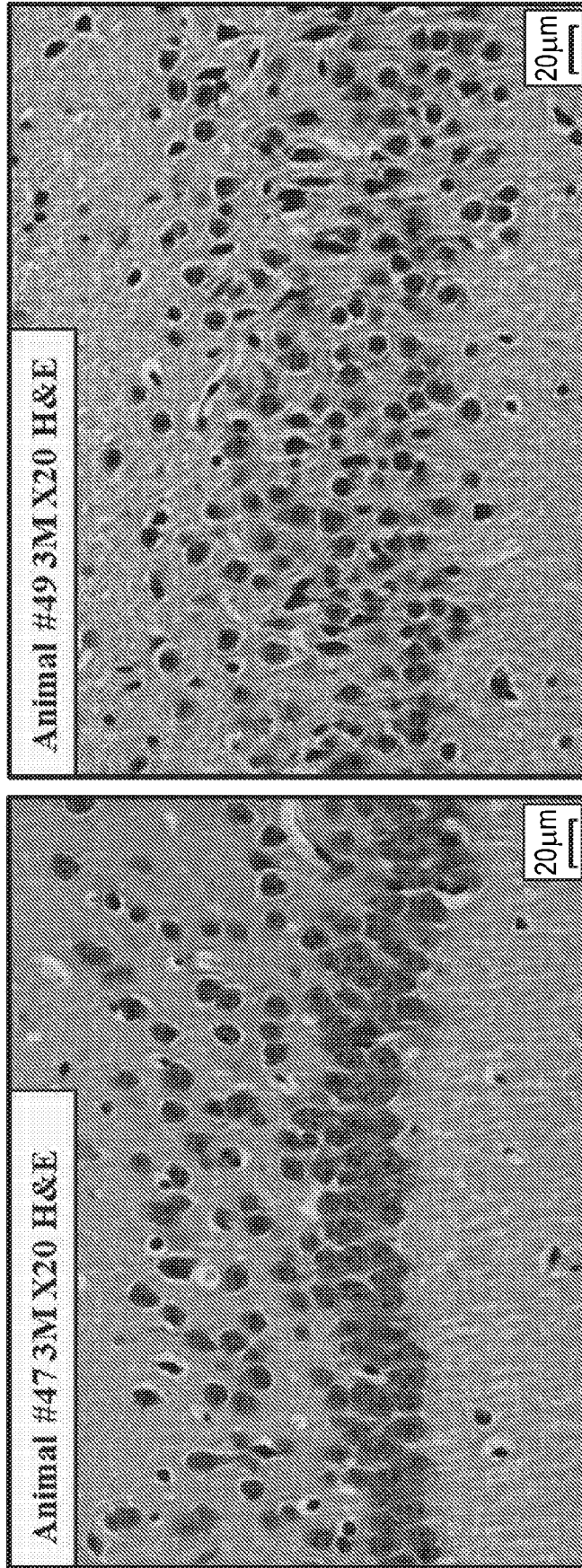


FIG. 6C (cont.)

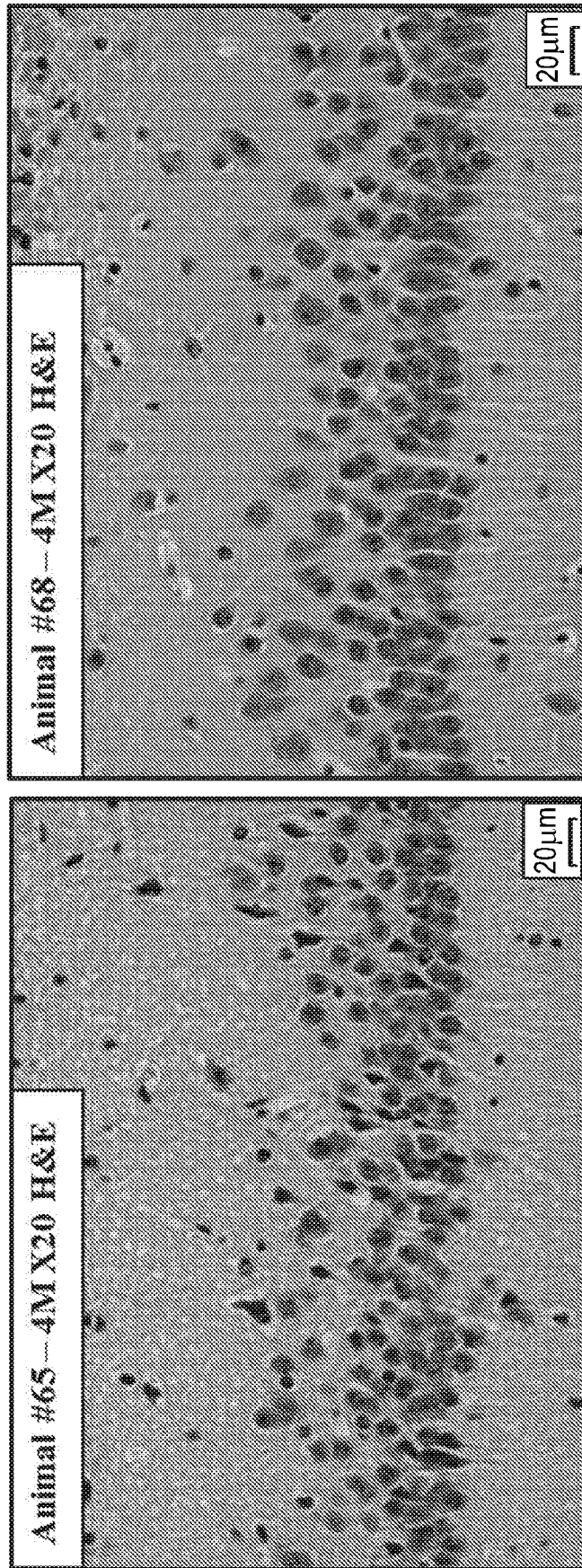


FIG. 6C (cont.)

