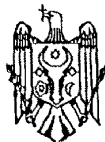




MD/EP 3359172 T2 2019.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3359172 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 35/74 (2015.01.01)
A61P 1/14 (2006.01.01)
A61P 29/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0808 (22) Data de depozit: 2017.12.12 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17818220.0, 2017.12.12 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3359172, 2019.06.12 (31) Numărul cererii prioritare: 201621123 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.12.12 (33) Țara cererii prioritare: GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2019, 2019.10.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 24/2019, 2019.06.12 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 10/2018, 2018.10.31
(71) Solicitant: 4D PHARMA PLC, GB (72) Inventatori: JEFFERY Ian, IE; SHANAHAN Fergus, IE; O'TOOLE Paul, IE; STEVENSON Alex, GB; MULDER Imke, GB; SAVIGNAC Helene, GB (73) Titular: 4D PHARMA PLC, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții care conțin tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

1

Sunt furnizate compoziții care cuprind o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de creștere a diversității microbiotei și/sau inducere a stabilității microbiotei la un subiect.

2

Secvențe: 5
Revendicări: 13
Figuri: 10

MD/EP 3359172 T2 2019.10.31

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

1

Provided are compositions comprising a bacterial strain of the genus *Blautia*, for use in a method of increasing the microbiota diversity and/or inducing stability of the microbiota of a

2

subject.

Sequences: 5

Claims: 13

Fig.: 10

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

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

FUNDALUL INVENȚIEI

- 10 Se crede că intestinul uman este steril *in utero*, dar este expus la o varietate largă de microbi maternali și din mediu imediat după naștere. Apoi, are loc o perioadă dinamică de colonizare microbiană și succesiune, care este influențată de factori cum ar fi modul de administrare, mediu, dietă și genotipul gazdei, toate acestea având impact asupra compoziției microbiotei intestinale, în special în timpul vieții timpurii. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine precum a adultului [1]. Microbiota intestinală umană conține mai mult de 1500 de filotipuri diferite dominate în niveluri de abundență de către două diviziuni (*încrengături*) bacteriene majore, Bacteroidetes și Firmicutes [2]. Relațiile simbiotice de succes care se ivesc din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat o varietate largă de funcții benefice metabolice, structurale, protectoare și altele. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură o degradare a componentelor dietetice altfel indigerabile cu eliberarea produselor secundare care asigură o sursă importantă de nutrienți pentru gazdă și alte beneficii pentru sănătate. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine-recunoscută și este exemplificată la animalele fără germeni ce au un sistem imunitar alterat care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriilor comensale [3-5].

- 20 Modificări dramatice în compoziția microbiotei au fost documentate în tulburări gastrointestinale cum ar fi boala inflamatorie intestinală (IBD). De exemplu, nivelurile bacteriilor *Clostridium* cluster XIVa sunt reduse la subiecții cu IBD în timp ce numărul de *E. coli* este crescut, sugerând o schimbare în echilibrul dintre simbiozii și patobionzii din intestin [6-9, 18].

- 30 Ca recunoaștere a potențialului efect pozitiv pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animal, diferite tulpini au fost propuse pentru utilizare ca tratament în diferite boli (vezi, de exemplu, [10-13]). Un număr de tulpini, incluzând mai ales tulpinile de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor tulburări intestinale (vezi [14] pentru o revedere și vezi [15]). Referința [16] propune utilizarea tulpinilor din genul *Blautia* pentru folosire în modularea echilibrului microbian al ecosistemului digestiv. În contextul referinței 16, modularea se referă la promovarea activității florei bacteriene acetogene în detrimentul bacteriilor metanogene și reducătoare de sulf. Acest document prin urmare învață numai despre o creștere a bacteriilor acetogene. Nu există nicio discuție referitoare la diversitatea speciilor care aparțin unui număr de taxoni. Referința [17] discută utilizarea *Blautia* pentru îmbunătățirea supraviețuirii la pacienții afectați de boala grea versus gazdă (GVDH). Ea menționează că diversitatea bacteriană crescută este asociată cu mortalitate legată de GVDH redusă și că cantitățile crescute de bacterii din genul *Blautia* au fost asociate cu GVDH redusă. Totuși, nu există nicio sugestie că administrarea de *Blautia* la un pacient efectuează o creștere în diversitatea microbiotei și/sau induce stabilitate a microbiotei la un subiect.

- 45 Relația între diferite tulpini bacteriene și diferite boli, și efectele precise ale particulelor tulpini bacteriene asupra intestinului și la un nivel sistemic și asupra oricăror tipuri particulare de boli, sunt slab caracterizate și rezultatele până în prezent sunt variabile și pun mai multe întrebări decât furnizează răspunsuri [18].

- 50 Un semn distinctiv al multor boli la om legate de alterarea microbiotei este pierderea diversității microbiotei. Spre deosebire de așa numita *disbioză* care este pur și simplu o compoziție de microbiotă modificată în comparație cu microbiota tipică agregată de la subiecții sănătoși, pierderea diversității microbiotei poate fi cuantificată printr-o reducere măsurabilă a numărului de clasificări bacteriene bazate pe secvență sau Unități Taxonomice Operaționale (OTU) într-o mostră, determinat de obicei prin metode de secvențiere a ampliconului de ARNr de 16S. Pierderea diversității este de asemenea măsurată prin reduceri în Indicele de Diversitate Shannon, sau indicele Chao. Diversitatea redusă a microbiotei este raportată în studiile recente ale obezității, bolii inflamatorii intestinale (IBD), sindromului de colon iritabil (IBS), diabetului de tip 2 și oamenilor în vârstă fragili [20]. Restabilirea microbiotei sănătoase poate fi dificilă deoarece bacteriile din intestin sunt rezistente la colonizare. Aceasta reprezintă o provocare atunci când se încearcă tratarea microbiotei subiecților nesănătoși prin creșterea diversității microbiotei [19].

Pierderea însoțitoare a funcției metabolice microbiene se presupune a fi un factor care contribuie la simptomele acestor patofiziologii. În contrast cu adulții sănătoși la care microbiota este stabilă, microbiota subiecților nesănătoși cum ar fi a celor care suferă de IBD, IBS și a subiecților vârstnici fragili este instabilă [18, 20].

- 5 Există o cerință pentru ca potențialele efecte ale bacteriilor intestinale să fie caracterizate astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii care utilizează bacterii intestinale.

REZUMATUL INVENȚIEI

- 10 Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor și tulburărilor prin creșterea sau menținerea diversității microbiotei intestinale la un subiect. În particular, inventatorii au identificat faptul că tulpinile bacteriene din genul *Blautia* pot fi eficiente în creșterea sau menținerea numărului și/sau uniformității diferitelor tipuri de bacterii în intestinul distal al unui subiect. După cum s-a descris în exemple, administrarea orală de compoziții cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* crește diversitatea microbiotei în fecale. Această creștere a diversității a fost observată la subiecții sănătoși și cu IBS. Totuși, subiecții cu IBS care au primit placebo au prezentat o reducere semnificativă statistic în diversitatea microbiomului în timpul desfășurării studiului. Suplimentar, exemplele arată că tratamentul cu compoziții cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica*, dar nu placebo, a crescut stabilitatea microbiotei la subiecții cu IBS pe parcursul studiului. Stabilitatea microbiotei la subiecții primind compoziția cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* a fost comparabilă cu cea a subiecților sănătoși de control.

- 20 Prin urmare, într-o primă realizare, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea sindromului de colon iritabil în care tratamentul sau prevenirea cuprinde creșterea diversității microbiotei la subiect.

- 25 Termenul „creșterea sau menținerea diversității microbiotei” este utilizat în acest document pentru a semnifica creșterea sau menținerea numărului diferitelor tipuri de bacterii și/sau uniformității diferitelor tipuri de bacterii în microbiota unui subiect. Diversitatea microbiotei este crescută. În unele realizări, numărul diferitelor genuri de bacterii în microbiotă este crescut. În unele realizări, numărul diferitelor specii de bacterii în microbiotă este crescut. În unele realizări, numărul diferitelor tulpini de bacterii în microbiotă este crescut. În unele realizări, diversitatea microbiotei este menținută. În unele realizări, numărul diferitelor genuri de bacterii în microbiotă este menținut. În unele realizări, numărul diferitelor specii de bacterii în microbiotă este menținut. În unele realizări, numărul diferitelor tulpini de bacterii în microbiotă este menținut. În unele realizări, numărul genurilor, speciilor și tulpinilor în microbiotă este crescut sau menținut.

- 35 Creșterea diversității microbiotei poate fi pentru bacteriile ne-acetogene. Aceasta poate fi de asemenea atât pentru bacteriile acetogene cât și ne-acetogene. Astfel de bacterii sunt bine cunoscute în domeniu. Pe scurt, bacteriile acetogene produc acetat ca un produs final al respirației anaerobe sau al fermentării.

- 40 În unele realizări, pierderea, creșterea sau menținerea diversității microbiotei poate fi cuantificată printr-o reducere, creștere sau menținere măsurabilă, în mod respectiv, a numărului de clasificări bacteriene pe baza secvenței sau Unități Taxonomice Operaționale (OTU) într-o mostră, de obicei determinate prin metode de secvențiere a ampliconului de ARNr de 16S. În unele realizări, pierderea diversității poate fi măsurată prin reduceri în Indicele de Diversitate Shannon, sau indicele Chao. Invers, în unele realizări, o creștere a diversității poate fi măsurată prin o creștere în Indicele de Diversitate Shannon, sau indicele Chao. În mod similar, în unele realizări, menținerea diversității poate fi măsurată prin același rezultat în Indicele de Diversitate Shannon, sau indicele Chao.

- 50 În unele realizări, uniformitatea diferitelor tipuri de bacterii este crescută. În unele realizări, abundența relativă a diferitelor tipuri de bacterii în microbiotă devine mai mare chiar după tratamentul sau prevenirea cu o compoziție a invenției.

- 55 Inventatorii au dezvoltat de asemenea noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor și tulburărilor prin inducerea stabilității microbiotei intestinale. În particular, inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene din genul *Blautia* induc stabilitate microbiotei intestinale. Prin „induc stabilitate” se înțelege că diversitatea microbiotei rămâne stabilă și de asemenea numărul relativ al diferitelor Genuri în microbiotă rămâne stabil. Acest lucru este important deoarece un număr de boli și tulburări, incluzând IBS și IBD, sunt caracterizate prin stabilitate redusă a microbiotei. Așa cum s-a descris în exemple, administrarea orală de compoziții cuprinzând *Blautia hydrogenotrophica* induce stabilitate microbiotei din fecale. Prin urmare, într-o realizare suplimentară, divulgarea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de inducere a stabilității microbiotei la un subiect. În

mod similar, există de asemenea furnizată o metodă de inducere a stabilității microbiotei la un subiect cuprinzând utilizarea unei tulpini bacteriene din genul *Blautia*.

În unele realizări din divulgare, numărul relativ al diferitelor specii bacteriene în microbiota unui subiect devine mai stabil după tratamentul sau prevenirea cu o compoziție din divulgare, de exemplu la un subiect diagnosticat cu o boală sau tulburare caracterizată prin o reducere a diversității microbiotei. În unele realizări din divulgare, numărul relativ al diferitelor Genuri bacteriene în microbiota unui subiect devine mai stabil după tratamentul sau prevenirea cu o compoziție din divulgare, de exemplu la un subiect diagnosticat cu o boală sau tulburare caracterizată prin o reducere a diversității microbiotei. Stabilitatea microbiotei unui subiect poate fi evaluată prin compararea microbiomului de la subiect la două momente diferite de timp. Dacă există o diferență în microbiom, aceasta poate indica o boală sau o tulburare ca fiind prezentă. În unele realizări, cele două momente de timp diferite sunt cel puțin la trei zile distanță (de exemplu la cel puțin 1 săptămână, 2 săptămâni, 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 2 ani distanță). În unele realizări, cele două momente de timp diferite sunt la 3-7 zile distanță, 1-2 săptămâni distanță, 2-4 săptămâni distanță, 4-8 săptămâni distanță, 8-24 săptămâni distanță, 24-40 săptămâni distanță, 40-52 săptămâni distanță sau mai mult de 52 de săptămâni distanță. În unele realizări, sunt utilizate mai mult de două momente de timp diferite, de exemplu trei, patru, cinci sau mai mult de cinci momente de timp. Intervalele adecvate sunt alese între diferitele momente de timp, de exemplu, așa cum s-a stabilit mai sus.

Tulpina bacteriană este de *Blautia hydrogenotrophica* și este preferabil bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

În unele realizări, diversitatea microbiotei se referă la diversitatea microbiotei în fecalele subiectului. În unele realizări, diversitatea microbiotei se referă la diversitatea microbiotei într-o mostră de fecale de la subiect. În unele realizări, diversitatea microbiotei se referă la diversitatea microbiotei în intestinul distal al subiectului. În unele realizări, diversitatea microbiotei se referă la diversitatea microbiotei în tractul gastrointestinal al subiectului. În unele realizări, diversitatea microbiotei se referă la diversitatea microbiotei în cecum. În unele realizări, diversitatea microbiotei se referă la diversitatea microbiotei în colon.

Invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a sindromului de colon iritabil în care tratamentul sau prevenirea cuprinde creșterea diversității microbiotei. În unele realizări, tratamentul sau prevenirea utilizând o compoziție a invenției conduce la creșterea diversității microbiotei până la nivelurile prezente la un individ sănătos. În unele realizări, tratamentul sau prevenirea utilizând o compoziție a invenției conduce la creșterea diversității microbiotei până la niveluri mai mari decât cele prezente la unii indivizi sănătoși. În unele realizări, individul sănătos este de o vârstă similară/aceeași cu a subiectului și/sau este de o rasă similară/aceeași cu a subiectului. În mod similar, invenția furnizează de asemenea o metodă de tratament sau prevenire a unei boli sau tulburări asociate cu un nivel de diversitate a microbiotei care este redus față de diversitatea microbiotei unui subiect sănătos în care metoda cuprinde administrarea unei compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*. Exemplele de boli sau tulburări asociate cu un nivel redus al diversității microbiotei includ dar nu sunt limitate la: IBS, IBD [21], obezitate [22], diabet de tip 2, boli infecțioase, boli alergice, boli autoimune și boli/tulburări metabolice. Tratamentul sau prevenirea acestor boli și tulburări este cuprins de către invenție. În unele realizări, boala sau tulburarea este IBS.

În unele realizări, subiectul este un nou născut sau copil cu o diversitate a microbiotei redusă în comparație cu a unui nou născut sau copil sănătos, în mod respectiv. S-a observat că unii copii care dezvoltă o boală alergică mai târziu în viață au o diversitate redusă a microbiotei fecale asemeni nou născuților în vârstă de 1 săptămână [23]. Astfel, în unele realizări, nou născutul are vârsta mai mică de 1 săptămână, are vârsta mai mică de 2 săptămâni, are vârsta mai mică de o lună, are vârsta mai mică de două luni sau are vârsta mai mică de patru luni. În unele realizări, subiectul este un nou născut care nu a fost născut printr-o naștere vaginală. De exemplu, în unele realizări, subiectul este un nou născut care a fost născut prin secțiune cezariană. Diversitatea redusă a microbiotei a fost de asemenea raportată la subiecții vârstnici fragili. În unele realizări, prin urmare, subiectul este un subiect varstnic, de exemplu, un subiect varstnic fragil. În unele realizări, subiectul este în vârstă de 65 de ani sau mai mult (de exemplu în vârstă de 70 de ani sau mai mult, 75 sau mai mult, 80 sau mai mult, 85 sau mai mult sau 90 sau mai mult) [20].

S-a estimat că un singur individ uman are aproximativ 101 specii bacteriene diferite și 195 de tulpini diferite în microbiota sa [24]. Corespunzător, în unele realizări, compoziția este pentru utilizare în tratarea unui subiect având mai puțin de 101 specii bacteriene diferite (de exemplu mai puțin de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 sau 70 de specii bacteriene) și/sau mai puțin de 195 de tulpini diferite (de exemplu mai puțin de 194, 193, 192, 191,

190, 189, 188, 187, 186, 185, 183, 180, 175, 170, 165, 160, 150, 140 de tulpini bacteriene) în microbiota sa. În unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 80 de specii bacteriene (de exemplu mai mult de 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 sau 100 de specii bacteriene) sau până la 101 specii bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 90 de specii bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 95 de specii bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 97 de specii bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 99 de specii bacteriene. În unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 160 de tulpini bacteriene (de exemplu mai mult de 165, 170, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193 sau 194 de specii bacteriene) sau până la 195 de tulpini bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 175 de tulpini bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 185 de tulpini bacteriene. De exemplu, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei până la mai mult de 190 de tulpini bacteriene.

În unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei cu cel puțin un gen bacterian (de exemplu cu cel puțin două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă sau zece genuri bacteriene). În unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei cu cel puțin o specie bacteriană (de exemplu cu cel puțin două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, 12, 15, 17 sau 20 de specii bacteriene). În unele realizări, tratamentul sau prevenirea conduce la creșterea diversității microbiotei cu cel puțin o tulpină bacteriană (de exemplu cu cel puțin două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, 12, 15, 17, 20 sau 25 de tulpini bacteriene).

În unele realizări, divulgarea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau tulburări asociate cu stabilitate redusă a microbiotei în comparație cu stabilitatea microbiotei la un subiect sănătos (sau în comparație cu o populație de subiecți sănătoși). Prin „stabilitate redusă a microbiotei” se înțelege că diversitatea microbiotei nu rămâne așa de stabilă și de asemenea numărul relativ al diferitelor Genuri în microbiotă nu rămâne așa de stabil ca stabilitatea observată la un subiect sănătos sau într-o populație de subiecți sănătoși. În unele realizări, inducerea stabilității microbiotei conduce la o stabilitate indusă până la un nivel similar celui care este prezent la un subiect sănătos, sau într-o populație de subiecți sănătoși. În unele realizări, inducerea stabilității microbiotei conduce la o stabilitate indusă până la același nivel ca cel care este prezent la un subiect sănătos, sau într-o populație de subiecți sănătoși. În mod similar, divulgarea furnizează o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau tulburări asociate cu stabilitate redusă a microbiotei în care metoda cuprinde administrarea unei compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*. De exemplu, patogeniza unor boli sau tulburări este caracterizată prin stabilitate redusă a microbiotei. Exemplele de astfel de boli și tulburări sunt IBS, IBD, diabet (de exemplu diabet de tip 2), boli alergice, boli autoimune și boli/tulburări metabolice. Corespunzător, în unele realizări, divulgarea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau tulburări asociate cu stabilitate redusă a microbiotei, în care tratamentul sau prevenirea cuprinde inducerea stabilității microbiotei. În unele realizări, boala sau tulburarea este selectată dintre IBS, IBD, diabet (de exemplu diabet de tip 2), boli alergice, boli autoimune și boli/tulburări metabolice. În unele realizări, boala sau tulburarea este IBS sau IBD. În unele realizări, boala sau tulburarea este IBS. Corespunzător, în unele realizări, divulgarea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a IBS sau IBD, în care tratamentul sau prevenirea cuprinde inducerea stabilității microbiotei.

În unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea sindromului de colon iritabil în care tratamentul sau prevenirea cuprinde creșterea diversității microbiotei subiectului cuprinzând în plus diagnosticarea unui subiect ca având un nivel redus al diversității microbiotei și apoi dacă un nivel redus de diversitate este descoperit ca fiind prezent, administrarea unei compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica* către subiect.

În unele realizări, divulgarea furnizează o metodă de tratament sau prevenire a unei boli sau tulburări asociate cu stabilitate redusă a microbiotei față de stabilitatea microbiotei la un subiect sănătos în care metoda cuprinde diagnosticarea unui subiect ca având stabilitate redusă a

microbiotei și apoi dacă stabilitatea redusă este descoperită ca fiind prezentă, administrarea unei compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia* către subiect.

Tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia hydrogenotrophica*. Tulpinile strans înrudite au o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr de 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*. Tulpina bacteriană poate avea o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5. Preferabil, tulpina bacteriană are secvența de ARNr de 16s din SEQ ID NO:5. Cel mai preferabil, tulpina bacteriană din compoziție este tulpina de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

În anumite realizări, compoziția invenției este pentru administrare orală. Administrarea orală a tulpinilor invenției poate fi eficientă pentru creșterea diversității microbiotei și/sau inducerea stabilității microbiotei. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru subiecți și practicieni și permite administrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

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

În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă pentru prepararea de compoziții stabile care permit administrarea bacteriilor, și s-a arătat că furnizează compoziții eficiente în exemple.

În anumite realizări, invenția furnizează un produs alimentar cuprinzând compoziția cum s-a definit în revendicări.

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție de vaccin cuprinzând compoziția cum s-a definit în revendicări.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Comparație a microbiotei la pacienții sănătoși și cu IBS.

Figura 2: Comparație a diversității microbiotei între Ziua 16 și Ziua 1 pentru pacienții sănătoși și cu IBS după tratamentul cu BlautiX sau placebo.

Figura 3: A) Interconectivitatea microbiomului la pacienții sănătoși la Ziua 1, Ziua 16 și sfârșitul studiului după tratamentul cu BlautiX, B) Interconectivitatea microbiomului la pacienții cu IBS la Ziua 1, Ziua 16 și sfârșitul studiului după tratamentul cu BlautiX. Rezultatele interconectivității observate în Ziua 1, Ziua 16 și la Sfârșitul studiului pentru indivizii sănătoși care sunt prezentate în Figura 3A sunt de asemenea prezentate în Figurile 3A1, 3A2 și 3A3, în mod respectiv. Rezultatele interconectivității observate în Ziua 1, Ziua 16 și la Sfârșitul studiului pentru pacienții cu IBS care sunt prezentate în Figura 3B sunt de asemenea prezentate în Figurile 3B1, 3B2 și 3B3, în mod respectiv.

Figura 4: O comparație a instabilității în profilurile microbiotei la pacienții sănătoși și cu IBS după tratamentul cu BlautiX sau placebo la A) Ziua 16 și Ziua 1, B) sfârșitul studiului și Ziua 1 și C) sfârșitul studiului și Ziua 16.

Figura 5: Comparație a diversității microbiotei la diferite momente de timp pentru pacienții sănătoși și cu IBS după tratamentul cu BlautiX.

Figura 6: A) Rețeaua de excludere reciprocă la pacienții sănătoși la Ziua 1, Ziua 16 și sfârșitul studiului după tratamentul cu BlautiX, B) Rețeaua de excludere reciprocă la pacienții cu IBS la Ziua 1, Ziua 16 și sfârșitul studiului după tratamentul cu BlautiX. Rezultatele excluderii reciproce observate în Ziua 1, Ziua 16 și la Sfârșitul studiului pentru indivizii sănătoși care sunt prezentate în Figura 6A sunt de asemenea prezentate în Figurile 6A1, 6A2 și 6A3, în mod respectiv. Rezultatele excluderii reciproce observate în Ziua 1, Ziua 16 și la Sfârșitul studiului pentru pacienții cu IBS care sunt prezentate în Figura 6B sunt de asemenea prezentate în Figurile 6B1, 6B2 și 6B3, în mod respectiv.

Figura 7: Gruparea ierarhică a microbiotei.

Figura 8: Comparație a profilurilor microbiotei înainte (D14) (Ziua 14) și după (D32) tratamentul cu Blautix pe baza deosebirilor Bray-Curtis.

Figura 9: (A) Vizualizare a profilurilor microbiotei din diferite grupuri la D-14 (Ziua 14) utilizând PCoA pe baza deosebirilor Bray-Curtis. (B) Vizualizare a profilurilor microbiotei din grupuri la D14 utilizând PCoA pe baza deosebirilor Bray-Curtis. (C) Diferența semnificativă (valoarea $p=0,002$) în profilurile microbiotei pentru grupul cu Blautix a fost observată peste punctele în timp.

Figura 10: Comparație a profilurilor microbiotei pentru tratamentul cu Blautix la punctele în timp de studiu (D-14, D-1, D34) pe baza deosebirilor Bray-Curtis.

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpinile bacteriene

5

Compozițiile pentru utilizare conform invenției cuprind o tulpină bacteriană din genul *Blautia hydrogenotrophica*. Exemplele demonstrează că bacteriile din aceste specii sunt utile pentru creșterea diversității microbiotei și/sau inducerea stabilității microbiotei. Cea mai preferată este bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

10

Speciile *Blautia* sunt bacterii pozitive la reacția Gram, ne-mobile care pot fi fie cocoide fie ovale și toate sunt obligat anaerobe care produc acid acetic ca produs final major al fermentării glucozei [25]. *Blautia* poate fi izolată din intestinul uman, deși *B. producta* a fost izolată dintr-o mostră cu septicemie.

15

Blautia hydrogenotrophica (cunoscută anterior ca *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) a fost izolată din intestinalele mamiferelor, este strict anaerobă, și metabolizează H_2/CO_2 la acetat, care poate fi important pentru nutriția omului și sănătate. Tulpina tip de *Blautia hydrogenotrophica* este S5a33 = DSM 10507 = JCM 14656. Numărul de acces al GenBank pentru secvența genei ARNr de 16S a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 este X95624.1 (divulgată în acest document ca SEQ ID NO:5). Această tulpină exemplară de *Blautia hydrogenotrophica* este descrisă în [25] și [26]. Tulpina S5a33 și tulpina S5a36 corespund la două subclone ale unei tulpini acetogene izolată dintr-o mostră de fecale a unui subiect sănătos. Ele prezintă morfologie, fiziologie și metabolism identice și au secvențe identice de ARNr de 16S. Astfel, în unele realizări, *Blautia hydrogenotrophica* pentru utilizare în invenție are secvența de ARNr de 16s din SEQ ID NO:5.

25

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294 a fost testată în exemple și este de asemenea menționată în acest document ca tulpină BH. Tulpina BH a fost depozitată cu Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [Colecția germană de microorganisme] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germania) pe 10 mai 2001 ca „*Ruminococcus hydrogenotrophicus*” sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294. Deponentul a fost INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, Franța. Proprietatea bacteriei depozitate ca DSM 10507 și DSM 14294 a trecut prin cesiune către 4D Pharma Plc.

30

35

Tulpinile bacteriene strâns înrudite cu tulpina testată în exemple sunt de asemenea așteptate să fie eficiente pentru creșterea diversității microbiotei și/sau inducerea stabilității microbiotei. În anumite realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr de 16s a unei tulpini bacteriene de *Blautia hydrogenotrophica*. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:5. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență de ARNr de 16s care are secvența din SEQ ID NO:5.

40

45

Tulpinile de *Blautia hydrogenotrophica* care sunt biotipuri ale bacteriei depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 sunt de asemenea așteptate să fie eficiente pentru creșterea diversității microbiotei și/sau inducerea stabilității microbiotei. Un biotip este o tulpină strâns înrudită care are aceleași caracteristici fiziologice și biochimice sau foarte similare.

50

55

Tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotide pentru o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294. De exemplu, substanțial întregul genom poate fi secvențiat și o tulpină biotip pentru utilizare în invenție poate avea cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență asupra a cel puțin 80% din întregul său genom (de exemplu asupra a cel puțin 85%, 90%, 95% sau 99%, sau asupra întregului său genom). De exemplu, în unele realizări, o tulpină biotip are cel puțin 98% identitate de secvență asupra a cel puțin 98% din genomul său sau cel puțin 99% identitate de secvență asupra a 99% din genomul său. Alte secvențe adecvate pentru utilizare în identificarea tulpinilor biotip pot include hsp60 sau secvențe repetitive cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)₅, sau REP sau [28]. Tulpinile biotip pot avea secvențe cu cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294. În unele realizări, o tulpină biotip are o secvență cu cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 și cuprinde o secvență de ARNr de 16s care este cel puțin 99% identică (de exemplu cel puțin 99,5% sau cel puțin 99,9%

60

identică) cu SEQ ID NO:5. În unele realizări, o tulpină biotip are o secvență cu cel puțin 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a tulpinii de *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 și are secvența de ARNr de 16s din SEQ ID NO:5.

Alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin utilizarea depozitului cu numărul de acces DSM 10507/14294 și analiza cu fragment de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismului lungimii fragmentelor amplificat fluorescent (FAFLP) și amprentarea prin PCR cu element de ADN repetitiv (rep), sau profilarea proteinelor, sau secvențierea parțială a ADN-ului de 16S sau 23s. În realizările preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini de *Blautia hydrogenotrophica*.

În anumite realizări, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpini care furnizează același tipar cu o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 când s-a analizat prin analiza de restricție a ADN-ului ribozomal amplificat (ARDRA), de exemplu când se utilizează enzima de restricție Sau3AI (pentru metode exemplare și îndrumare vezi, de exemplu,[29]). Alternativ, tulpinile biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași tipare de fermentare a carbohidraților precum o bacterie depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294.

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

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

O derivată a tulpinii depozitate sub numărul de acces DSM 10507/14294 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din cea originală. O derivată a unei tulpini a invenției poate fi modificată, de exemplu la nivel genetic, fără a elimina activitatea biologică. În particular, o tulpină derivată a invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea activitate modulatorie a microbiotei comparabilă cu tulpina DSM 10507/14294 originală. În particular, o tulpină derivată va declanșa efecte comparabile asupra microbiotei cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în Exemple. O derivată a tulpinii DSM 10507/14294 va fi în general un biotip al tulpinii DSM 10507/14294.

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

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

55

Utilizările terapeutice

Compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea diversității microbiotei, așa cum s-a definit în revendicări. Diversitatea redusă a microbiotei este asociată cu numeroase boli și tulburări patologice, și exemplele demonstrează că compozițiile invenției pot fi eficiente pentru creșterea diversității microbiotei. Corespunzător, boala sau tulburarea de tratat sau prevenit

60

utilizând o compoziție a invenției este preferabil o boală sau tulburare asociată cu un nivel de diversitate a microbiotei care este redus față de diversitatea microbiotei unui subiect sănătos, cum s-a definit în revendicări. Astfel, în unele realizări, boala sau tulburarea poate fi asociată cu un nivel de diversitate a microbiotei care este redus față de diversitatea microbiotei unui subiect

5 sănătos și de asemenea poate fi asociată cu o stabilitate redusă a microbiotei.

Compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea IBS. Tratamentul sau prevenirea cuprinde creșterea diversității microbiotei și/sau inducerea stabilității microbiotei la subiect.

10 În realizările preferate, compozițiile invenției cuprind bacteria depozitată sub numărul de acces DSM 10507/14294 și sunt pentru utilizare în creșterea diversității microbiotei la subiect în tratamentul IBS.

15 În anumite realizări, compozițiile sunt pentru utilizare la subiecții care prezintă, sau sunt de așteptat să prezinte, niveluri reduse ale diversității microbiotei, de exemplu, atunci când se compară cu un subiect sănătos, sau o populație de subiecți sănătoși. De exemplu, în unele realizări, compoziția este pentru utilizare în tratarea unui subiect având mai puțin de 101 specii bacteriene diferite (de exemplu mai puțin de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90, 85, 80, 75 sau 70 de specii bacteriene) și/sau mai puțin de 195 de tulpini diferite (de exemplu mai puțin de 193, 190, 187, 185, 183, 180, 175, 170, 165, 160, 150, 140 de tulpini bacteriene) în microbiota sa. De exemplu, în unele realizări, compoziția este pentru utilizare în tratarea unui subiect care are cel puțin un gen bacterian (de exemplu cel puțin 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 genuri bacteriene) mai puțin în microbiota intestinală a sa în comparație cu un subiect sănătos sau în comparație cu o populație de subiecți sănătoși. În unele realizări, tratamentul sau prevenirea cuprinde o etapă de diagnosticare a unui subiect ca având un nivel redus al diversității microbiotei și apoi dacă un nivel redus de diversitate este descoperit ca fiind prezent, subiectul este apoi tratat cu o compoziție conform invenției.

25 În anumite realizări, subiectul este un nou născut. În anumite realizări, subiectul este un copil. În anumite realizări, subiectul este un adult.

30 În anumite realizări, subiectul este un subiect sănătos. De exemplu, în unele realizări în care compoziția este utilizată pentru prevenirea unei boli sau tulburări, subiectul este un subiect sănătos, opțional unul identificat ca fiind la risc de a dezvolta o boală sau tulburare caracterizată prin o reducere a diversității microbiotei.

35 În anumite realizări, subiectul a primit anterior, primește, sau va primi un tratament cu antibiotic. Corespunzător, în unele realizări, tratamentul sau prevenirea cuprinde administrarea compoziției invenției după, împreună cu, sau înainte de tratamentul cu antibiotic. Compoziția invenției și acel unul sau mai multe antibiotice poate fi pentru administrare separată, simultană sau secvențială.

40 În unele realizări, compoziția invenției este pentru utilizare într-o metodă de creștere a diversității microbiotei la un subiect având un nivel crescut de hidrogen în respirația sa față de un subiect sănătos. În unele realizări, compoziția invenției este pentru utilizare în reducerea nivelului de hidrogen în respirația unui subiect care prezintă sau care este așteptat să prezinte un nivel redus de diversitate a microbiotei sale. Subiectul este preferabil un subiect diagnosticat ca având IBS. Tratamentul cu o compoziție a invenției reduce nivelul de hidrogen detectat în testele de respirație pentru hidrogen. Corespunzător, nivelurile de hidrogen sunt preferabil evaluate utilizând un test al respirației pentru hidrogen. Testul respirației pentru hidrogen este bine cunoscut în domeniu și astfel persoana calificată va ști cum să efectueze un astfel de test. În unele realizări, subiectului îi este administrată lactuloză ca substrat pentru test.

45 Testul respirației pentru hidrogen este de asemenea o unealtă utilă pentru monitorizarea eficacității sau eficacității probabile a creșterii diversității microbiotei și a tratamentului sau prevenirii utilizând o compoziție a invenției. De exemplu, o reducere a nivelului de hidrogen detectat în respirația unui subiect după tratamentul cu o compoziție a invenției poate indica că tratamentul are un efect de creștere, stabilizare, terapeutic sau preventiv. Corespunzător, în unele realizări utilizările invenției cuprind suplimentar monitorizarea nivelului de hidrogen în respirația unui subiect în timpul și/sau după tratamentul cu o compoziție a invenției și prin urmare evaluarea eficacității sau eficacității probabile a creșterii, stabilizării, tratamentului sau prevenirii. De exemplu, nivelurile de hidrogen pot fi monitorizate de una sau mai multe (de exemplu 1, 2, 3, 4 sau mai mult de 4) ori, de exemplu, incluzând înaintea tratamentului, la începerea tratamentului, în timpul tratamentului, la sfârșitul tratamentului și/sau după tratament, după cum se dorește. În unele realizări, nivelul de hidrogen în respirația subiectului la sfârșitul și/sau după perioada de dozare (în timpul căreia compoziția este administrată subiectului) este comparat cu nivelul de la începutul și/sau înaintea perioadei de dozare și o reducere a nivelului indică eficacitatea sau eficacitatea probabilă a creșterii, stabilizării, tratamentului sau prevenirii. De exemplu, în realizările în care

5 perioada de dozare este de 16 zile, poate fi dezirabil să se facă măsurători în ziua 1 și ziua 16, sau de exemplu în ziua 1, ziua 2, ziua 15 și ziua 16. În unele realizări, sunt luate mai multe măsurători și este obținută media acelor măsurători (de exemplu, media din ziua 1 și ziua 2 și media din ziua 15 și ziua 16). În unele realizări, o reducere de cel puțin 40 ppm a nivelului Cmax de hidrogen
 10 indică faptul că creșterea, stabilizarea, tratamentul sau prevenirea este eficientă sau probabilă să fie eficientă. În unele realizări, nivelul de hidrogen în respirația subiectului este măsurat numai o dată, de exemplu, la sfârșit sau după tratament, și descoperirea că nivelul este la sau aproape de un nivel predeterminat este indicator că creșterea, stabilizarea, tratamentul sau prevenirea este probabilă să fi fost eficientă. Testul respirației pentru hidrogen este un test standard și astfel nivelurile
 15 predeterminate sunt cunoscute în domeniu.

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

15 Bacteriile din microbiotă pot fi detectate în fecalele de la un subiect, utilizând tehnici standard, cum ar fi tehnicile qPCR utilizate în exemple.

Modurile de administrare

20 Preferabil, compozițiile invenției trebuie să fie administrate tractului gastrointestinal pentru a permite distribuirea la nivelul și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană a invenției, cum s-a definit în revendicări. În general, compozițiile invenției sunt administrate oral, dar acestea pot fi administrate rectal, intranazal, sau pe căile bucală sau sublinguală.

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

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

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

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

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

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

50 În anumite realizări, compoziția invenției poate fi administrată unui animal gestant, de exemplu un mamifer cum ar fi un om pentru a preveni nivelurile reduse de diversitate în microbiotă și/sau stabilitatea redusă a microbiotei care se dezvoltă la copilul ei *in utero* și/sau după ce acesta este născut.

55 Compozițiile invenției pot fi administrate unui subiect care a fost diagnosticat cu diversitate redusă a microbiotei față de un subiect sănătos și/sau stabilitate redusă a microbiotei sau o boală sau tulburare asociată cu diversitate redusă a microbiotei față de un subiect sănătos și/sau stabilitate redusă a microbiotei, sau care a fost identificat ca fiind la risc de diversitate redusă a microbiotei față de un subiect sănătos și/sau stabilitate redusă a microbiotei. Compozițiile pot fi de asemenea administrate ca o măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea de diversitate redusă a microbiotei față de un subiect sănătos și/sau stabilitate redusă a microbiotei la
 60 un subiect sănătos.

Compozițiile invenției pot fi administrate la un subiect care a fost identificat ca având o microbiotă anormală în intestin. De exemplu, subiectul poate avea o colonizare redusă sau absentă cu *Blautia*, și în particular *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

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

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

Compozițiile

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

Preferabil, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine-stabilită și îndrumarea relevantă este disponibilă în, de exemplu, referințele [30-32]. Exemplele demonstrează că compozițiile liofilizate sunt eficiente în mod special.

Alternativ, compoziția invenției poate cuprinde o cultură bacteriană vie, activă.

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

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

În realizările preferate, compoziția invenției este încapsulată pentru a permite distribuirea tulpinii bacteriene intestinului. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la distribuire la locul țintei prin, de exemplu, rupere cu stimuli chimici sau fizici cum ar fi presiune, activitate enzimatică, sau dezintegrare fizică, care poate fi declanșată de modificările în pH. Orice metodă adecvată de încapsulare poate fi utilizată. Tehnicile exemplare de încapsulare includ capturarea într-o matrice poroasă, atașarea sau adsorbția pe suprafețe solide purtătoare, auto-agregarea prin floculare sau cu agenți de reticulare, și izolarea mecanică în spatele unei membrane microporoase sau o microcapsulă. Îndrumarea asupra încapsulării care poate fi utilă pentru prepararea compozițiilor invenției este disponibilă, de exemplu, în referințele [33] și [34].

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

Compoziția poate fi formulată ca probiotic.

O compoziție a invenției include o cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană a invenției, cum s-a definit în revendicări. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui subiect. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a conduce la distribuirea în și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului subiectului.

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

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

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

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

În anumite realizări, compoziția de probiotic a prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 până la aproximativ 30% din masă, raportat la greutatea totală a compoziției, (de exemplu de la 5 până la 20% din masă). Carbohidrații pot fi selectați din grupul constând din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu catenă scurtă, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, gumă arabică modificată și amidonuri rezistente, polidextroză, D-tagatoză, fibre de acacia, fibre de roșcovă, ovăz, și citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate prezentate în acest document mai jos ca FOS-c.c); menționatele FOS-c.c. nu sunt carbohidrați digerabili, obținuți în general prin conversia zahărului din sfeclă și incluzând o moleculă de zaharoză la care sunt legate trei molecule de glucoză.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemplele de astfel de excipienți adecvați pot fi găsite în referința [35]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referința [36]. Exemplele de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și alții asemenea. Exemplele de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi selectată în funcție de calea de administrare intenționată și de practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de, purtător, excipient sau diluant orice liant(ți) adecvat, lubrifiant(ți), agent(ți) de punere în suspensie, agent(ți) de acoperire, agent(ți) de solubilizare. Exemplele de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale cum ar fi glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitori din porumb, gume naturale și sintetice, cum ar fi de acacia, tragacantă sau alginat de sodiu, carboximetil celuloză și polietilen glicol. Exemplele de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și alții asemenea. Conservanți, stabilizatori, coloranți și chiar agenți de aromatizare pot fi prevăzuți în compoziția farmaceutică. Exemplele de conservanți includ benzoat de sodiu, acid sorbic, cisteină și esteri de acid p-hidroxibenzoic. Pot fi utilizați de asemenea antioxidanți și agenți de punere în suspensie. Un exemplu suplimentar de purtător adecvat este zaharoza. Un exemplu suplimentar de conservant este cisteina.

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

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

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

o singură specie de *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin nicio altă specie bacteriană, sau cuprind numai cantități *infime* sau irelevante biologic de bacterii dintr-o altă specie. În anumite realizări, compozițiile invenției cuprind o singură tulpină de *Blautia hydrogenotrophica*, și nu conțin nicio altă tulpină bacteriană sau specie, sau cuprind numai cantități *infime* sau irelevante biologic de bacterii dintr-o altă tulpină sau specie.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană așa cum s-a utilizat în invenție; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a crește diversitatea microbiotei la un subiect și/sau induce stabilitate microbiotei și/sau a trata o tulburare asociată cu diversitate redusă a microbiotei și/sau stabilitate redusă a microbiotei atunci când se administrează la un subiect care are nevoie de aceasta, diversitatea microbiotei, de exemplu, o boală sau tulburare cum ar fi IBS, IBD, obezitate, diabet de tip 2, una sau mai multe boli infecțioase, una sau mai multe boli alergice, una sau mai multe boli autoimune sau una sau mai multe boli/tulburări metabolice.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de la aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități formatoare de colonii per gram în raport cu o greutate a compoziției.

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

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

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

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

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitor de porumb, acacia, tragacant, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, polietilen glicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

În unele realizări, formularea enterică cuprinde o acoperire enterică. În unele realizări, formularea este o formă de dozare acoperită enteric. De exemplu, formularea poate fi o tabletă acoperită enteric sau o capsulă acoperită enteric, sau altele asemenea. Acoperirea enterică poate fi o acoperire enterică convențională, de exemplu, o acoperire convențională pentru o tabletă, capsulă, sau altele asemenea pentru administrare orală. Formularea poate cuprinde o acoperire cu film, de exemplu, un strat subțire de film dintr-un polimer enteric, de exemplu un polimer insolubil la acid.

În unele realizări, formularea enterică este intrinsec enterică, de exemplu, gastro-rezistentă fără necesitatea unei acoperiri enterice. Astfel, în unele realizări, formularea este o formulare enterică care nu cuprinde o acoperire enterică. În unele realizări, formularea este o capsulă făcută dintr-un material de termogelificare. În unele realizări, materialul de termogelificare este un material celulozic, cum ar fi metilceluloză, hidroximetilceluloză sau hidroxipropilmetilceluloză (HPMC). În unele realizări, capsula cuprinde o cochilie care nu conține niciun polimer formator de film. În unele realizări, capsula cuprinde o cochilie și cochilia cuprinde hidroxipropil-metilceluloză și nu cuprinde niciun polimer formator de film (de exemplu vezi [37]). În unele realizări, formularea este o capsulă enterică intrinsec (de exemplu, Vcaps® de la Capsugel).

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

Metodele de cultivare

Tulpinile bacteriene pentru utilizare în prezenta invenție pot fi cultivate utilizând tehnici standard de microbiologie cum s-a detaliat în, de exemplu, referințele [38-40].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi de exemplu agar YCFA sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (per 100ml, valori aproximative): Casitone (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteină (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄·7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurin (0,1 mg), hemină (1 mg), biotină (1 μg), cobalamină (1 μg), acid *p*-aminobenzoic (3 μg), acid folic (5 μg), și piridoxamină (15 μg).

Tulpinile bacteriene pentru utilizare în compozițiile de vaccin

Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene ale invenției sunt utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor sau tulburărilor asociate cu un nivel de diversitate a microbiotei care este redus față de diversitatea microbiotei unui subiect sănătos (sau față de diversitatea microbiotei unei populații de subiecți sănătoși) și/sau bolilor sau tulburărilor care sunt asociate cu stabilitate redusă a microbiotei în comparație cu un subiect sănătos (sau în comparație cu o populație de subiecți

sănătoși). Acesta probabil este rezultatul efectului pe care tulpinile bacteriene ale invenției îl au asupra sistemului imunitar al gazdei. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi de asemenea utile pentru prevenirea unor astfel de boli sau tulburări atunci când se administrează ca compoziții de vaccin. În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției sunt viabile. În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției sunt capabile să colonizeze parțial sau total intestinul. În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției sunt viabile și capabile să colonizeze parțial sau total intestinul. În alte anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției pot fi omorâte, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de realizări, compozițiile pot cuprinde un adjuvant al vaccinului. În anumite realizări, compozițiile sunt pentru administrare prin injecție, cum ar fi prin injecție subcutanată.

Generalități

Practica din prezenta invenție va utiliza, dacă nu se indică altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în limitele calificării din domeniu. Astfel de tehnici sunt explicate complet în literatură. Vezi, *de exemplu*, referințele [41] și [42-48], etc.

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

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

Cuvântul „substanțial” nu exclude „complet” *de exemplu* o compoziție care este „substanțial lipsită” de Y poate fi complet lipsită de Y. Unde este necesar, cuvântul „substanțial” poate fi omis din definiția invenției.

Referirile la o identitate de secvență procentuală între două secvențe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, acel procent de nucleotide sunt aceleași la compararea celor două secvențe. Această aliniere și omologia procentuală sau identitatea de secvență pot fi determinate utilizând programe de software cunoscute în domeniu, de exemplu acelea descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [49]. O aliniere preferată este determinată prin algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman utilizând o căutare a discontinuității afine cu o penalizare de deschidere a discontinuității de 12 și o penalizare de extensie a discontinuității de 2, matrice BLOSUM de 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este divulgat în ref. [50].

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

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

MODURI PENTRU EFECTUAREA INVENȚIEI

Exemplul 1 - Modificările în microbiota pacientului după tratamentul cu Blautia hydrogenotrophica

Rezumat

Efectul *Blautia hydrogenotrophica* asupra diversității și stabilității microbiotei pacientului a fost testat la pacienții sănătoși și cu IBS.

Metodologie

Design-ul studiului

A fost efectuat un studiu clinic de Fază I în care *Blautia hydrogenotrophica* („Blautix”, tulpina depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294) s-a administrat la pacienții umani având IBS sau la pacienții umani sănătoși. Pacienților le-a fost administrat Blautix în timpul unei perioade de dozare (zilele 1-16) cu perioada de eliminare fiind ziua 19-23. Au fost colectate mostre de fecale de la subiecții cu IBS & sănătoși, tratați cu

placebo sau Blautix, la: linia de bază, ziua 1 (D1) înainte de tratament; sfârșitul tratamentului ziua 16 (D-16); și la sfârșitul studiului (EOS), care a fost la 2-4 săptămâni post-tratament (eliminare).

Secvențierea ampliconului de 16S

O trusă Qiagen DNeasy Blood & Tissue a fost utilizată după instrucțiunile fabricantului, pentru a extrage ADN microbial din 0,2g de mostre de fecale congelate de la subiecții cu IBS & Sănătoși, tratați cu placebo sau Blautix, la: linia de bază, ziua 1 (D1) înainte de tratament; sfârșitul tratamentului ziua 16 (D-16); și la sfârșitul studiului (EOS), care a fost la 2-4 săptămâni post-tratament (eliminare).

Prepararea și secvențierea ampliconilor genelor de ARNr de 16S a fost efectuată utilizând protocolul 16S Sequencing Library Preparation Nextera dezvoltat de Illumina (San Diego, California, SUA). 50 ng din fiecare dintre extractele fecale de ADN au fost amplificate utilizând PCR și inițiatori țintind regiunea variabilă V3/V4 a genei de ARNr de 16S. Producții au fost purificate și au fost atașate coduri de bare înainte și înapoi printr-o a doua rundă a adaptorului PCR. Produsele PCR rezultate au fost purificate, cuantificate și cantități echimolare din fiecare amplicon au fost apoi reunite înainte de a fi trimise pentru secvențiere la furnizorul comercial GATC GmbH., pe oricare dintre platformele MiSeq (2x250 bp chimie) sau HiSeq (2 x 300 bp chimie).

Analiza datelor (Post-secvențiere)

Datele brute de secvență au fost prelucrate cu îmbinare utilizând metodologia rapidă. Aceasta filtrează în afară citirile de calitate joasă. Metodologia USEARCH pipeline (versiunea 8.1.1861_i86_linux64) a fost utilizată pentru a identifica tonurile unice și a le ascunde de etapa de generare a OTU (Unitatea Taxonomică Operațională). Algoritmul UPARSE a fost utilizat pentru a grupa secvențele în OTU-uri. Secvențele himerice generate în etapa de amplificare au fost îndepărtate utilizând algoritmul de îndepărtare a himerelor UCHIME cu baza de date de referință Chimeraslayer (descărcată: 9 septembrie 2016). Algoritmul de aliniere globală USEARCH a fost apoi utilizat pentru a cartografia toate citirile, incluzând tonurile unice pe secvențele OTU rămase. Scripturi proprii au fost utilizate pentru a grupa apoi secvențele în OTU după cum sunt clasificate prin algoritmul de aliniere globală USEARCH. Secvențele individuale au fost grupate în OTU pentru a da informația privind compoziția microbiomului (abundență și diversitate).

Analiza datelor la nivel înalt

Matricea de disimilaritate Bray-Curtis a fost generată pentru fiecare pereche de mostre utilizând librăria Vegan în R 3.3.1. Setul de date a fost vizualizat utilizând analiza Principal Coordinate cu matricea de disimilaritate Bray-Curtis.

O funcție R a reprezentării grafice termice creată de noi a fost utilizată pentru a genera o vizualizare a hărții termice cu gruparea ierarhică pe baza disimilarității Bray-Curtis și legăturii ward.

Indicii de diversitate Shannon și Simpson au fost generați utilizând librăria phyloseq în R.

Metodologia DESeq2 a fost utilizată pentru a identifica variabilele taxonomice care au fost semnificative pentru comparațiile alese.

MANOVA permutațională a fost efectuată pe matricea de disimilaritate utilizând funcția Adonis în R.

Rezultate

Mostrele din toate punctele în timp au fost grupate pentru ambele grupuri (71 de pacienți cu IBS și 67 de controale cu sănătoși incluzând atât grupurile tratate cu Blautix cât și cu placebo). Analiza a fost efectuată utilizând o măsură a distanței generată pe întregul set de date al microbiomului. Figura 1 raportează că microbiota subiecților cu IBS este semnificativ diferită de cea a subiecților sănătoși.

Analiza diversității a fost efectuată utilizând numărul Observat de taxoni preconizat (OTU-uri), indicele de diversitate Shannon și indicele de diversitate Simpson. Ambele grupuri de tratament au prezentat o creștere a diversității la punctul în timp Ziua 16 care a fost semnificativă pentru OTU-uri observate și au prezentat un trend pentru Simpson (Valoarea P Brută: < 0,1) (Figura 2). Această creștere în diversitate nu a fost observată cu pacienții tratați cu placebo. O

scădere semnificativă în diversitatea microbiotei a fost observată la grupul de placebo cu IBS netratat între Sfârșitul studiului și Ziua 1.

Figura 3 raportează că tratamentul cu Blautix a crescut conectivitatea de rețea a microbiotei a anumitor taxoni asociați cu sănătatea. La pacienții sănătoși o creștere substanțială a conexiunilor între microbi a fost observată din Ziua 1 până în Ziua 16 (după tratamentul cu Blautix), care sugerează o creștere a cooperării și structurii microbiotei (Figura 3A). Conectivitatea este corelată cu diversitatea și stabilitatea. După perioada de eliminare structura rețelei a revenit la o rețea similară celei observate în Ziua 1. Tratamentul cu Blautix a fost, prin urmare, capabil să crească interconectivitatea la pacienții sănătoși dar efectul a fost pierdut după eliminare. La pacienții cu IBS rețeaua a rămas similară în ceea ce privește conectivitatea între Ziua 1 și Ziua 16, dar o creștere a conectivității a fost observată la finalul studiului sugerând o structură a microbiotei crescută după perioada de eliminare la pacienții cu IBS tratați cu Blautix (Figura 3B). Efectul Blautix asupra conectivității microbiomului a fost, prin urmare, întârziat la pacienții cu IBS în comparație cu pacienții sănătoși.

Instabilitatea/modificarea în profilurile microbiotei a fost reprezentată prin distanțele Bray Curtis între punctele în timp ale aceluiași subiect. Bray-Curtis prezintă disimilaritate între profilurile abundenței speciilor limitate între 0-1 (0 = aceeași; 1 = nu împărtășesc vreo specie). Tratamentul pacienților cu IBS cu Blautix a redus magnitudinea modificărilor microbiotei în timpul tratamentului (Fig. 4A) și după tratament (Figurile 4B-4C). Aceasta arată că Blautix a crescut stabilitatea microbiotei la pacienții cu IBS și că modificarea continuă după intervenție. Această stabilitate crescută nu a fost observată când pacienților cu IBS le-a fost administrat placebo (Figurile 4 A-C).

Figura 5 raportează că a existat o creștere semnificativă în diversitatea microbiotei la nivelul genului pentru pacienții cu IBS tratați cu Blautix la Ziua 16 în comparație cu Ziua 1. Analiza diversității a fost efectuată utilizând indicele de diversitate Shannon aplicat la nivelul Genului (Valoare p brută: 0,04, Ziua 1 versus Ziua 16).

Figura 6A și Figura 6B prezintă modificările în rețelele de excludere reciprocă la pacienții sănătoși și cu IBS după tratamentul cu Blautix. La indivizii sănătoși rețeaua de excludere reciprocă devine mai densă și interconectată la Ziua 16, ceea ce sugerează competiția crescută și inhibarea. Acest efect a fost pierdut, totuși, până la finalul studiului deoarece structura rețelei a revenit înapoi la punctul în timp inițial în timpul perioadei de eliminare (Figura 6A). La pacienții cu IBS efectul lui Blautix asupra conectivității de excludere reciprocă a fost de a crește diametrul rețelei în timpul perioadei de tratament și perioadei de eliminare. Acest lucru a fost opus efectului observat la indivizii sănătoși unde rețeaua devine mai densă. În timpul fazei de eliminare pentru pacienții cu IBS, au fost observate multiple interacțiuni independente care nu au fost observate anterior. Multiple interacțiuni independente reprezintă perechi de taxoni care interacționează într-o manieră care este independentă de restul rețelei, adică nu au interacțiuni cu restul rețelei.

Vizualizarea microbiotei arată că după tratamentul cu Blautix a existat o conectivitate a rețelei crescută pentru anumiți taxoni asociați cu sănătatea (Figura 7). Taxonii asociați cu sănătatea includ Clostridium grupul IV, Bifidobacterium și Prevotella. Oscillibacter este de asemenea potențial un gen asociat cu sănătatea. Acești taxoni asociați cu sănătatea sunt implicați în răspunsul la tratament.

Exemplul 2 - Efectul protector la modelele de tulburări în neurodezvoltare

Modelul la șoarece BTBR

Modelul la șoarece BTBR utilizează șoareci consangvinizați, modificați genetic care afișează un fenotip robust de tip autistic. Deficiențele în comportamentele sociale, comportamentele repetitive crescute și comportamentele înrudite cu anxietatea crescute au fost raportate la această tulpină [51]. Datorită acestui fenotip comportamental robust, șoarecele BTBR este un model ideal la animal pentru a evalua eficacitatea noilor agenți terapeutici pentru tratamentul comportamentelor înrudite cu autismul. Ameliorarea unor astfel de simptome cu un bioterapeutic viu poate fi de asemenea un indicator al eficacității bioterapeuticului în tratamentul altor boli psihiatrice sau neurologice.

Șoarecii

Șoarecii BTBR masculi au fost înmulțiți în laboratorul propriu. Animalele au fost adăpostite într-o cameră cu temperatură și umiditate controlate pe un ciclu de 12 ore de întuneric (luminile aprinse de la ora 7:00-19:00). Toate experimentele au fost efectuate în conformitate cu Directiva Europeană 2010/63/EEC, cerințele S.I. Nr 543 din 2012, și aprobate de Comitetul de Etică în Experimentarea pe Animale al University College Cork.

Tulpina

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294.

5 Bioterapeuticul a fost furnizat în stoc de glicerol. Bioterapeuticele vii au fost crescute în instalație în condiții anaerobe.

Administrarea bioterapeuticului viu

10 Dozarea cu *Blautia hydrogenotrophica* a început când șoarecii aveau vârsta de 8 săptămâni. Acești șoareci au fost tratați o dată pe zi timp de 3 săptămâni prin gavaj oral.

Programul de administrare

Vehiculul pentru administrare orală este PBS. Administrarea orală zilnică are loc prin gavaj oral.

Colectarea fecalelor

20 Mostrele proaspete de fecale au fost colectate de la șoareci individuali înainte și după administrarea de *Blautia hydrogenotrophica*. Cel puțin 20 mg de fecale proaspete au fost plasate într-un tub de microcentrifugă, plasate imediat pe gheață și apoi depozitate la -80°C.

Rezultate

25 Efectul tratamentului cu Blautix asupra microbiotei între punctele în timp (D14, D32) este prezentat în Figura 8. Variația temporală semnificativă în profilurile microbiotei a fost observată (valoare $p = 0,001$) între punctele în timp ale studiului înainte de tratament (D14) și după tratament (D32).

Analiza diferențială utilizând DESeq2 a dat 25 de taxoni semnificativi (valoare p ajustată $< 0,05$) diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix între punctele în timp ale studiului de Autism D14 și D32. Taxonii sunt listați în **Tabelul 1** mai jos.

30 **Tabelul 1.** Taxoni semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D14 și D32 în studiul autismului. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D32 atunci când se compară cu D14.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare ajustată	p
2440650	Genul	Clostridium XIVa	19,706	3,008	6,9E-10	
307526	Specia	Bacteroides acidifaciens	11,275	0,912	5,0E-33	
39008	Specia	Bacteroides acidifaciens	10,501	1,345	1,0E-13	
277773	Specia	Alistipes finegoldii	9,954	0,906	2,8E-26	
1105465	Genul	Barnesiella	9,255	0,923	2,8E-22	
943687	Familia	Porphyromonadaceae	9,200	0,850	1,1E-25	
47662	Specia	Barnesiella intestinihominis	8,844	0,988	7,0E-18	
181003	Genul	Alistipes	8,370	2,069	4,2E-04	
1282905	Specia	Barnesiella intestinihominis	7,373	1,004	2,8E-12	
1370810	Specia	Barnesiella intestinihominis	6,633	1,986	0,006	
1203483	Specia	Bacteroides acidifaciens	6,599	1,584	2,7E-04	
74179	Specia	Alistipes massiliensis	6,318	1,899	0,006	
1640334	Specia	Barnesiella intestinihominis	6,258	2,066	0,013	
76239	Familia	Lachnospiraceae	6,202	1,229	4,6E-06	
308030	Specia	Barnesiella intestinihominis	6,196	1,451	1,8E-04	
1156020	Familia	Erysipelotrichaceae	5,827	1,607	0,002	
712755	Specia	Barnesiella intestinihominis	5,614	1,749	0,008	
11297	Familia	Porphyromonadaceae	5,450	1,021	1,0E-06	
2218722	Genul	Clostridium IV	3,983	1,017	0,001	
594012	Specia	Clostridium lactatifermentans	2,900	0,952	0,013	
453043	Specia	Eubacterium ventriosum	-3,675	1,260	0,018	
451019	Specia	Barnesiella intestinihominis	-4,055	1,540	0,041	
466087	Specia	Akkermansia muciniphila	-6,727	0,876	2,5E-13	
2153421	Genul	Blautia XIVa	-8,051	2,577	0,010	
866478	Specia	Barnesiella intestinihominis	-8,961	0,846	9,3E-25	

Rezumat

Intr-un model la șoarece de autism în care animalelor le-a fost administrat Blautix, s-a observat o variație semnificativă asupra microbiomului lor, incluzând o creștere substanțială netă în diversitatea bacteriană.

Exemplul 3 -Efectul la modelele de ischemie cerebrală**Rezumat**

Efectul protector al *Blautia hydrogenotrophica* a fost testat la modele la șoarece de ischemie cerebrală. În acest scop trei grupuri de 5-17 șoareci au fost testate. Numai animalele cu comportament normal au fost incluse în studiu. Prima zi de dozare a fost Ziua -14. Un grup a primit bacterii uscate prin congelare zilnic din prima zi de dozare până la terminare. Grupurile de control au primit fie vehicul fie liotampon.

În Ziua 1, toți șoarecii au fost anesteziați. O incizie mediană a fost creată în partea ventrală a gâtului pentru a expune arterele carotide comune stângă și dreaptă. Un model I/R de ischemie cerebrală-reperfuzie a fost apoi indus prin ocluzie bilaterală a arterelor carotide comune (BCCAO) utilizând cleme vasculare timp de 15 minute. La finalul fiecărei ocluzii, clemele au fost îndepărtate.

Tulpina

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294.

Programul de administrare

Nr. animalelor	Tratament	Nivelul de dozare (mg/kg)	Volumele de dozare (ml/kg sau ml/animal)
12	PBS (control negativ)	n/a	10
17	Pulbere criodesicată	7,8 mg în 100 μ l	100 μ l per animal
13	Bacterii criodesicate	15,6 mg în 100 μ l (doză de bacterii = 2×10^8)	100 μ l per animal

Design-ul studiului

Zilele -14 până la 14: Doză zilnică de control cu PBS (liotampon), control cu pulbere uscată prin congelare (vehicul) sau bacterii uscate prin congelare (Blautix).

Ziua 1: Modelul I/R de ischemie cerebrală-reperfuzie indus prin chirurgie.

Ziua 14: Jumătate din șoarecii din fiecare grup au fost uciși.

Ziua 14 până la 28: Doză zilnică de control cu PBS (liotampon), control cu pulbere uscată prin congelare (vehicul) sau bacterii uscate prin congelare (Blautix) pentru șoarecii rămași în fiecare grup.

Ziua 28: Uciderea șoarecilor rămași.

Granulele de fecale au fost colectate la trei puncte în timp: Ziua -14, Ziua 14 și Ziua 28. Fiecare preluare a fost efectuată într-un mediu steril (complet aseptice = curățat între animale), cu fiecare șoarece fiind scos din cușcă și plasat separat într-o cutie sterilă nouă pentru recoltare individuală a peletelor. Cât mai multe granule posibile au fost colectate pentru a atinge un minimum de 80mg și preferabil 100mg de material per șoarece.

Rezultate

Nu s-a detectat nicio diferență semnificativă în profilurile microbiotei între grupurile de tratament cu Blautix, Vehicul și Liotampon la D-14 (valoare $p = 0,177$) înainte de administrarea de Blautix (vezi Figura 9A). Totuși, au fost observate diferențe semnificative în profilurile microbiotei între diferitele grupuri de tratament la Ziua 14 (vezi Figura 9B) cu o valoare p observată de 0,011. Inventatorii au evaluat mai departe variația temporală în microbiota grupului tratat cu Blautix și au descoperit o diferență semnificativă (vezi Figura 9C) cu o valoare p observată de 0,002.

Analiza diferențială utilizând DESeq2 a dat taxonii semnificativi (valoare p ajustată <0,05) diferențial abundenți pentru tratamentul cu Vehicul, Liotampon și Blautix între punctele în timp din studiul cu Accident vascular cerebral, așa cum se arată în Tabelul 2, demonstrând un impact pe termen mai lung asupra diversității bacteriene transmis de Blautix. Taxonii pentru tratamentul cu Blautix sunt listați în Tabelul 3, Tabelul 4 și Tabelul 5.

Tabelul 2. Taxoni semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp din studiul cu Accident vascular cerebral.

	D-14->D14	D14->D28	D-14->D28
Vehicul	4	0	2
Liotampon	17	2	0
Blautix	7	14	12

10 **Tabelul 3.** Taxonii semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D-14 și D14 pentru tratamentul cu Blautix în studiul cu Accident vascular cerebral. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D14 atunci când se compară cu D-14.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
321825	Familia	Ruminococcaceae	1,647	0,470	0,027
74771	Specia	Alistipes massiliensis	1,530	0,442	0,027
567799	Genul	Alistipes	-1,215	0,308	0,008
77091	Genul	Clostridium	-1,634	0,489	0,036
472737	Familia	Lachnospiraceae	-2,585	0,667	0,008
615246	Familia	Lachnospiraceae	-3,003	0,711	0,007
166882	Familia	Lachnospiraceae	-5,547	1,406	0,008

15 **Tabelul 4.** Taxonii semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D14 și D28 pentru tratamentul cu Blautix în studiul cu Accident vascular cerebral. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D28 atunci când se compară cu D14.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată	p
1101936	Ordinul	Clostridiales	3,275	0,709	0,001	
218505	Specia	Roseburia faecis	2,568	0,630	0,002	
948888	Genul	Bamesiella	2,499	0,575	0,001	
612631	Genul	Clostridium XIVa	2,473	0,723	0,011	
201398	Încrângătura	Bacteroidetes	2,045	0,605	0,011	
1370810	Specia	Bamesiella intestinihominis	1,878	0,579	0,016	
770554	Specia	Alistipes putredmis	1,868	0,626	0,033	
558330	Genul	Prevotella	1,795	0,453	0,002	
943687	Familia	Porphyromonadaceae	1,586	0,546	0,039	
308030	Specia	Bamesiella intestinihominis	1,324	0,361	0,005	
176124	Încrângătura	Bacteroidetes	1,163	0,294	0,002	
565518	Specia	Oscillospira guilliermondii	-1,571	0,488	0,016	
544582	Specia	Flavonifractor plautii	-1,599	0,569	0,050	
25678	Specia	Mucispirillum schaedleri	-2,751	0,640	0,001	

20 **Tabelul 5.** Taxonii semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D-14 și D28 pentru tratamentul cu Blautix în studiul cu Accident vascular cerebral. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D28 atunci când se compară cu D-14.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
688867	Genul	Clostridium XIVa	8,296	1,136	3,8E-11
612631	Genul	Clostridium XIVa	7,814	1,348	3,1E-07
560658	Familia	Lachnospiraceae	5,241	1,243	0,001
929749	Specia	Eubacterium ruminantium	3,190	0,829	0,003
518034	Specia	Desulfovibrio fairfieldensis	3,098	0,982	0,024
74771	Specia	Alistipes massiliensis	2,548	0,714	0,007
23310	Specia	Odoribacter laneus	1,621	0,475	0,011

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
117624	Ordinul	Clostridiales	-1,748	0,612	0,049
411272	Genul	Clostridium XIVa	-2,923	1,019	0,049
39008	Specia	Bacteroides acidifaciens	-2,953	0,816	0,007
331352	Genul	Clostridium XIVa	-3,969	0,626	1,6E-08
77091	Genul	Clostridium	-4,247	1,426	0,039

Analiza diferențială utilizând DESeq2 a dat taxonii semnificativi (valoare p ajustată <0,05) diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix vs. Vehicul precum și tratamentul cu Blautix vs. Liotampon pentru punctele în timp ale studiului cu Accident vascular cerebral, așa cum se arată în Tabelul 6. Taxonii sunt listați în Tabelul 7, Tabelul 8 și Tabelul 9.

Tabelul 6. Taxoni semnificativi diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix în studiul cu Accident vascular cerebral.

	D-14	D14	D28
Blautix vs. Vehicul	0	10	0
Blautix vs. Liotampon	2	13	0

Tabelul 7. Taxoni semnificativi diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix vs. Vehicul la D14 în studiul cu Accident vascular cerebral.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
25678	Specia	Mucispirillum schaedleri	2,604	0,688	0,014
3119687	7 Familia	Lachnospiraceae	2,445	0,642	0,014
321825	Familia	Ruminococcaceae	2,174	0,564	0,014
627	Genul	Clostridium XIVa	1,915	0,601	0,043
308030	Specia	Barnesiella intestinihominis	-1,324	0,419	0,043
137081C	Specia	Barnesiella intestinihominis	-1,540	0,425	0,019
187271	Specia	Ruminococcus flavefaciens	-3,475	1,065	0,042
277773	Specia	Alistipes finegoldii	-3,751	1,178	0,043
940566	Specia	Staphylococcus lentus	-5,228	1,519	0,026
930972	Genul	Staphylococcus	-5,418	1,536	0,023

Tabelul 8. Taxoni semnificativi diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix vs. Liotampon la D-14 în studiul cu Accident vascular cerebral

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
1161472	Familia	Lachnospiraceae	6,511	1,403	0,001
392940	Regnul	Bacteria	-5,169	1,346	0,022

Tabelul 9. Taxoni semnificativi diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix vs. Liotampon la D14 în studiul cu Accident vascular cerebral

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
25678	Specia	Mucispirillum schaedleri	2,704	0,753	0,012
1379349	Genul	Clostridium XIVa	2,517	0,771	0,027
742656	Specia	Oscillibacter valericigenes	1,738	0,459	0,009
558330	Genul	Prevotella	-1,634	0,406	0,006
1370810	Specia	Barnesiella intestinihominis	-1,780	0,390	0,001
712755	Specia	Barnesiella intestinihominis	-1,827	0,464	0,006
47662	Specia	Barnesiella intestinihominis	-2,109	0,606	0,014
1640334	Specia	Barnesiella intestinihominis	-2,260	0,693	0,027
1105465	Genul	Barnesiella	-2,306	0,627	0,010
161658	Familia	Lachnospiraceae	-2,565	0,816	0,037
277773	Specia	Alistipes finegoldii	-3,619	1,034	0,014
187271	Specia	Ruminococcus flavefaciens	-3,924	1,057	0,010

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare p ajustată
459041	Specia	Lactobacillus johnsonii	-4,029	0,981	0,006

Rezumat

Blautix determină o creștere semnificativă a diversității microbiotei pe perioada studiului la un model la șoarece de accident vascular cerebral, atunci când se compară cu controlul cu liotampon sau cu vehicul.

Exemplul 4 - Efectul protector la modelele de afecțiuni neuroinflamatorii

Encefalomielita autoimună experimentală (EAE) este un model la șoarece de inflamație a SNC care oglindește multe aspecte ale bolii la om de MS și EAE este cel mai obișnuit model experimental utilizat pentru MS la om. EAE este de asemenea utilizată mai în general ca model pentru tulburările autoimune specifice SNC [52] și pentru alte afecțiuni specifice, incluzând encefalomielita diseminată acută. EAE este indusă utilizând imunizarea cu peptide de mielină și adjuvanți pentru a declanșa un răspuns imun și inflamator care corespunde strâns cu mecanismele care stau la baza multor tulburări autoimune și inflamatorii ale SNC, și în particular MS. Multe terapii care au arătat eficacitate în EAE au prezentat eficacitate de asemenea în tratamentul MS la pacienții umani [52]. Cel mai important, EAE reproduce caracteristici cheie ale MS, incluzând inflamație, demielinare, pierdere axonală și glioză. Efectele demielinării sunt restricționate în principal la măduva spinării în EAE, cu puțină alterare a trunchiului cerebral și cerebelului. În EAE celulele T CD4+ sunt populația dominantă de celule găsite în SNC.

Metodologie

Blautia hydrogenotrophica („Blautix“, tulpină depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294) a fost utilizată ca pulbere criodesicată și reconstituită după cum este necesar. Au fost utilizate 12 femele adulte de șoareci C57BL/6J.

În Ziua 0 și Ziua 7, animalelor le-a fost administrată o emulsie conținând MOG35-55 și adjuvantul complet Freund (CFA) suplimentat cu Mycobacterium Tuberculosis H37Ra prin injecții subcutanate sub anestezie cu gaz (izofluran). În Ziua 0, au fost efectuate două injecții subcutanate în flancuri; una în fiecare cadran inferior al spatelui. În Ziua 7, au fost efectuate două injecții subcutanate în flancuri, una în fiecare cadran superior al spatelui.

În Ziua 0 și Ziua 2, animalelor le-a fost administrată toxina de pertussis (tuse convulsivă) (PTx) în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) prin injecții intra-peritoneale. În Ziua 0, administrarea PTx a fost efectuată după injecțiile MOG.

Tratamentele cu Blautix sau controale au fost administrate din Ziua -14 în conformitate cu programul următor:

Ziua 0: MOG/CFA, o dată, SC

Ziua 0: PTx, o dată, IP

Ziua 2, PTx, o dată, IP

Ziua 7: MOG/CFA, o dată, SC

Tratamentele au fost administrate în 15 minute de la prepararea lor. Blautix a fost administrat la o doză de 2×10^8 ; 100μl/șoarece.

Din Ziua 0 până la finalul experimentului, animalele au fost notate zilnic pentru semne clinice de EAE, incluzând pareza și paralizia cozii și/sau a membrilor.

În Ziua -14, Ziua -1 și Ziua 34, granulele de fecale au fost colectate de la fiecare animal, imediat congelate rapid și depozitate la -80°C.

Rezultate

Efectul tratamentului cu Blautix asupra microbiotei între punctele în timp (D-14, D-1, D34) pentru modelul de MS este prezentat în Figura 10. A fost observată variația temporală semnificativă în profilurile microbiotei (valoare $p = 0,001$) pentru punctele în timp ale studiului.

Analiza diferențială utilizând DESeq2 a dat taxoni semnificativi (valoare p ajustată $< 0,05$) diferențial abundenți pentru tratamentul cu Blautix între punctele în timp ale studiului, așa cum se arată în Tabelul 10. Taxonii sunt listați în Tabelul 11, Tabelul 12 și Tabelul 13.

Tabelul 10. Taxoni semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp din studiul cu MS.

	D-14->D-1	D-1->D34	D-14->D34
--	-----------	----------	-----------

	D-14->D-1	D-1->D34	D-14->D34
MS (Blautix)	42	30	58

Tabelul 11. Taxoni semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D-14 și D-1 din studiul cu MS. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D-1 atunci când se compară cu D-14.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare ajustată p
1105465	Genul	Barnesiella	8,076	0,702	2,2E-28
48633	Genul	Clostridium XIVa	7,304	0,825	7,0E-17
490405	Specia	Turicibacter sanguinis	6,824	0,778	1,0E-16
491106	Specia	Flavonifractor plautii	5,116	0,923	4,3E-07
43241	Genul	Clostridium XIVa	5,041	0,739	2,2E-10
948888	Genul	Barnesiella	4,649	0,605	4,3E-13
47662	Specia	Barnesiella intestinihominis	4,276	0,501	5,1E-16
1288839	Familia	Lachnospiraceae	4,117	1,170	0,003
11297	Familia	Porphyromonadaceae	4,081	0,600	2,2E-10
198591	Familia	Lachnospiraceae	3,757	0,788	2,3E-05
49543	Familia	Lachnospiraceae	3,275	0,897	0,002
1009304	Specia	Oscillospira guilliermondii	3,140	1,043	0,015
930464	Specia	Insolitispirillum peregrinum	2,804	1,033	0,029
1793164	Genul	Parasutterella	2,720	0,576	2,6E-05
1260915	Regnul	Bacteria	2,678	0,804	0,006
36112	Specia	Clostridium leptum	2,584	0,887	0,018
181003	Genul	Alistipes	2,581	0,555	3,3E-05
149837	Familia	Lachnospiraceae	2,434	0,678	0,002
1056232	Genul	Clostridium XIVa	2,308	0,856	0,030
770554	Specia	Alistipes putredinis	2,223	0,556	0,001
1176501	Familia	Lachnospiraceae	2,079	0,758	0,028
33530	Specia	Acetatifactor muris	1,965	0,569	0,004
43033	Genul	Alistipes	1,788	0,379	2,6E-05
576748	Familia	Ruminococcaceae	1,740	0,603	0,019
50759	Specia	Oscillospira guilliermondii	1,570	0,409	0,001
592877	Specia	Pseudoflavonifractor capillosus	1,512	0,418	0,002
712755	Specia	Barnesiella intestinihominis	1,509	0,502	0,015
375558	Specia	Barnesiella intestinihominis	1,505	0,554	0,029
307526	Specia	Bacteroides acidifaciens	1,499	0,492	0,014
74641	Specia	Bacteroides acidifaciens	1,418	0,532	0,032
943687	Familia	Porphyromonadaceae	1,162	0,397	0,018
791734	Genul	Clostridium XIVa	-1,064	0,377	0,023
19031	Specia	Anaerotruncus colihominis	-1,391	0,516	0,030
74179	Specia	Alistipes massiliensis	-1,810	0,305	4,7E-08
211238	Specia	Anaeroplasma abactoclasticum	-2,662	0,859	0,012
76239	Familia	Lachnospiraceae	-2,721	0,668	4,2E-04
743544	Genul	Clostridium XIVa	-3,014	0,672	7,0E-05
993522	Genul	Clostridium XIVa	-3,394	0,708	2,2E-05
76325	Genul	Lactobacillus	-3,621	0,575	5,2E-09
209309	Familia	Lachnospiraceae	-3,857	1,295	0,016
567799	Genul	Alistipes	-5,435	0,634	4,3E-16
77091	Genul	Clostridium	-6,877	1,048	1,0E-09

5

Tabelul 12. Taxoni semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D-1 și D34 din studiul cu MS. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D34 atunci când se compară cu D-1.

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare ajustată p
1370810	Specia	Barnesiella intestinihominis	4,794	1,196	0,001

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare ajustată p
1684470	Specia	Parasutterella excrementihominis	4,434	1,167	0,002
1070245	Specia	Eubacterium plexicaudatum	3,870	0,961	0,001
518034	Specia	Desulfovibrio fairfieldensis	3,867	0,962	0,001
1482481	Specia	Clostridium disporicum	3,228	1,112	0,029
567799	Genul	Alistipes	3,218	0,864	0,002
1404432	Specia	Bacteroides acidifaciens	2,978	0,835	0,004
1067514	Genul	Barnesiella	2,967	0,921	0,011
76325	Genul	Lactobacillus	2,893	0,683	0,001
307526	Specia	Bacteroides acidifaciens	2,218	0,351	1,8E-08
1288839	Familia	Lachnospiraceae	2,084	0,746	0,035
866478	Specia	Barnesiella intestinihominis	1,936	0,647	0,022
23133	Familia	Ruminococcaceae	1,840	0,544	0,007
472737	Familia	Lachnospiraceae	1,697	0,524	0,011
842401	Ordinul	Clostridiales	1,601	0,535	0,022
39008	Specia	Bacteroides acidifaciens	1,494	0,390	0,002
74179	Specia	Alistipes massiliensis	1,426	0,328	3,9E-04
277773	Specia	Alistipes finegoldii	1,323	0,461	0,029
76234	Familia	Lachnospiraceae	-1,183	0,333	0,004
948888	Genul	Barnesiella	-1,453	0,520	0,035
150155	Familia	Lachnospiraceae	-1,609	0,421	0,002
783115	Familia	Desulfovibrionaceae	-2,262	0,608	0,002
773427	Specia	Anaerotruncus colihominis	-2,443	0,661	0,003
201157	Familia	Lachnospiraceae	-2,587	0,754	0,006
596894	Genul	Clostridium XIVa	-2,616	0,909	0,029
43033	Genul	Alistipes	-3,236	0,718	2,2E-04
1793164	Genul	Parasutterella	-3,758	0,632	1,4E-07
49543	Familia	Lachnospiraceae	-4,849	0,920	5,5E-06
490405	Specia	Turicibacter sanguinis	-5,152	0,704	2,5E-11
48282	Familia	Lachnospiraceae	-5,460	0,666	4,7E-14

Tabelul 13. Taxoni semnificativi diferențial abundenți între punctele în timp D-14 și D34 din studiul cu MS. O modificare pozitivă este interpretată ca crescută la D34 atunci când se compară cu D-14.

5

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare ajustată p
1105465	Genul	Barnesiella	7,221	0,754	2,1E-19
48633	Genul	Clostridium XIVa	6,734	0,959	8,7E-11
1288839	Familia	Lachnospiraceae	5,820	0,811	3,5E-11
518034	Specia	Desulfovibrio fairfieldensis	5,459	0,999	8,3E-07
1684470	Specia	Parasutterella excrementihominis	5,289	1,408	0,001
1482481	Specia	Clostridium disporicum	4,947	1,295	0,001
1370810	Specia	Barnesiella intestinihominis	4,734	1,263	0,001
1070245	Specia	Eubacterium plexicaudatum	4,620	0,794	1,3E-07
1067514	Genul	Barnesiella	4,544	1,103	2,8E-04
1575843	Specia	Clostridium ruminantium	4,393	1,743	0,040
43241	Genul	Clostridium XIVa	4,284	0,817	2,4E-06
47662	Specia	Barnesiella intestinihominis	4,273	0,478	3,8E-17
1728285	Genul	Lachnospiraceae incertae sedis	4,204	1,221	0,003
11297	Familia	Porphyromonadaceae	3,921	0,577	3,4E-10
307526	Specia	Bacteroides acidifaciens	3,539	0,534	9,9E-10
198591	Familia	Lachnospiraceae	3,273	0,762	1,4E-04
236126	Specia	Oscillospira guilliermondii	3,175	1,086	0,015
930464	Specia	Insolitispirillum peregrinum	3,152	0,848	0,001
948888	Genul	Barnesiella	3,040	0,629	1,6E-05

OTU_ID	Nivelul cel mai mic	Clasificare	modificare log2	eroare st	valoare ajustată p
491106	Specia	Flavonifractor plautii	3,039	1,170	0,034
563211	Familia	Lachnospiraceae	2,564	0,965	0,030
149837	Familia	Lachnospiraceae	2,562	0,890	0,016
770554	Specia	Alistipes putredinis	2,520	0,455	6,2E-07
1260915	Regnul	Bacteria	2,505	0,677	0,001
36112	Specia	Clostridium leptum	2,483	0,916	0,026
1056232	Genul	Clostridium XIVa	2,319	0,664	0,002
39008	Specia	Bacteroides acidifaciens	2,107	0,274	9,9E-13
23133	Familia	Ruminococcaceae	2,049	0,614	0,004
74641	Specia	Bacteroides acidifaciens	2,002	0,457	1,0E-04
712755	Specia	Barnesiella intestinihominis	1,977	0,470	2,0E-04
277773	Specia	Alistipes finegoldii	1,881	0,388	1,6E-05
1404432	Specia	Bacteroides acidifaciens	1,805	0,563	0,006
1176501	Familia	Lachnospiraceae	1,654	0,630	0,032
544582	Specia	Flavonifractor plautii	1,418	0,540	0,032
76234	Familia	Lachnospiraceae	-0,991	0,389	0,038
80190	Familia	Lachnospiraceae	-1,113	0,348	0,006
182471	Ordinul	Clostridiales	-1,315	0,472	0,021
494032	Specia	Clostridium oroticum	-1,502	0,580	0,034
2367602	Ordinul	Clostridiales	-1,518	0,472	0,006
74771	Specia	Alistipes massiliensis	-1,617	0,408	0,001
172154	Genul	Clostridium XIVa	-1,628	0,442	0,001
993522	Genul	Clostridium XIVa	-1,799	0,594	0,011
791734	Genul	Clostridium XIVa	-1,842	0,387	2,2E-05
150155	Familia	Lachnospiraceae	-1,859	0,532	0,002
743544	Genul	Clostridium XIVa	-2,196	0,558	0,001
567799	Genul	Alistipes	-2,378	0,513	3,9E-05
96345	Genul	Clostridium XIVa	-2,528	0,667	0,001
19031	Specia	Anaerotruncus colihominis	-2,575	0,610	1,9E-04
201157	Familia	Lachnospiraceae	-2,615	0,866	0,011
578360	Familia	Lachnospiraceae	-2,870	0,586	1,4E-05
76239	Familia	Lachnospiraceae	-3,325	0,631	2,3E-06
1165458	Familia	Lachnospiraceae	-3,346	0,754	8,1E-05
773427	Specia	Anaerotruncus colihominis	-3,475	0,776	7,0E-05
209309	Familia	Lachnospiraceae	-3,639	1,042	0,002
320120	Genul	Clostridium XIVa	-3,670	0,811	5,9E-05
1628488	Specia	Vallitalea guaymasensis	-4,144	1,538	0,027
48282	Familia	Lachnospiraceae	-4,653	1,012	4,5E-05
77091	Genul	Clostridium	-7,493	1,192	7,9E-09

5 **Rezumat**

Blautix determină o creștere semnificativă a diversității microbiotei și conduce la variație temporală semnificativă în timpul tratamentului la un model la animal pentru scleroză multiplă.

10

15

Secvențe

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

```

1  tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  gcggaacgggt gagtaacgagc tgggtaacct gcctcatata gggggataac agttggaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacgggtat cgcatagatac agtgtgaaaa actccggatgg
181 tatgagatgg acccgcgctc gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaattattgca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggatgttaa acttctatca gcagggaaga aaatgacgggt
421 acctgactaa gaagcccccg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag
601 gtaagcgga ttcttagtgt agcgggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcggt tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaagc
781 tcttcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggt taattcgaag
901 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggtgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt
1021 ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccct atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaagg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatcca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg
1321 ggtctgttac acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc

```

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

```

1  caagtcgaac ggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaattta tctagtggcg
61  gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
181 aagatggacc cgcgttggt tagcttgttg gtgggtaac ggcccaccaa ggcgacgac
241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgag
361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacgttacc
421 tgactaagaa gcccgggcta actacgtgcc agcagccgag gtaatacgt gggggcaagc
481 gttatccgga ttactgggt gtaaaggag cgtagacggg tggcaagtc tgatgtgaaa
541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
601 agcggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
721 agataacctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctggg agtacgttcg caagaatgaa
841 actcaaagga attgacggg accgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
901 acgcgaagaa cttaccaag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggatctttcc
961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctggtgtcgt gagatgttgg
1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccttat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcat
1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cgggtgaatac gttcccggtt
1321 cttgtacaca ccgccgtca cccatgggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaagggt

```

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

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
 CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTCATAACAGGGGGATAACA
 GTTGAAACCGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
 GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
 ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
 CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG
 TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
 AAATGTTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGACAGCAAACGCAA
 TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTTATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGAAACCTT
 TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTCTGTACACACCGCCCGTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

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

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
 CGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
 GTGGACTGCATTGGAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAAGCGGAATTCCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTTCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTTCGGACTGTAGTCTGC
 AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCTCTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

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

1 gatgaacgct ggcgcgctgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
 61 tttcgggtga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt
 181 cgcatagaac ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggtg gaattattgca
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggatatgta
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgcaggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcggtataac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgaa ttcctagtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaagcgggcc tgctggacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtg cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca
 901 caagcgggtg agcatgtgtt ttaattcgaa gcaacgga gaaacctacc aaatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcgga cagaggagac aggtggtgca
 1021 tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcgggtg atacgttccc ggggtcttga cacaccgccc gtcacaccat
 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaag gagggagctg ccgaaggtgg
 1441 gactgataac tggggtga

5 REFERINȚE

- [1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Tap et al. (2009), *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84
- 10 [3] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- 15 [8] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- 20 [13] WO 2014/167338
- [14] Lee și Lee (2014) *World J Gastroenterol.* 20(27): 8886-8897.
- [15] Xie et al. (2016) *Journal Dairy Sci.* 99:6913-6921
- [16] WO 01/85187
- [17] WO2016/086161
- 25 [18] YQ et al. (2016), *J. Dig. Dis.*, „Therapeutic Modulation of the Gut Microbiota in IBD - More Questions to Be Answered“, Oct 15, 1751-2980, 12422, Epub ahead of print.
- [19] Lozupone (2012). *Nature.* 2012 Septembrie 13; 489 (7415): 220-230
- [20] Claesson, et al. (2012) *Nature*, 488, 178-184.
- [21] Hansen, et al., (2010), *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 26(6): 564-571.
- 30 [22] Turnbaugh et al. *Nature*, 457(7228): 480-484.
- [23] Wang et al. (2009) *ISME J.* 3(8): 944-954.
- [24] Faith et al. (2013), *Science*, 341(6141): 1237439
- [25] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.

- [26] Bernalier et al. (1996) Arch. Microbiol. 166 (3), 176-183.
 [28] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.
 [29] Srůtkova et al. (2011) J Microbiol. Methods, 87(1):10-6.
 [30] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) J Gen. Appl. Microbiol., 54, 9-24.
 5 [31] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. de Day și McLellan, Humana Press.
 [32] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.
 [33] Mitropoulou et al. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.
 [34] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
 [35] Handbook of Pharmaceutical Excipients, ediția a 2-a, (1994), Editată de A Wade și PJ Weller
 10 [36] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [37] US 2016/0067188
 [38] Handbook of Microbiological Media, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 [39] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
 15 [40] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
 [41] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
 [42] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., ed., 1998, Academic Press).
 20 [43] Methods In Enzymology (S. Colowick și N. Kaplan, ed., Academic Press, Inc.)
 [44] Handbook of Experimental Immunology, Volumele I-IV (D.M. Weir și C.C. Blackwell, ed, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 [45] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 25 [46] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [47] Ausubel et al. (ed) (2002) Short protocols in molecular biology, ediția a 5-a (Current Protocols).
 [48] PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a 2-a (Newton & Graham ed., 1997, Springer Verlag)
 30 [49] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supliment 30
 [50] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
 [51] Meyza și Blanchard (2017) Neurosci Biobehav Rev.;76(Pt A):99-110
 [52] Constantinescu et al. (2011) Br J Pharmacol. 164(4):1079-1106

LISTĂ DE SECVENȚE

[0180]

<110> 4D Pharma PLC

<120> COMPOZIȚII CUPRINZÂND TULPINI BACTERIENE

<130> P069516WO

<141> 2017-12-12

<150> GB1621123.7

<151> 2016-12-12

<160> 5

<170> SeqWin2010, versiunea 1.0

<210> 1

<211> 1372

<212> ADN

<213> Blautia stercoris

<400> 1

tgcaagtcga	gcgaagcgct	tacgacagaa	ccttcggggg	aagatgtaag	ggactgagcg	60
gcggaacggg	gagtaacgcg	tgggtaacct	gcctcatata	gggggataac	agttggaaac	120
ggctgctaag	accgcataag	cgacacggtat	cgcatgatac	agtgtgaaaa	actccggtgg	180
tatgagatgg	accgcgctct	gattagctag	ttggaggggt	aacggccccc	caaggcgacg	240
atcagtagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gcccagactc	300
ctacgggagg	cagcagtggg	gaatattgca	caatggggga	aacctgatg	cagcgacgcc	360
gcgtgaaggga	agaagtatct	cggtatgtaa	acttctatca	gcagggaaga	aaatgacggg	420
acctgactaa	gaagccccgg	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatat	gtagggggca	480
agcgttatcc	ggattttactg	ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggaagagcaa	gtctgatgtg	540
aaaggctggg	gcttaacccc	aggactgcat	tggaaactgt	ttttcttgag	tgccggagag	600
gtaagcgga	ttcctagtgt	agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	660
gaaggcggt	tactggacgg	taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg	agcaaacagg	720
attagatacc	ctggtagtcc	acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgttgg	ggagcaaagc	780
tcttcggtgc	cgcagcaaac	gcaataagta	ttccacctgg	ggagtacgtt	cgcaagaatg	840
aaactcaaa	gaattgacgg	ggacccgcac	aagcggtgga	gcatgtggtt	taattcgaag	900
caacgcgaag	aaccttacca	agtcttgaca	tcgatctgac	cggttcgtaa	tggaaccttt	960
ccttcgggg	agagaagaca	ggtggtgcat	ggttgcgtc	agctcgtgtc	gtgagatgtt	1020
gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaaccctt	atcctcagta	gccagcaggt	gaagctgggc	1080
actctgtgga	gactgccagg	gataacctgg	aggaaggcgg	ggacgacgtc	aatcatcat	1140
gccccttatg	atttgggcta	cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaaggg	aagcgagccc	1200
gcgaggggga	gcaaatccca	aaaataacgt	cccagttcgg	actgcagtct	gcaactcgac	1260
tgacgaagc	tggaatcgct	agtaatcgcg	aatcagaatg	tcgcggtgaa	tacgttcccg	1320
ggtcttgtac	acaccgccc	tcacaccatg	ggagtcagta	acgcccgaag	tc	1372

<210> 2

<211> 1438

<212> ADN

<213> Blautia wexlerae

<220>

<221> caracteristică_div.

<222> 19

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

<220>

<221> caracteristică_div.

<222> 19

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

<400> 2

caagtcgaac	gggaattant	ttattgaaac	ttcggctcat	ttaatttaat	tctagtggcg	60
gacgggtgag	taacgcgtgg	gtaacctgcc	ttatacaggg	ggataaacagt	cagaaatggc	120
tgctaataacc	gcataagcgc	acagagctgc	atggctcagt	gtgaaaaact	ccgggtggtat	180
aagatggacc	cgcgttggat	tagcttgttg	gtggggtaac	ggcccaccaa	ggcgacgatc	240
catagccggc	ctgagagggg	gaacggccac	attgggactg	agacacggcc	cagactccta	300
cgggagggcag	cagtggggaa	tattgcacaa	tgggggaaac	cctgatgcag	cgacgccggc	360
tgaaggaaaga	agtatctcgg	tatgtaaact	tctatcagca	gggaagatag	tgacggtacc	420
tgactaagaa	gccccggcta	actacgtgcc	agcagccggc	gtaatacgtg	gggggcaagc	480
gttatccgga	tttactgggt	gtaaaggagg	cgtagacggg	gtggcaagtc	tgatgtgaaa	540
ggcatgggct	caacctgtgg	actgcattgg	aaactgtcat	acttgagtgc	cggaggggta	600
agcgggaattc	ctagtgtagc	ggtgaaatgc	gtagatatta	ggaggaacac	cagtggcgaa	660
ggcgggcttac	tggacggtaa	ctgacgttga	ggctcgaaag	cgtggggagc	aaacaggatt	720
agataccctg	gtagtccacg	ccgtaaacga	tgaataacta	ggtgtcgggt	ggcaaagcca	780
ttcgggtgccg	tgcgaaacgc	agtaagtatt	ccacctgggg	agtacgttcg	caagaatgaa	840
actcaaaggga	attgacgggg	acccgcacaa	gcggtggagc	atgtgggtta	attcgaagca	900
acgcgaagaa	ccttaccagg	tcttgacatc	cgctgaccg	atccttaacc	ggatctttcc	960
ttcgggacag	gcgagacagg	tgggtgcatg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt	gagatgttgg	1020
gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccttat	cctcagtagc	cagcatttaa	ggtgggcaact	1080
ctggggagac	tgccagggat	aacctggagg	aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcatcatgcc	1140
ccttatgatt	tgggtacac	acgtgctaca	atggcgtaaa	caaagggaag	cgagattgtg	1200
agatggagca	aatcccaaaa	ataacgtccc	agttcggact	gtagtctgca	accgactac	1260
acgaagctgg	aatcgctagt	aatcgcggtg	cagaatgccg	cgggtgaatac	gttcccgggt	1320
cttgtagaca	ccgcccgtca	caccatggga	gtcagtaacg	cccgaagtca	gtgacctaac	1380
tgcaaagaag	gagctgccga	aggcgggacc	gatgactggg	gtgaagtcgt	aacaaggt	1438

<210> 3

<211> 1481

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> consens 16s pentru Blautia stercoris

<400> 3

tttkgtctgg	ctcaggatga	acgctggcgg	cgtgcttaac	acatgcaagt	cgagcgaagc	60
gcttacgaca	gaaccttcgg	gggaagatgt	aagggaactga	gcggcggacg	ggtgagtaac	120
gcgtgggtaa	cctgcctcat	acagggggat	aacagttgga	aacggctgct	aataccgcat	180
aagcgcacag	tatcgcatga	tacagtgtga	aaaactccgg	tggtatgaga	tggaccgcgg	240
tctgattagc	tagttggagg	ggtaacggcc	caccaaggcg	acgatcagta	gccggcctga	300
gaggggtgaa	ggccacattg	ggactgagac	acggcccaga	ctcctacggg	aggcagcagt	360
ggggaaatatt	gcacaatggg	ggaaaccctg	atgcagcgac	gccgcgtgaa	ggaagaagta	420
tctcggtatg	taaacttcta	tcagcaggga	agaaaatgac	ggtacctgac	taagaagccc	480
cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa	tacgtagggg	gcaagcgtaa	tccggattta	540
ctgggtgtta	agggagcgta	gacggaagag	caagtctgat	gtgaaaggct	ggggcttaac	600
cccaggactg	cattggaaac	tgtttttctt	gagtgccgga	gaggtaaagc	gaattcctag	660
tgtagcggtg	aatgcgtag	atattaggag	gaacaccagt	ggcgaaggcg	gcttactgga	720
cggtaactga	cgttgaggct	cgaaagcgtg	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	atggttgcg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	tcccgcacag	1080
agcgcacccc	ctatcgtcag	tagccagcag	gtaaagctgg	gcactctgag	gagactgcc	1140
gggataacct	ggaggaaggc	ggggacgacg	tcaaatcatc	atgcccctta	tgatttgggc	1200
tacacacgtg	ctacaatggc	gtaaacaaag	ggaagcgagc	ccgcgagggg	gagcaaatcc	1260
caaaaataac	gtcccagttc	ggactgcagt	ctgcaactcg	actgcacgaa	gctggaatcg	1320
ctagtaatcg	cgaatcagaa	tgctcgcggtg	aatacgttcc	cgggtcttgt	acacaccgcc	1380
cgtcacacca	tgggagtcag	taacgcccga	agtcagtgac	ccaaccttag	ggagggagct	1440
gccgaaggcg	ggattgataa	ctggggtgaa	gtctaggggg	t		1481

<210> 4

<211> 1384

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> consens 16s pentru *Blautia wexlerae*

<220>

<221> caracteristică_div.

<222> 749

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

<220>

<221> caracteristică_div.

<222> 749

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

<400> 4

ttcattgaga	cttcggtgga	tttagattct	atttctagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	60
tgggtaacct	gccttataca	gggggataac	agtcagaaat	ggctgctaata	accgcataag	120
cgcacagagc	tgcatggctc	agtgtgaaaa	actccggtgg	tataagatgg	acccgcgttg	180
gattagcttg	ttggtgggt	aacggccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	240
ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtggg	300
gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	360
cggtatgtaa	acttctatca	gcagggaaga	tagtgacggg	acctgactaa	gaagccccgg	420
ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatat	gtagggggca	agcgttatcc	ggatttactg	480
ggtgtaaaag	gagcgtagac	ggtgtggcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	540
tggactgcat	tggaaactgt	catacttgag	tgccggaggg	gtaagcgga	ttcctagtgt	600
agcgggtgaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaaggcggct	tactggacgg	660
taactgacgt	tgaggtctga	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	720
acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgtcng	gggagcatgg	ctcttcggtg	ccgtcgcaaa	780
cgcagtaagt	attccacctg	gggagtagct	tcgcaagaat	gaaactcaaa	ggaattgacg	840
gggacccgca	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	900
aagtcttgac	atccgcctga	ccgatcctta	accggatcct	tccttcggga	caggcgagac	960
aggtggtgca	tggttgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgcaacga	1020
gcgcaacccc	tatcctcagt	agccagcatt	taagggtggc	actctgggga	gactgccagg	1080
gataacctgg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aatcatcat	gccccttatg	atttgggcta	1140
cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaaggg	aagcgagatc	gtgagatgga	gcaaatccca	1200
aaaataacgt	cccagtccgg	actgtagtct	gcaacccgac	tacacgaagc	tggaaatcgct	1260
agtaatcgcg	gatcagaatg	ccgcggtgaa	tacgttcccc	ggtcttgtac	acaccgcccc	1320
tcacaccatg	ggagtcagta	acgcccgaag	tcagtgaacct	aactgcaaa	aaggagctgc	1380
cgaa						1384

<210> 5

<211> 1458

<212> ADN

<213> *Blautia hydrogenotrophica*

<220>

<221> caracteristică_div.

<222> 1416

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

<220>

<221> caracteristică_div.

<222> 1416

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

<400> 5

gatgaacgct	ggcggcgtgc	ttaacacatg	caagtcgaac	gaagcgatag	agaacggaga	60
tttcggttga	agttttctat	tgactgagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	tgggtaacct	120
gccctataca	gggggataac	agttagaaat	gactgctaata	accgcataag	cgcacagctt	180
cgcataagc	ggtgtgaaaa	actgaggtgg	tataggtatg	acccgcgttg	gattagctag	240
ttggtgaggt	aacggccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	300
cacattggga	ctgagacacg	gcccacactc	ctacgggagg	cagcagtggg	gaatattgca	360

```

caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtagttaa 420
acttctatca gcagggaaga aagtacggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt 480
gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg 540
gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat 600
tggaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa 660
tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaagcgggcc tgctggacgg taactgacgt 720
tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa 780
cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaacg cattcggtgc cgcagcaaac gcaataagta 840
ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca 900
caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac 960
atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca 1020
tggttctcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1080
tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg 1140
gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc 1200
tacaatggcg taaacaaagg gaagcggaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg 1260
tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320
gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctttgta cacaccgcc gtcacaccat 1380
gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaagggtg 1440
gactgataac tgggtgta 1458

```

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2016/086161
- 4d Pharma Plc: "Clinical Update - RNS - London Stock Exchange", , 19 July 2016 (2016-07-19), XP055446737, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.londonstockexchange.com/exchange/news/market-news/market-news-detail/DDDD/12896979.html> [retrieved on 2018-02-01]
- WO-A1-2016/203218
- Anonymous: "4D pharma's Blautix for Irritable Bowel Syndrome shows positive impact - pharmaceutical daily news", , 13 December 2016 (2016-12-13), XP055446748, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.pharmaceuticaldaily.com/4d-pharmas-blautix-for-irritable-bowel-syndrome-shows-positive-impact/> [retrieved on 2018-02-01]
- HARPER ASHTON ET AL: "The Role of Bacteria, Probiotics and Diet in Irritable Bowel Syndrome.", 26 January 2018 (2018-01-26), FOODS (BASEL, SWITZERLAND) 26 JAN 2018, VOL. 7, NR. 2 ISSN: 2304-8158
- WO-A1-2017/148596
- WO-A1-2018/011594
- Catherine A. Lozupone ET AL: "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota", Nature, vol. 489, no. 7415, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 220-230, XP055499616, GB ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature11550
- WO-A2-2012/024638
- US-A1- 2010 316 617

(57) Revendicări:

1. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Blautia hydrogenotrophica*, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea sindromului de colon iritabil, în care tratamentul sau prevenirea cuprinde creșterea diversității microbiotei la subiect.

2. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în care subiectul are mai puțin de 99 de specii bacteriene diferite și/sau mai puțin de 190 de tulpini bacteriene diferite în microbiota sa.

3. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care creșterea în diversitate a microbiotei este pentru bacteriile ne-acetogene sau este atât pentru bacteriile acetogene cât și ne-acetogene.

4. Compoziția pentru utilizarea din oricare dintre revendicările precedente, în care:

- (a) subiectul este un subiect varstnic fragil sau
- (b) subiectul este un nou născut care a fost născut prin secțiune de cezariană.

5. Compoziția pentru utilizarea din oricare dintre revendicările precedente, în care diversitatea microbiotei este crescută în intestin și/sau în intestinul distal al subiectului.
6. Compoziția pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care tulpina bacteriană este bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depozitată sub numărul de acces DSM 10507 și de asemenea sub numărul de acces DSM 14294.
7. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care:
- (a) compoziția este pentru administrare orală; și/sau
 - (b) compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic; și/sau
 - (c) tulpina bacteriană este liofilizată; și/sau
 - (d) tulpina bacteriană este viabilă; și/sau
 - (e) tulpina bacteriană este capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul.
8. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, care cuprinde o singură tulpină de *Blautia hydrogenotrophica*.
9. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care compoziția cuprinde *Blautia hydrogenotrophica* și nu cuprinde bacterii din orice alt gen sau cuprinde astfel de alte bacterii numai în cantități minime.
10. Compoziția pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă, în care compoziția cuprinde *Blautia hydrogenotrophica* și nu cuprinde bacterii din orice alte specii sau cuprinde astfel de alte bacterii numai în cantități minime.
11. Compoziția pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1-7, care cuprinde *Blautia hydrogenotrophica* ca parte a unui consorțiu microbian.
12. Un produs alimentar cuprinzând compoziția din oricare revendicare precedentă, pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă.
13. O compoziție de vaccin cuprinzând compoziția conform oricăreia dintre revendicările 1-11, pentru utilizarea din oricare dintre revendicările 1-11.

Comparație a microbiotei la pacienții sănătoși și cu IBS

FIG. 1

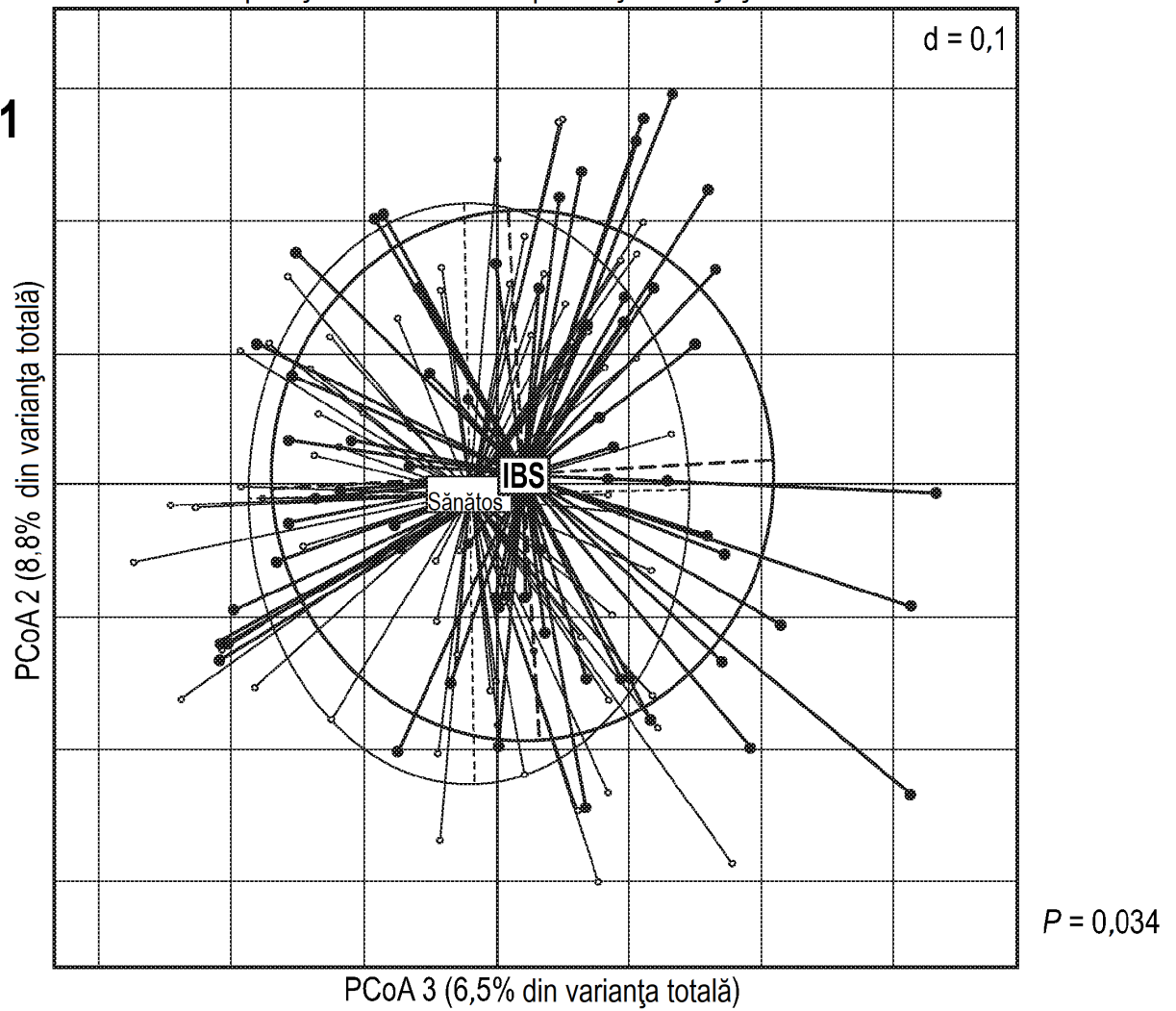


FIG. 2

Diversitatea Shannon
Ziua 16 Versus Ziua 1

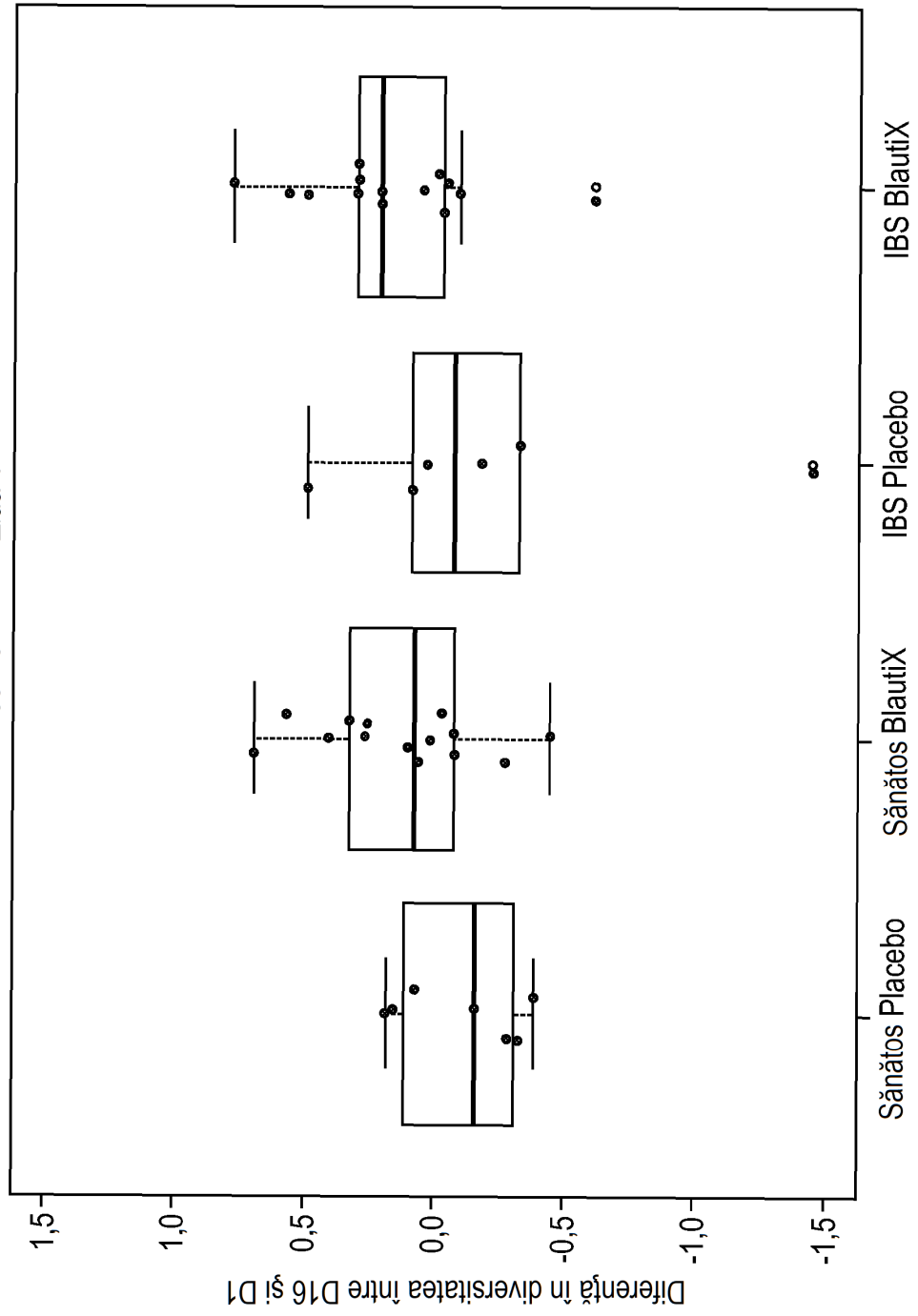
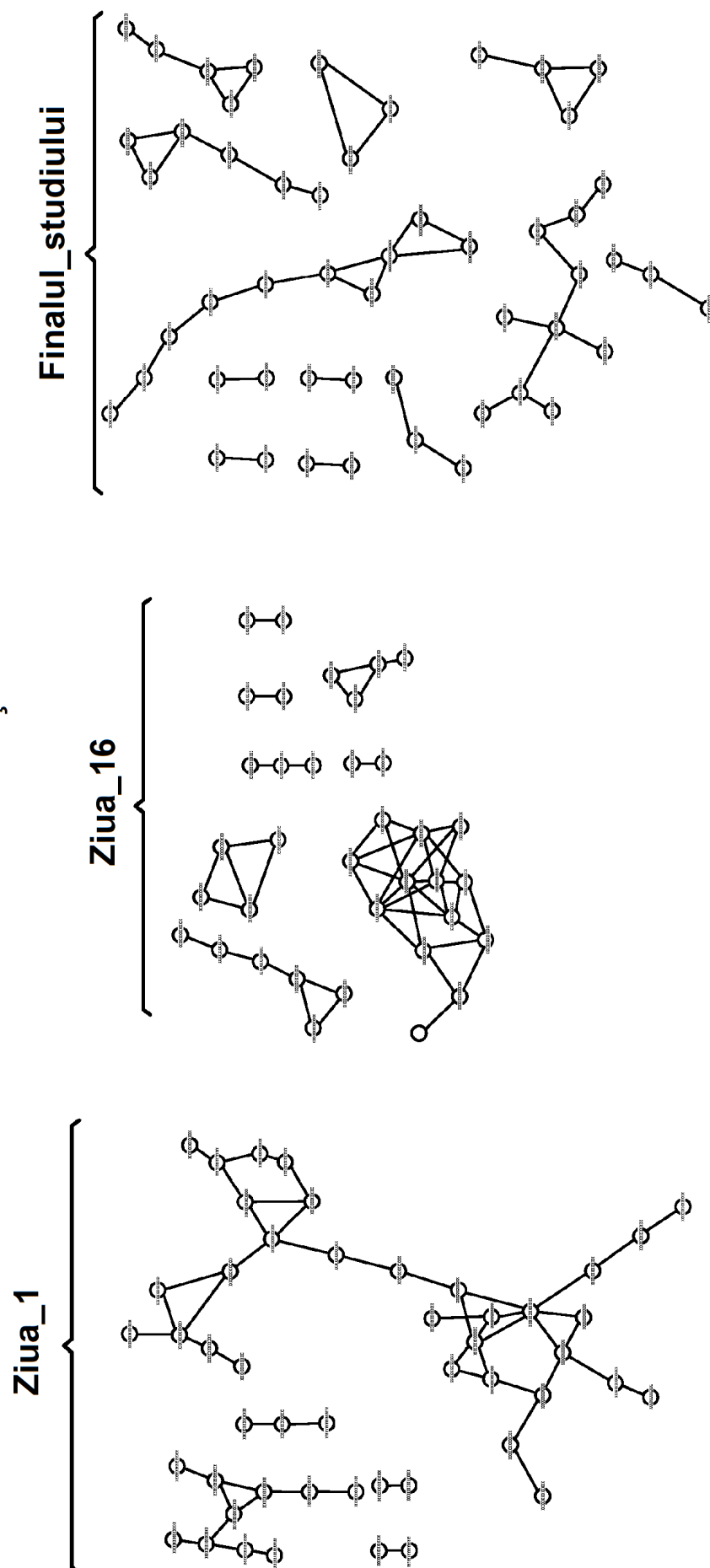
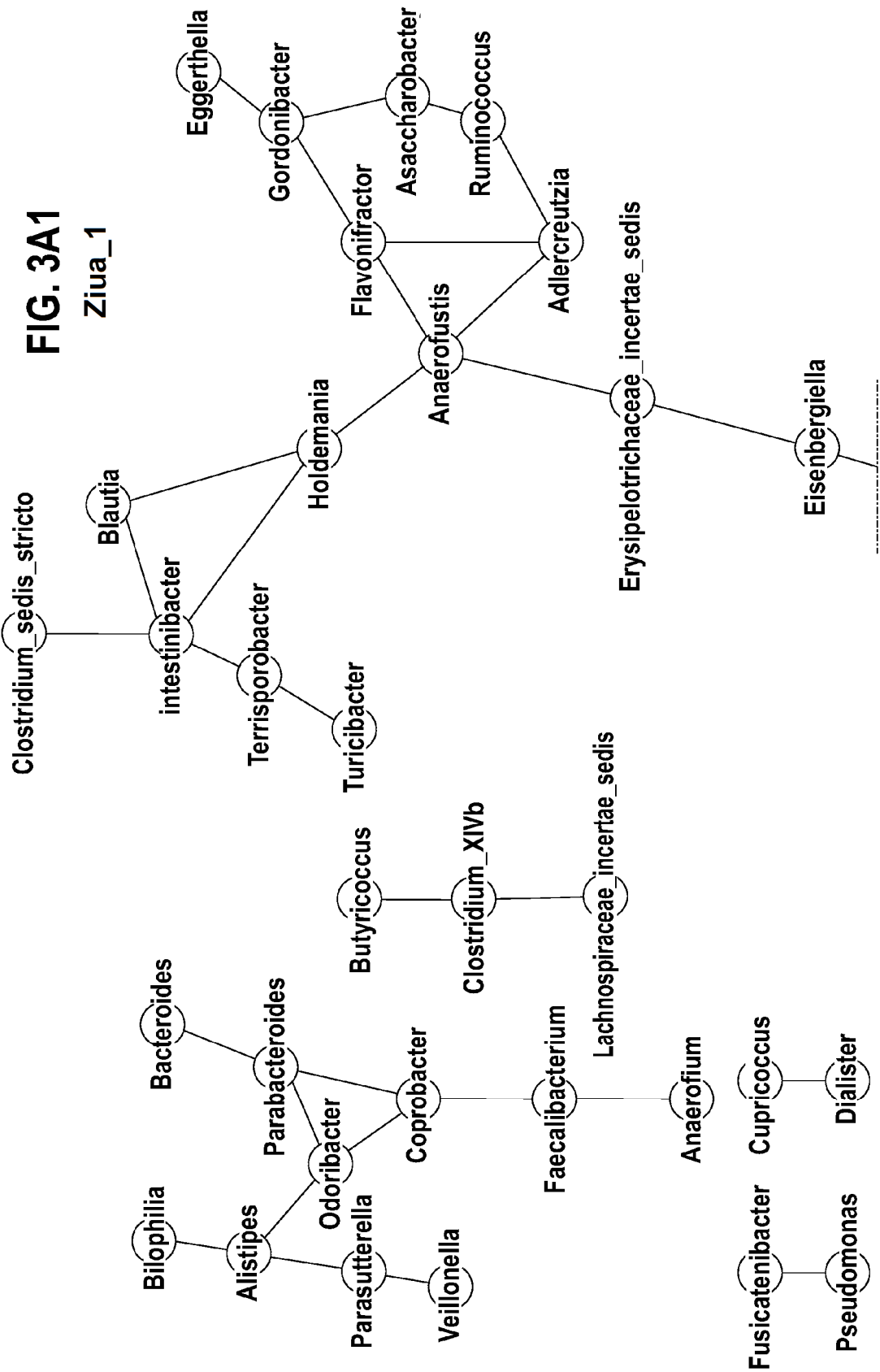


FIG. 3A
Indivizi sănătoși





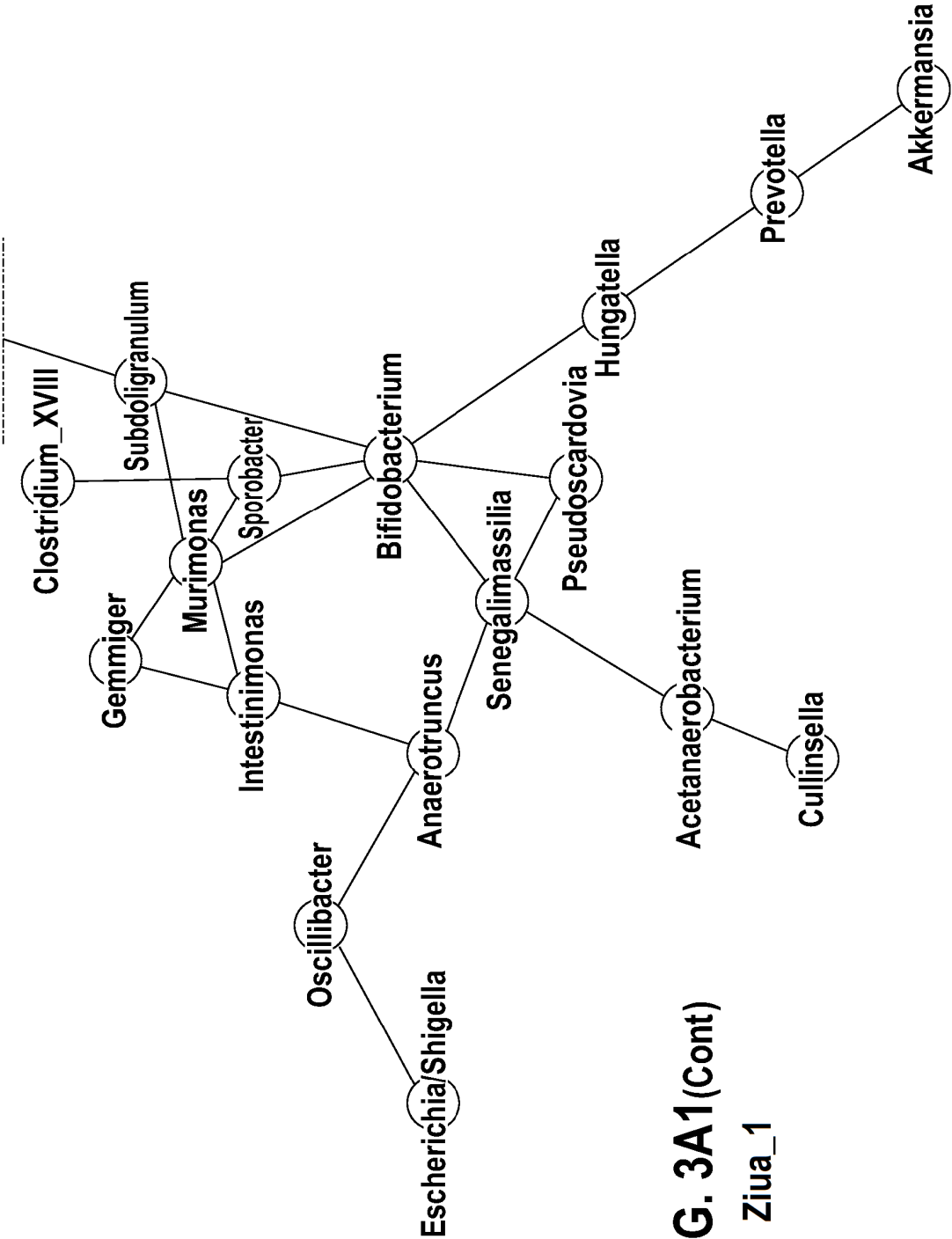


FIG. 3A1(Cont)
Ziua_1

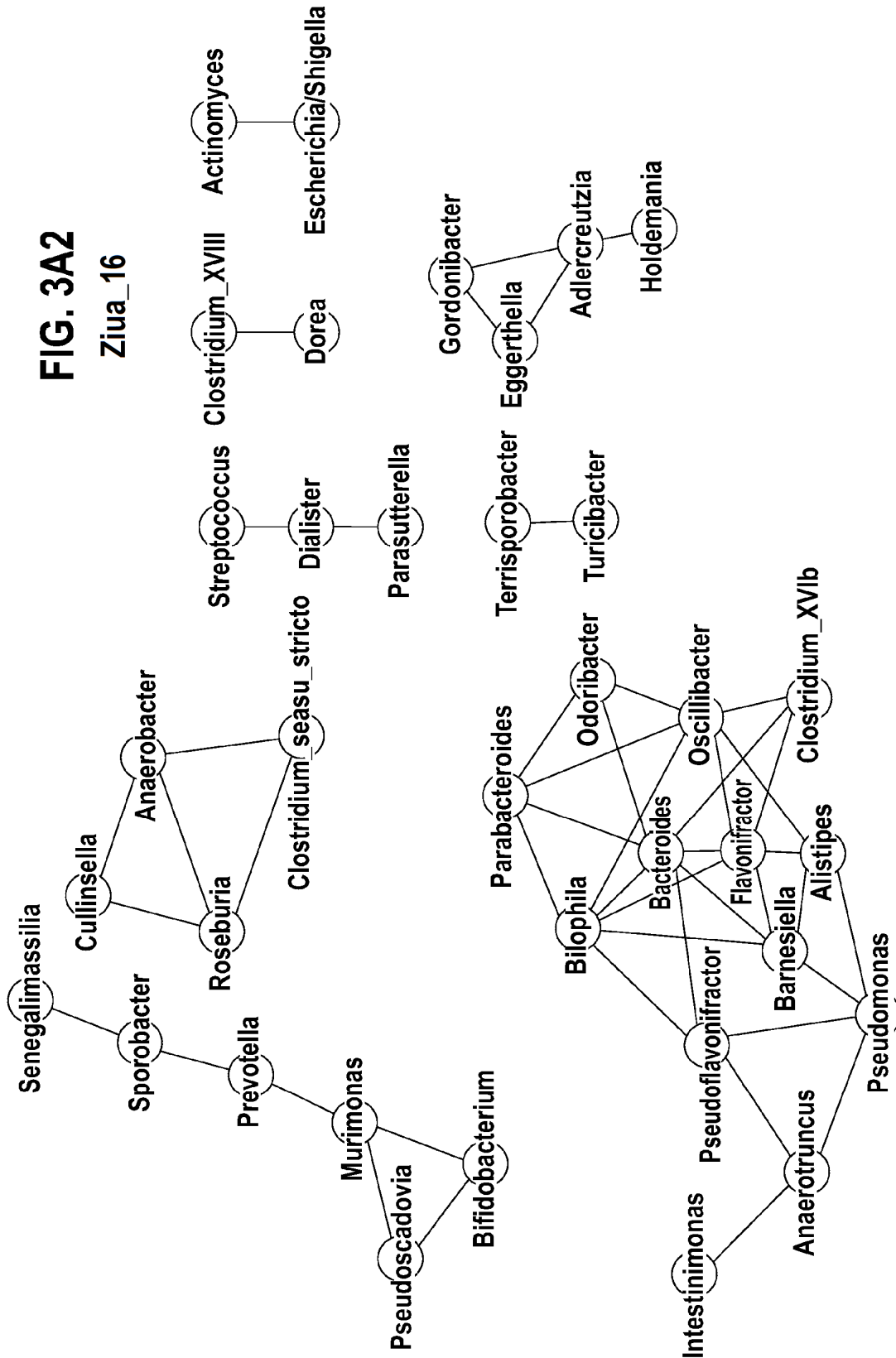
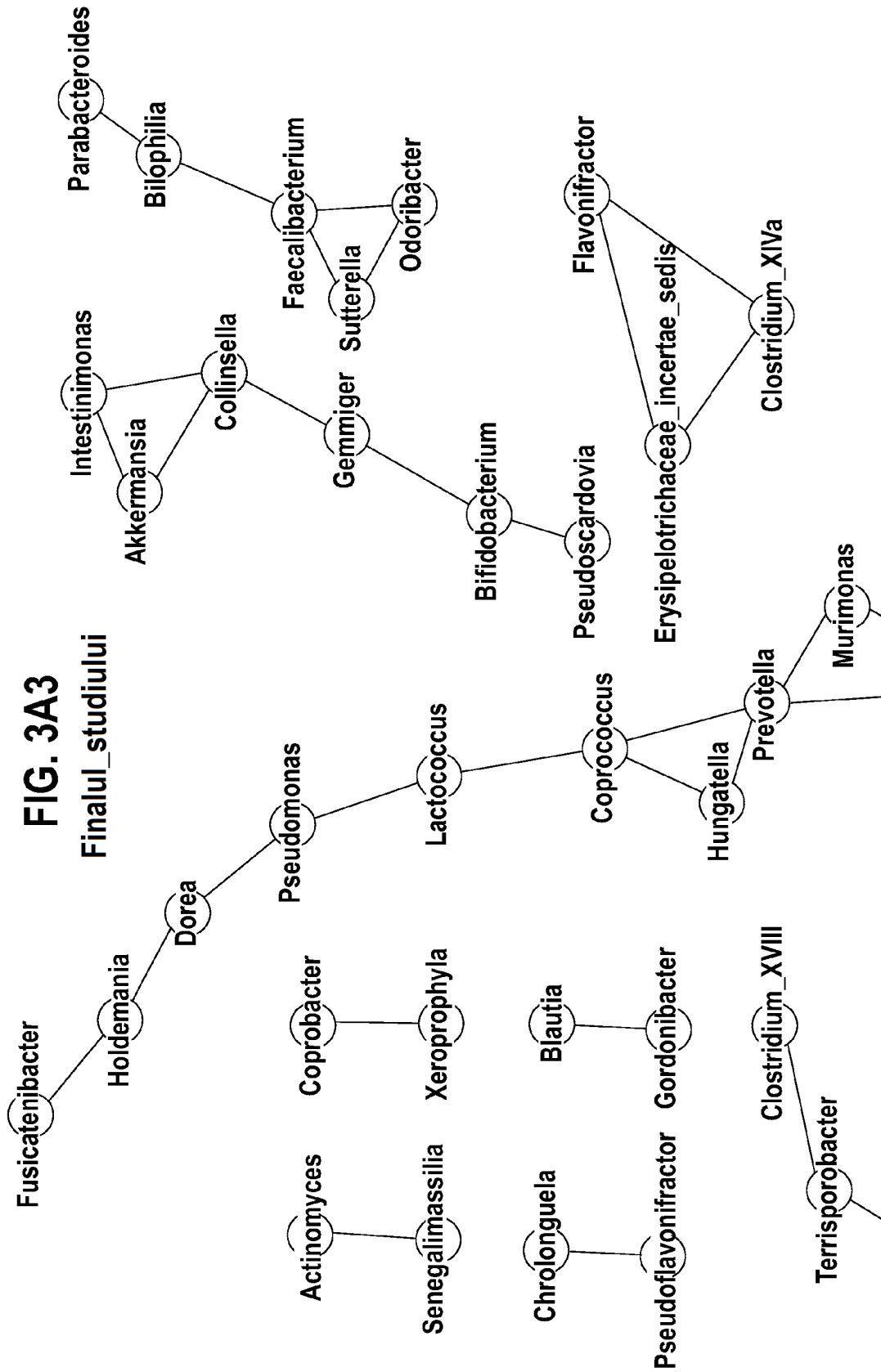


FIG. 3A3
Finalul_studiului



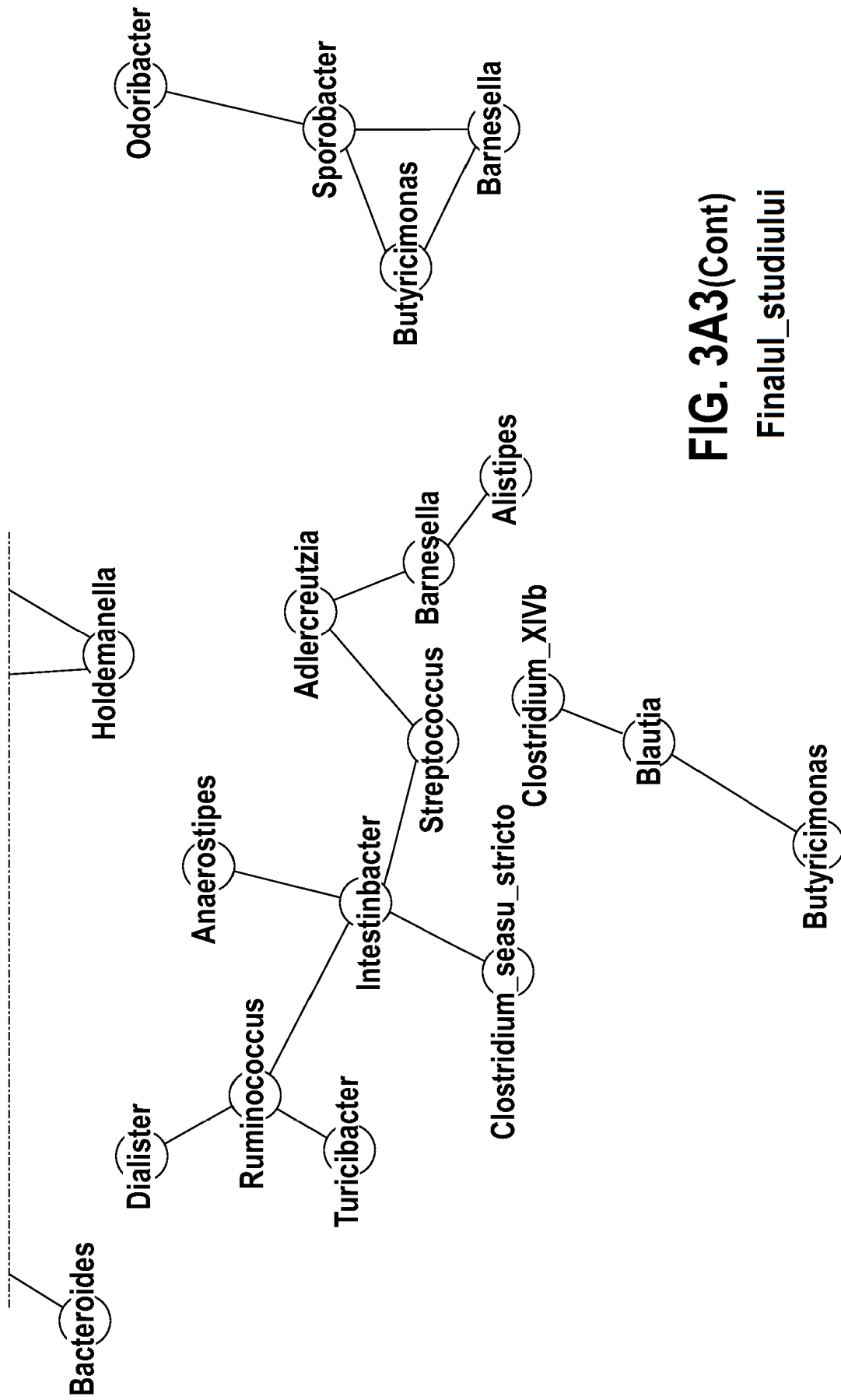
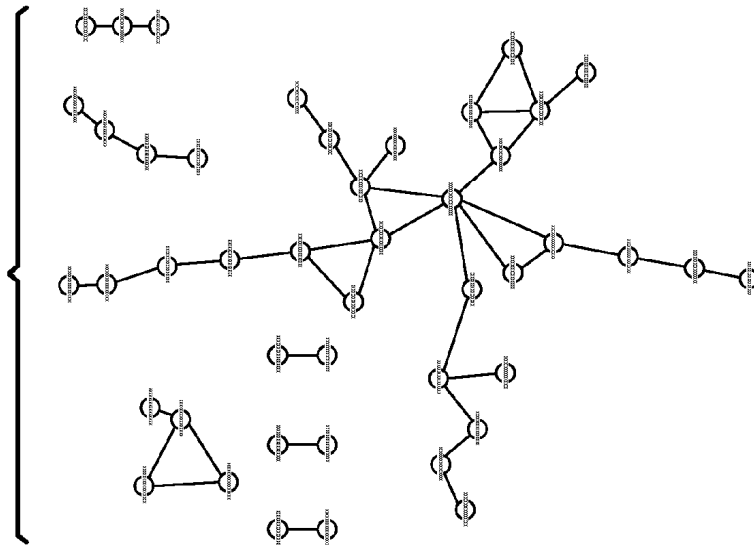
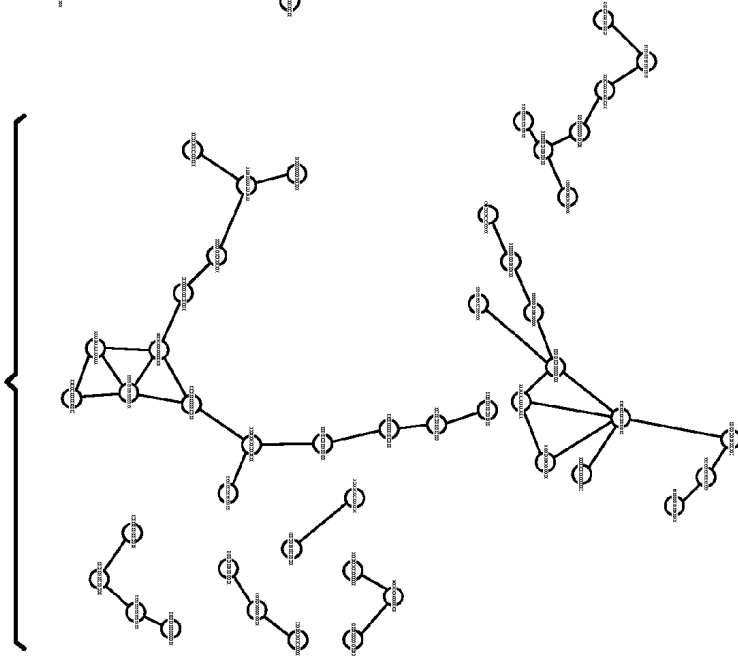


FIG. 3B
Pacienți cu IBS

Ziua_1



Ziua_16



Finalul studiului

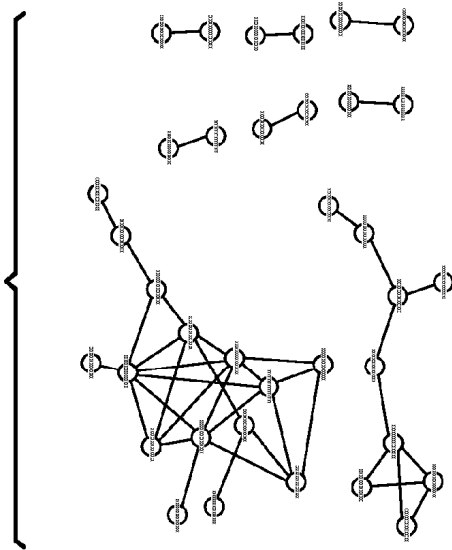
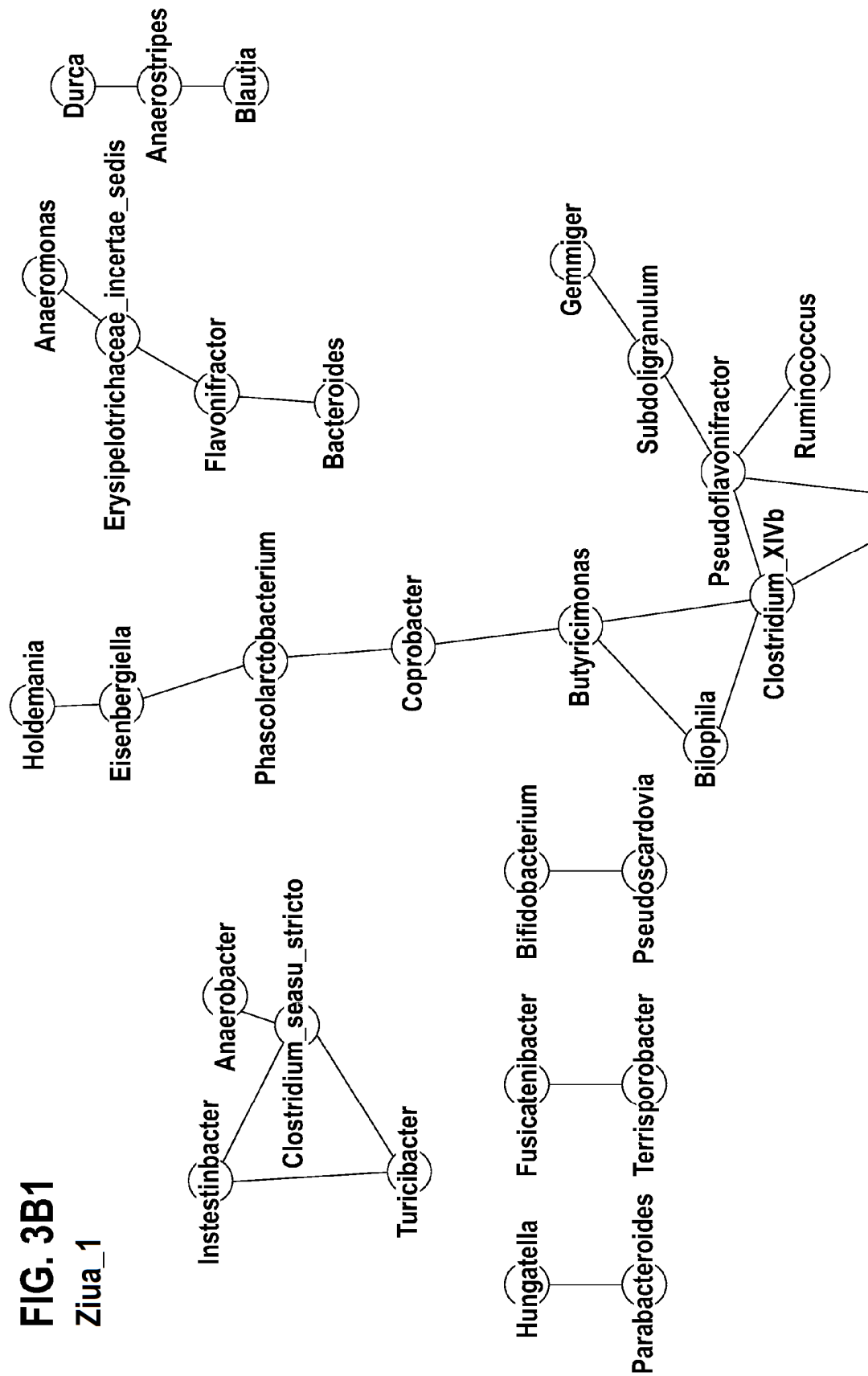


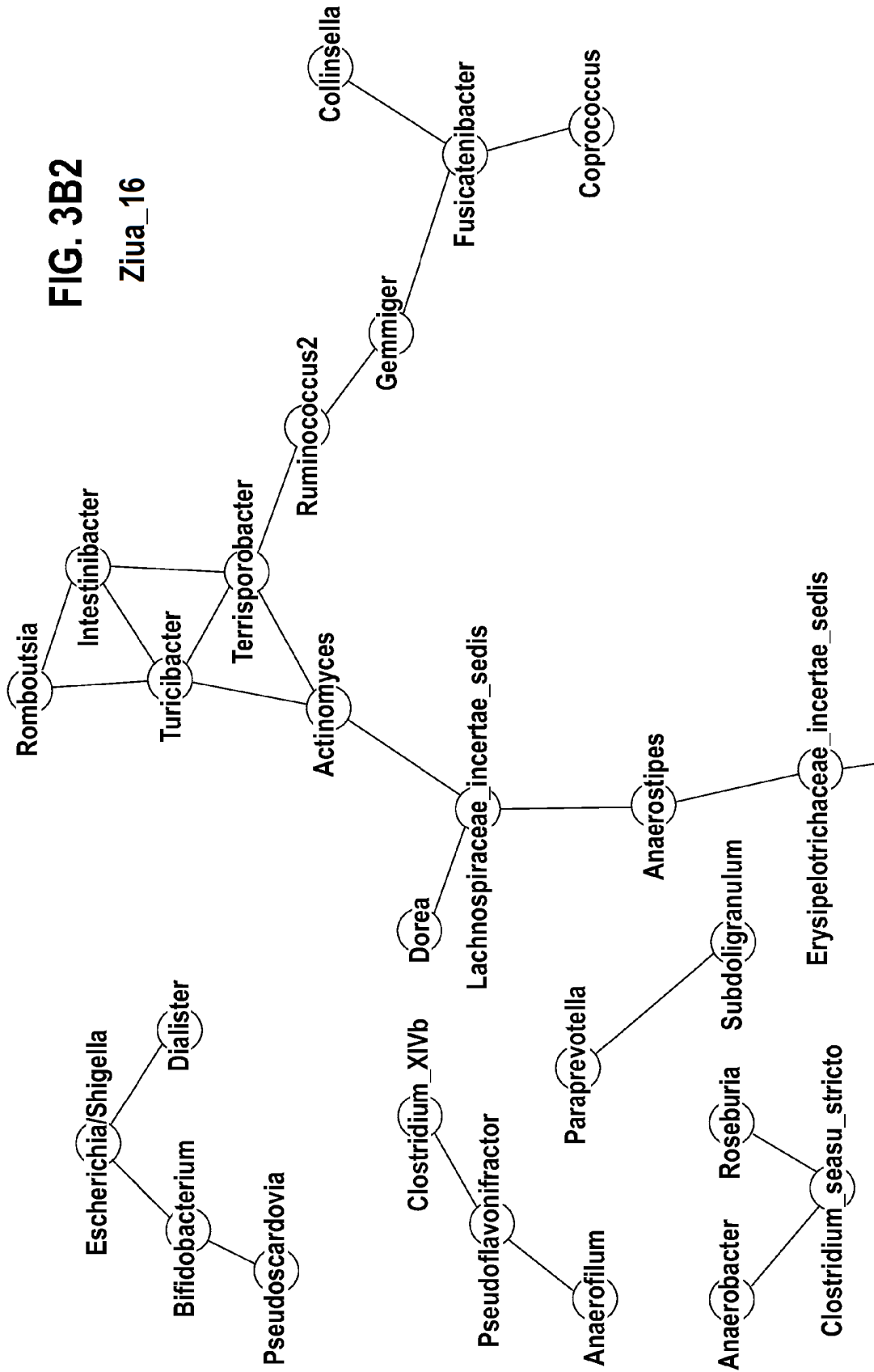
FIG. 3B1

Ziua_1



**FIG. 3B1(Cont)**

Ziua_1



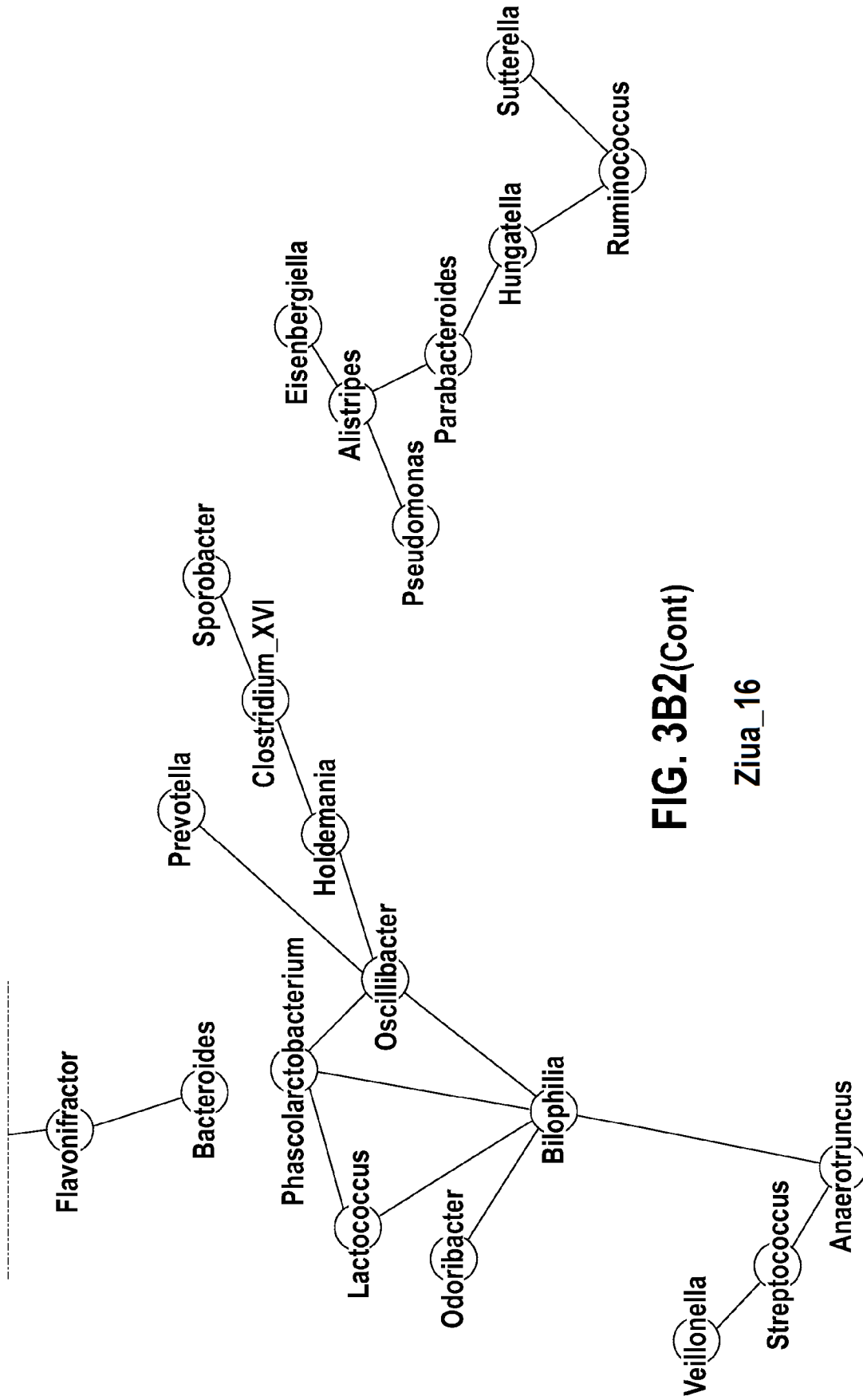


FIG. 3B2(Cont)

Ziua_16

FIG. 3B3

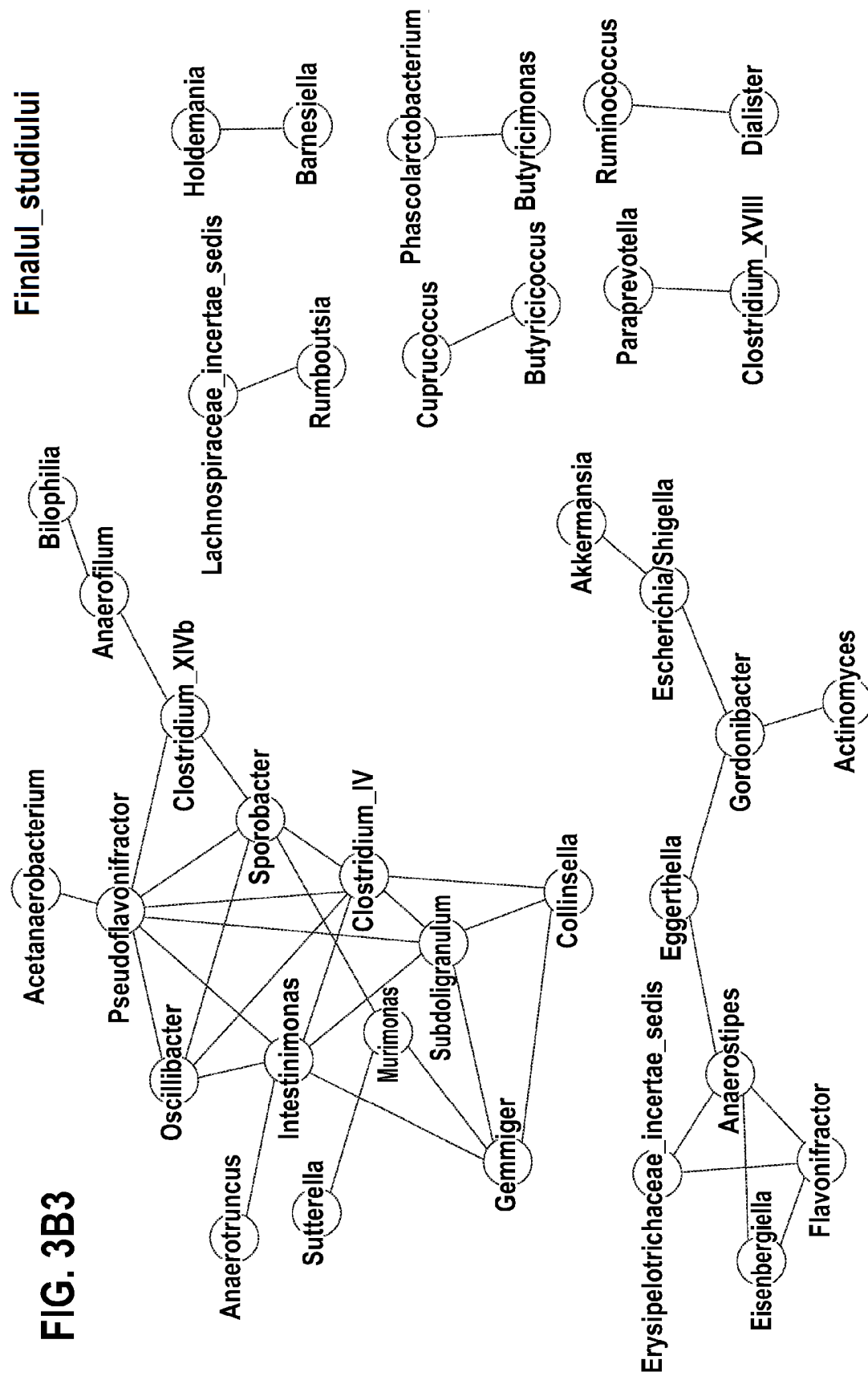


FIG. 4A
Disimilaritate Bray-Curtis între
Ziua 16 Versus Ziua 1

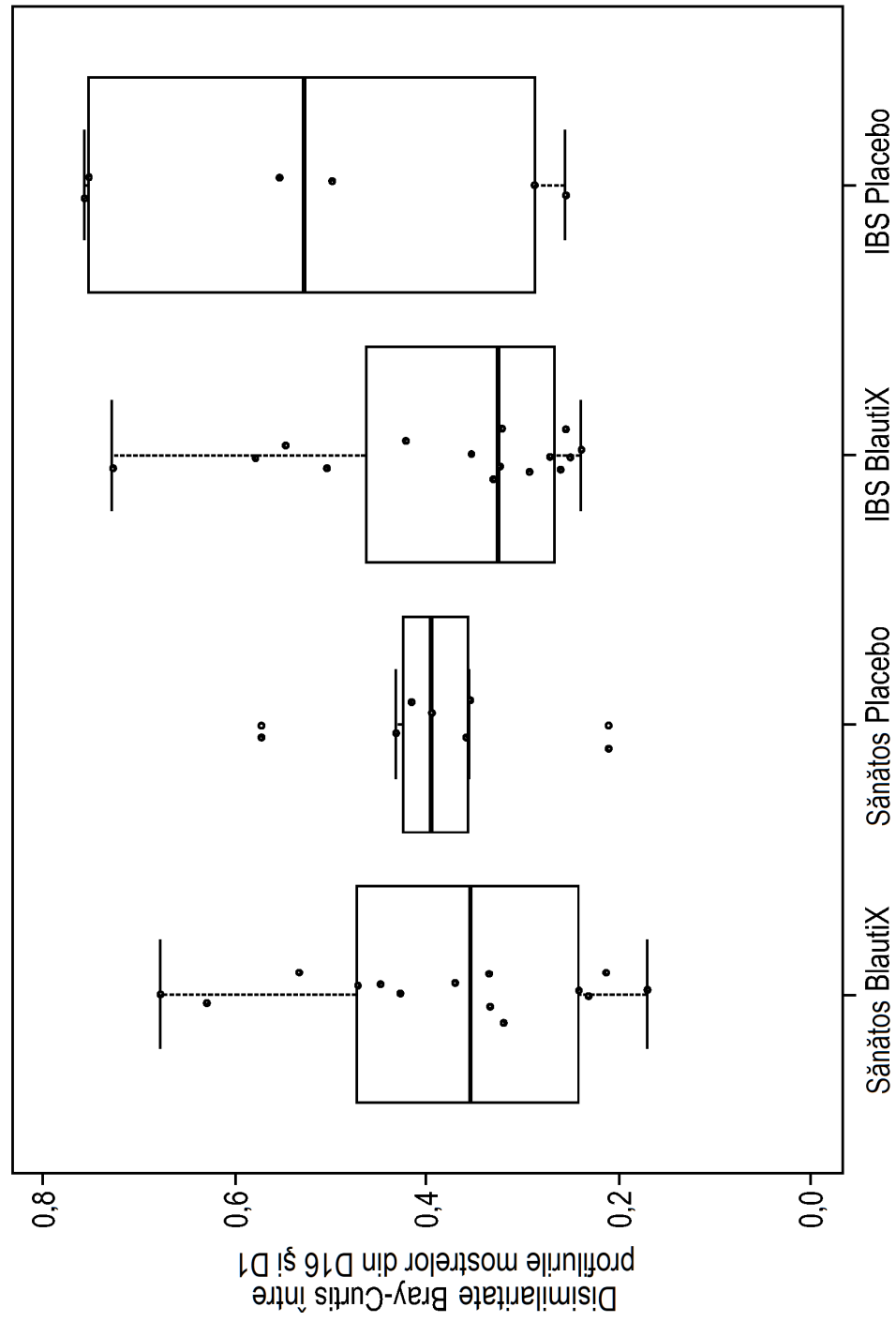


FIG. 4B

Disimilaritate Bray-Curtis
Finalul studiului Versus Ziua 1

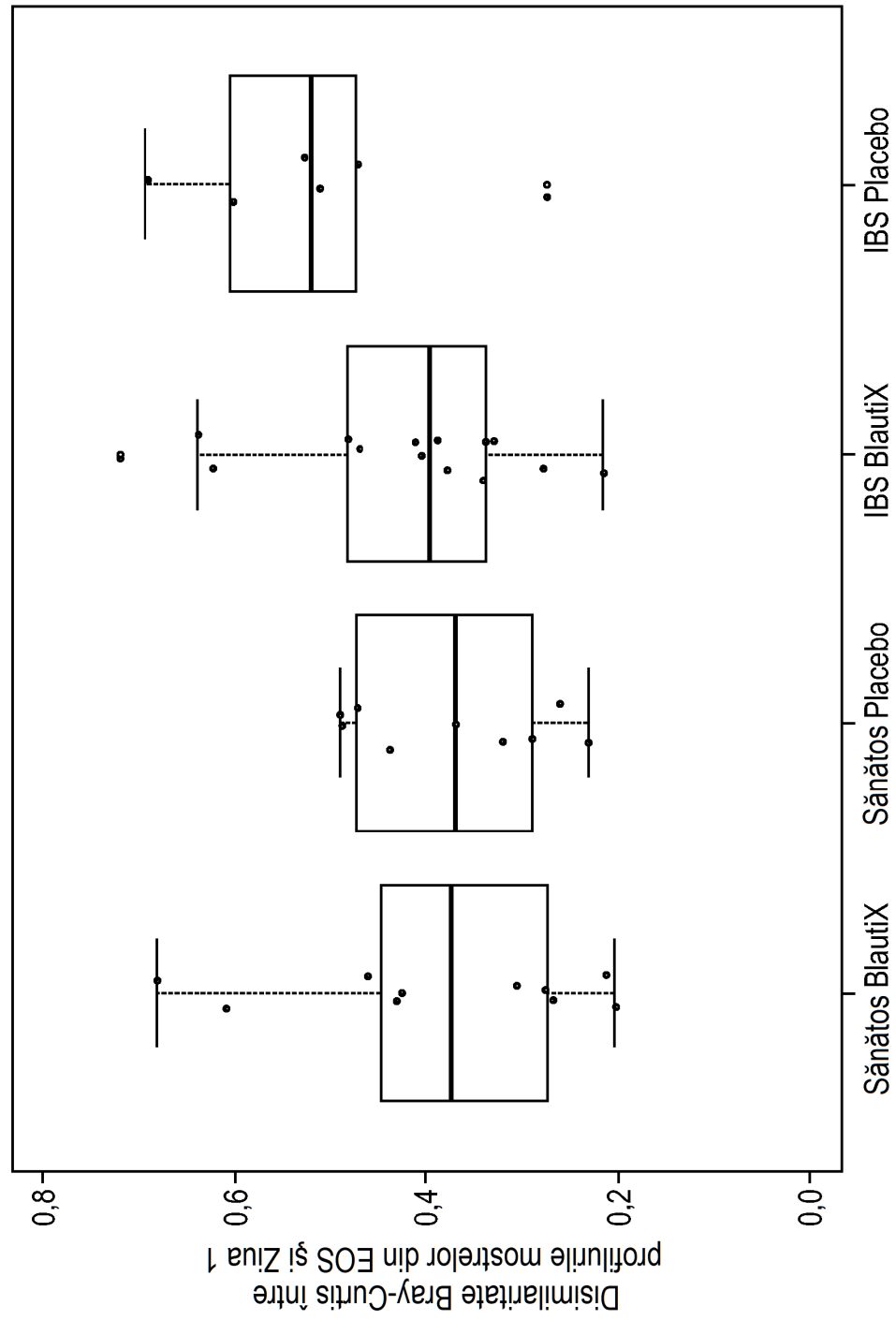
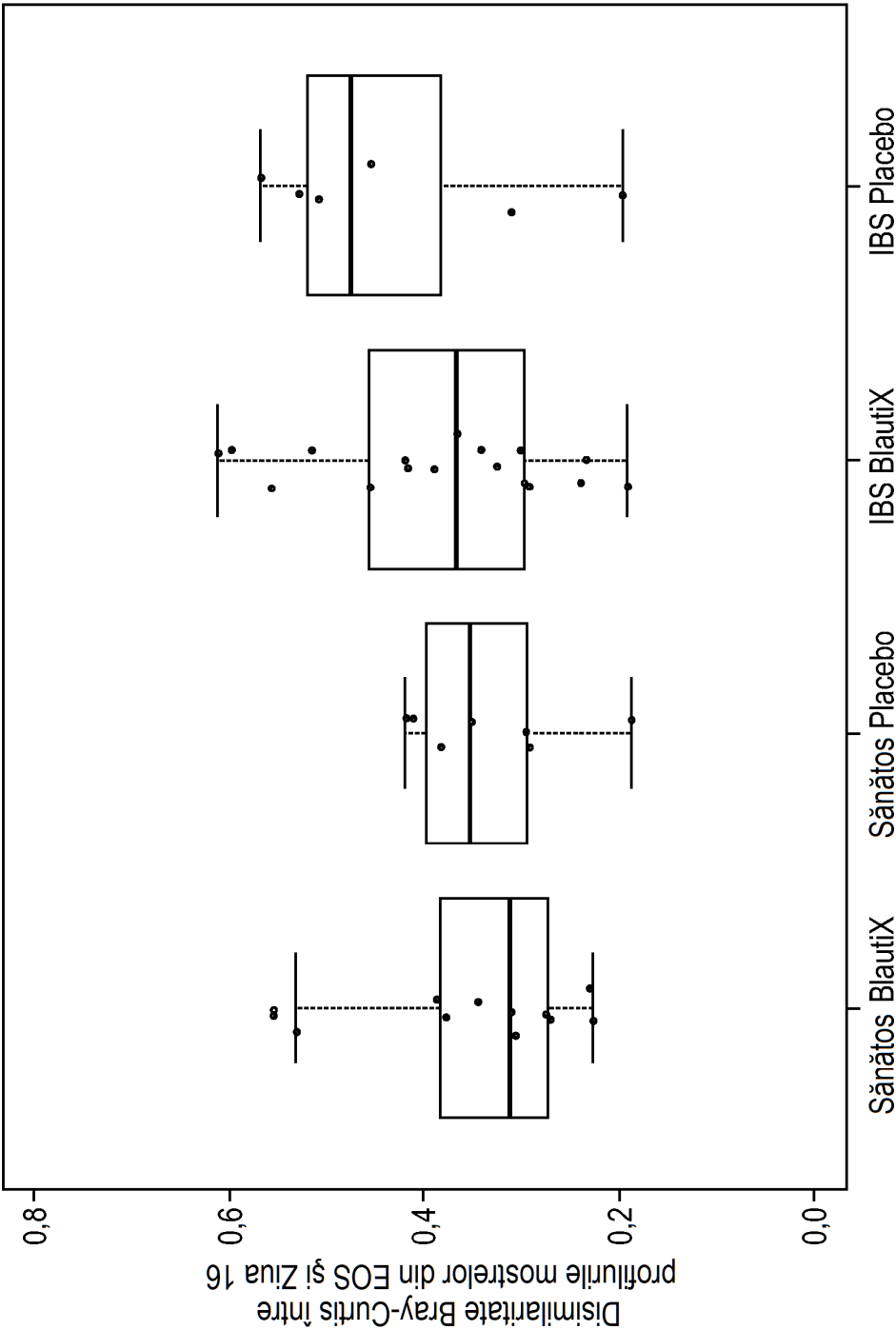


FIG. 4C
Disimilaritate Bray-Curtis
Ziua 16 Versus Finalul studiului



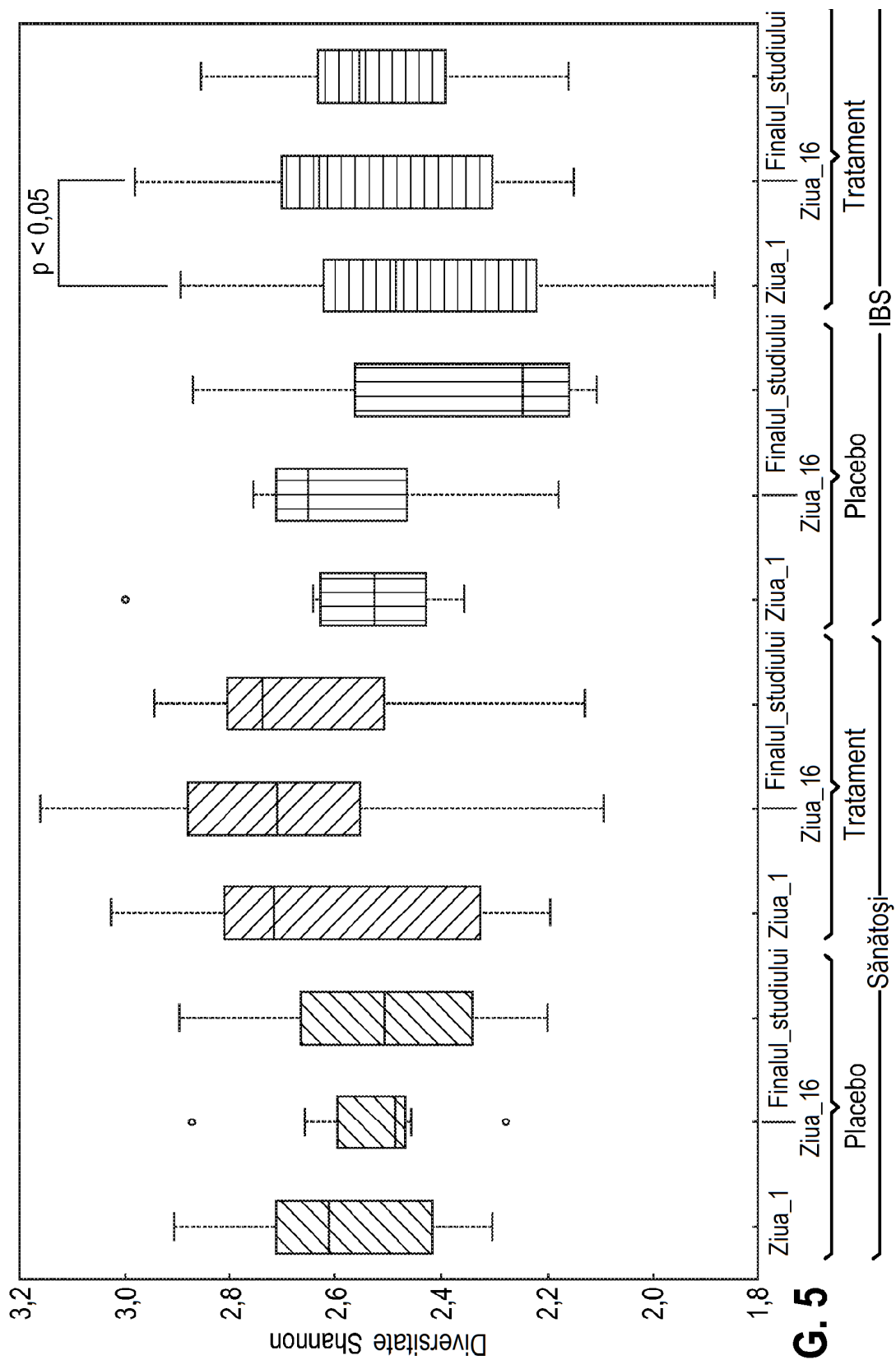


FIG. 5

FIG. 6A
Indivizi sănătoși

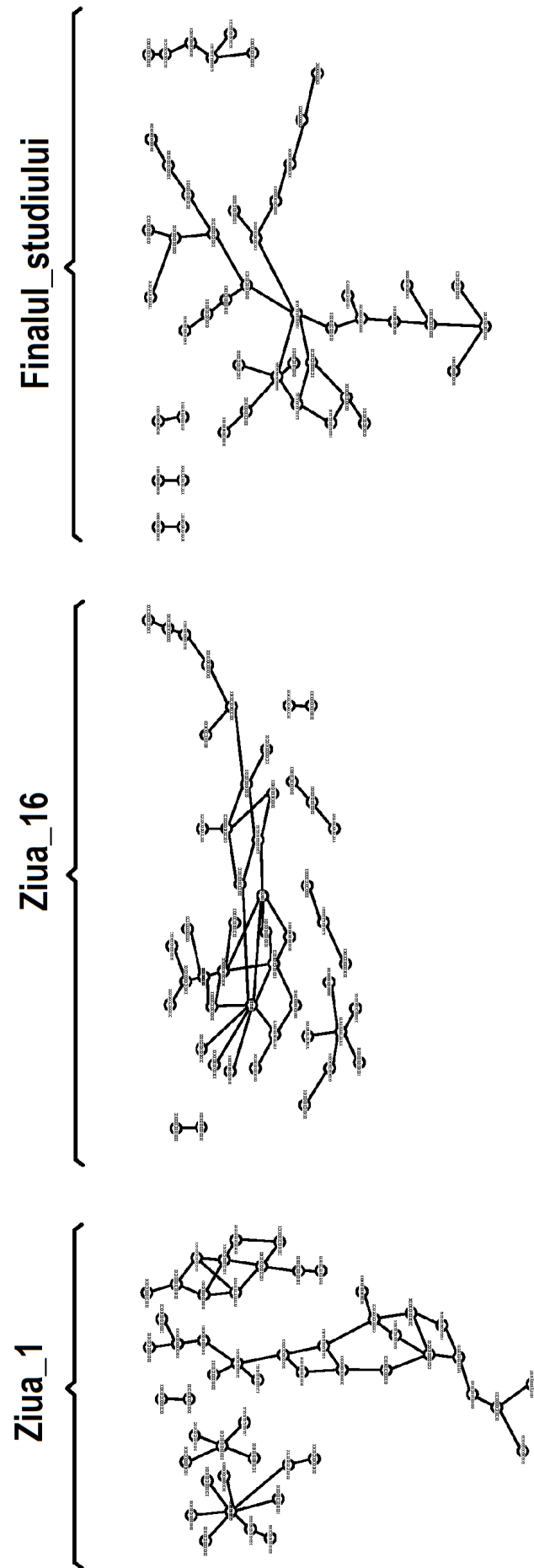
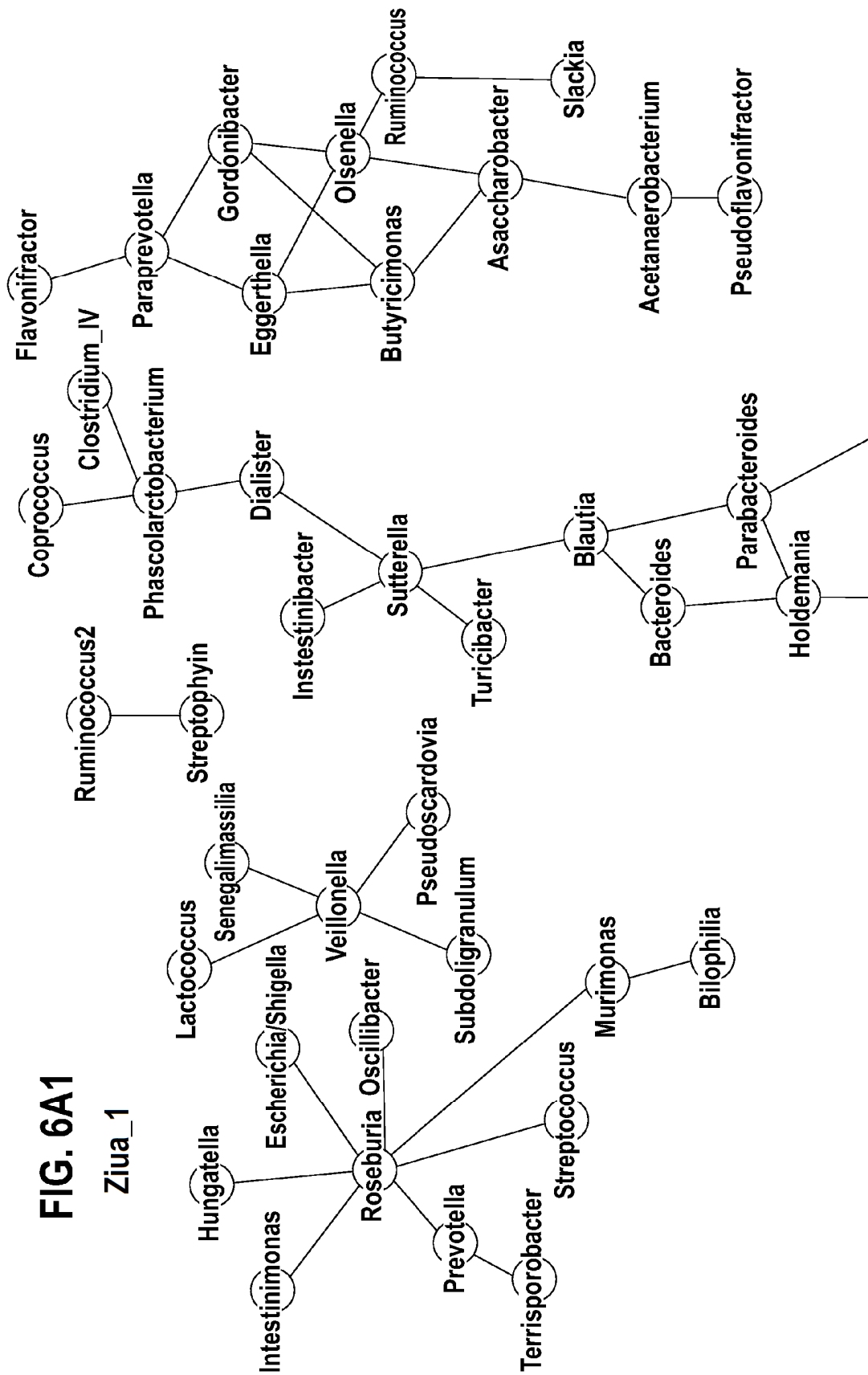
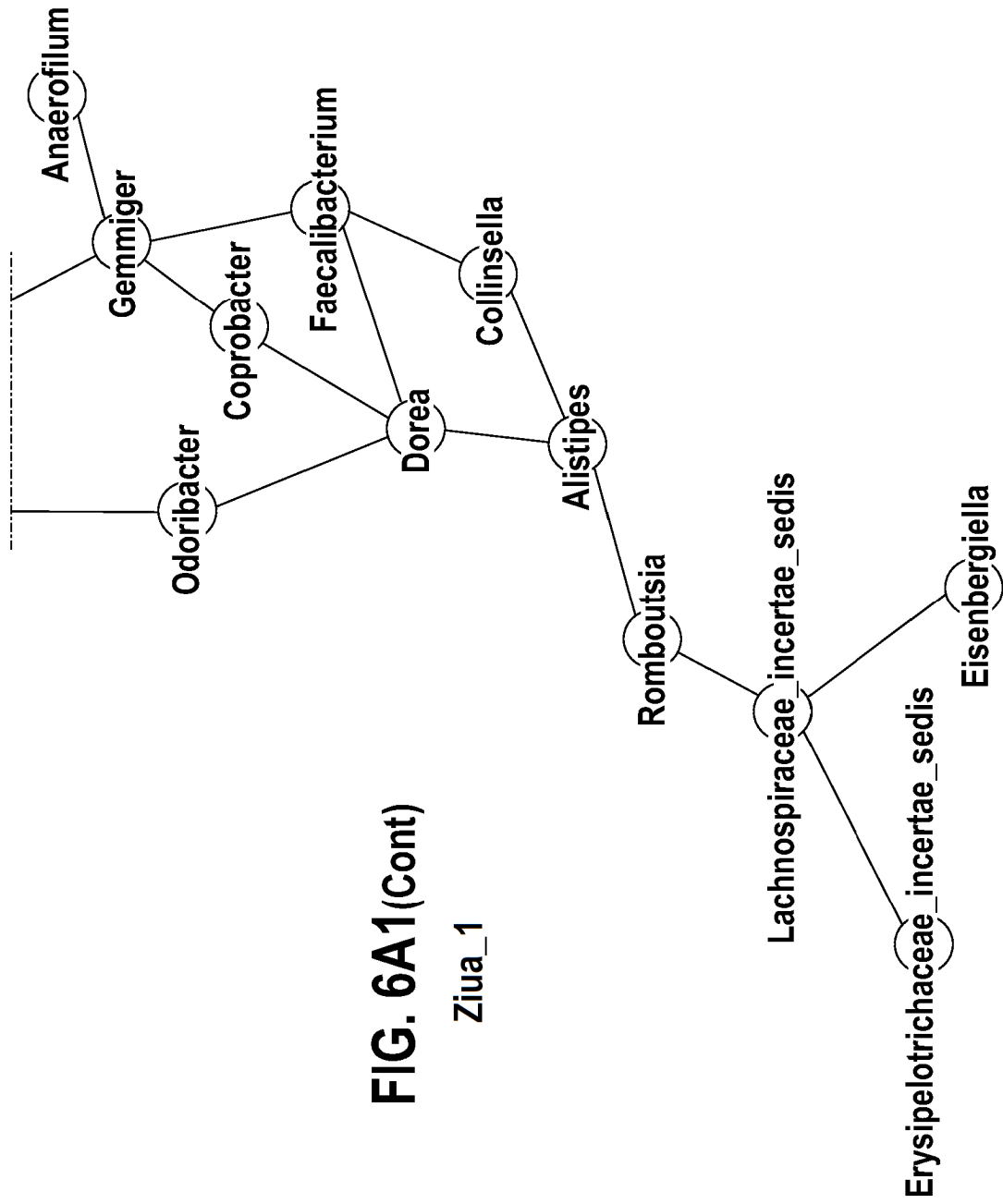
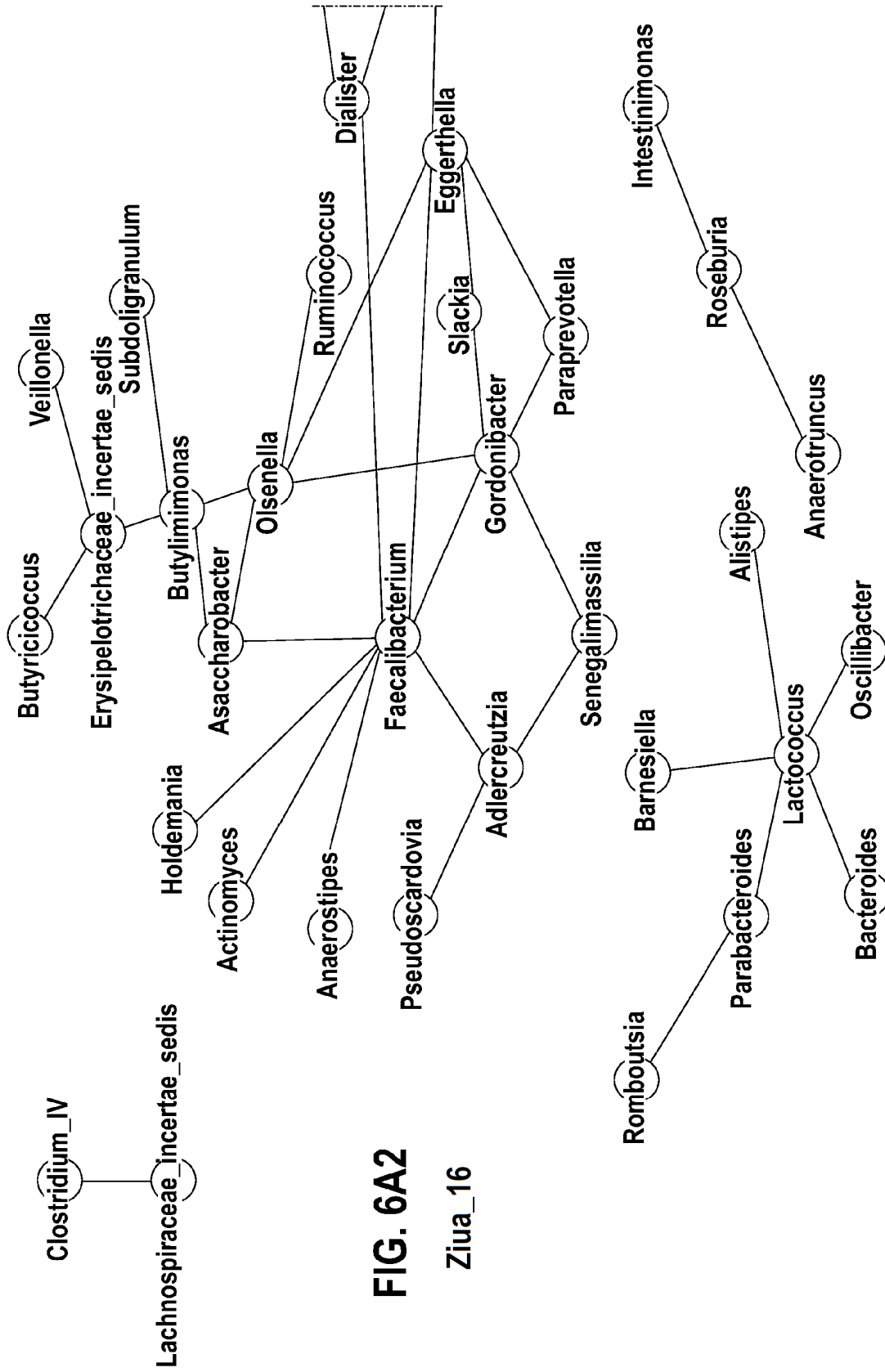


FIG. 6A1

Ziua_1







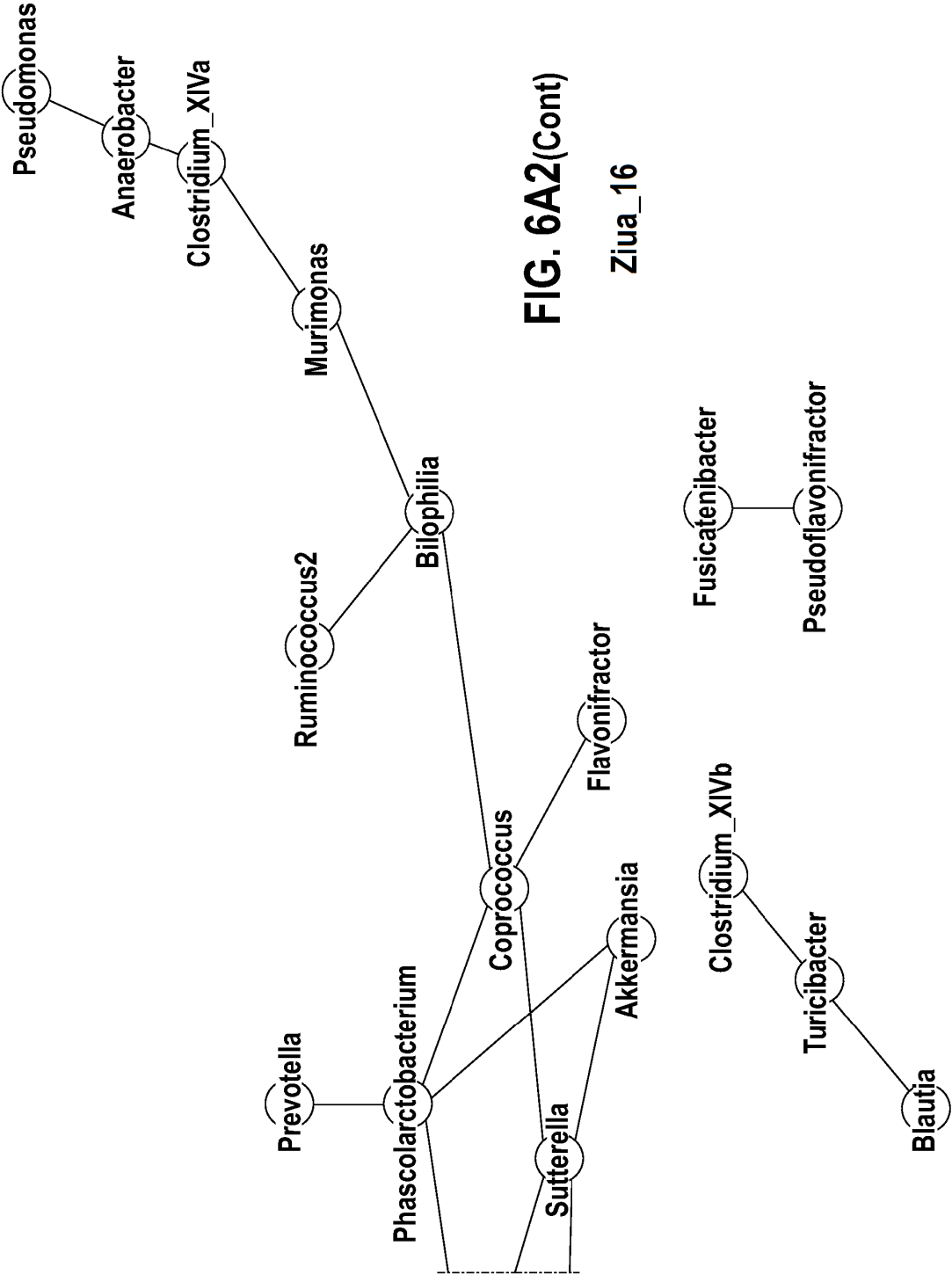


FIG. 6A2(Cont)

Ziua_16

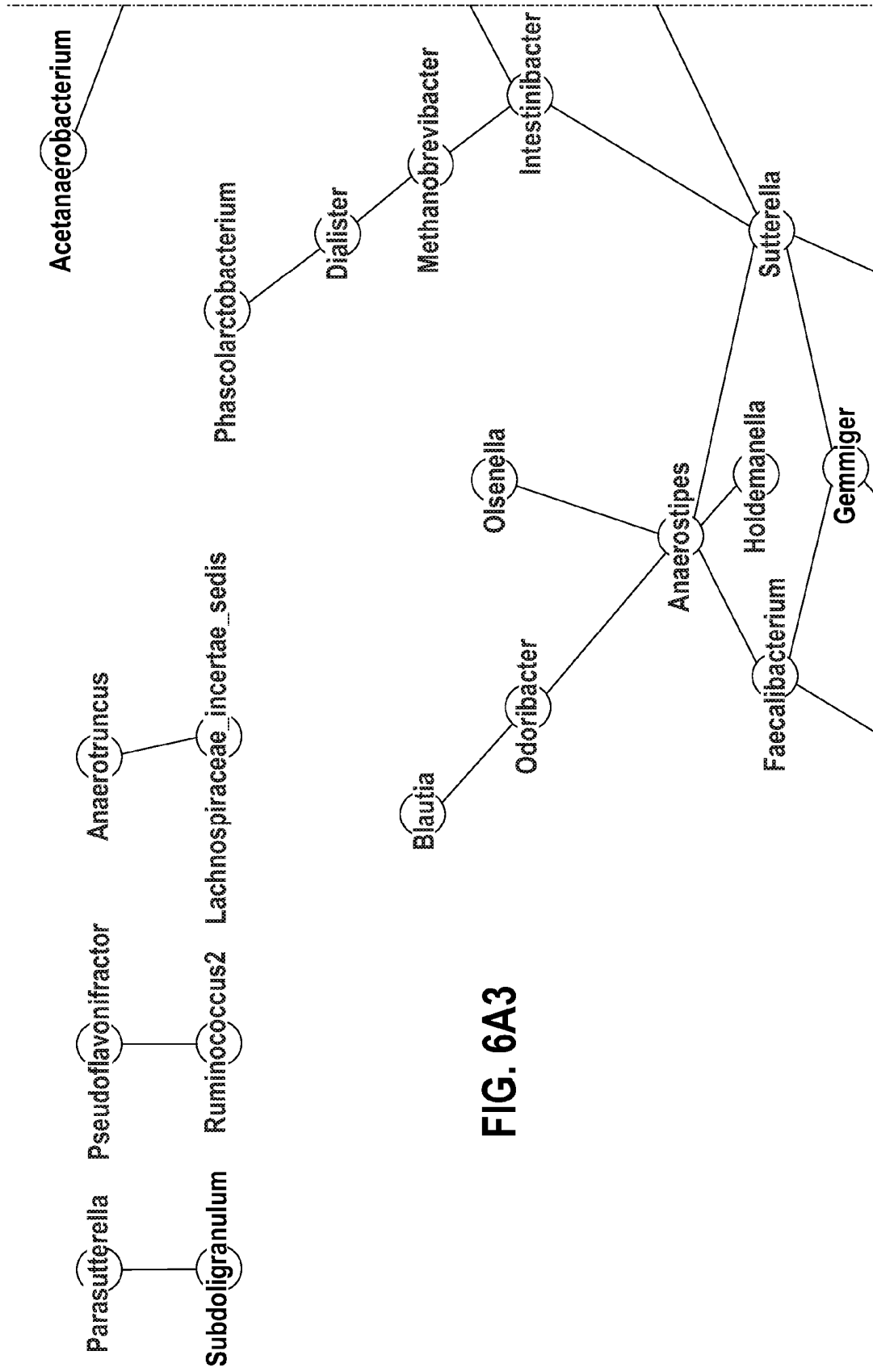


FIG. 6A3

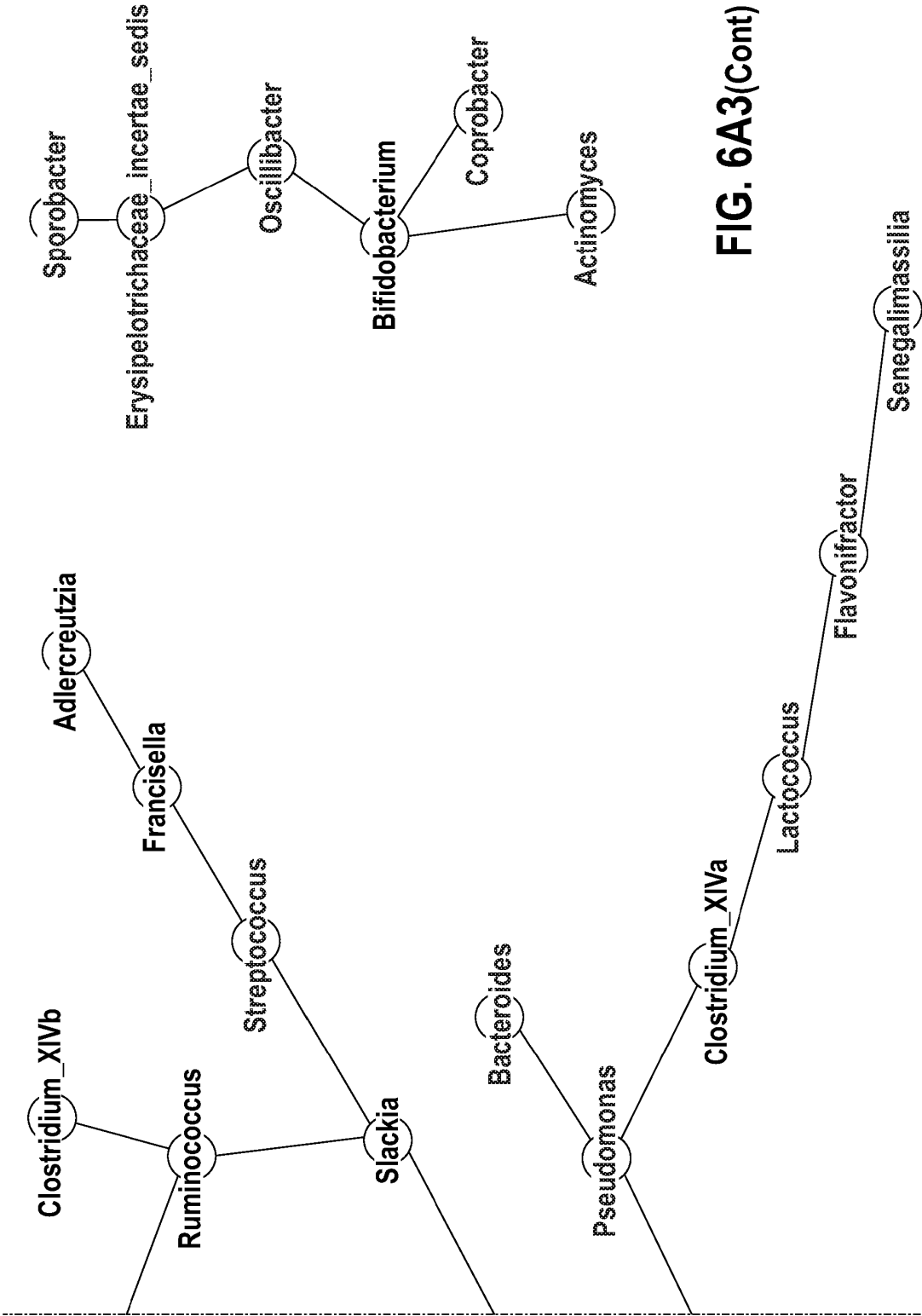


FIG. 6A3(Cont)

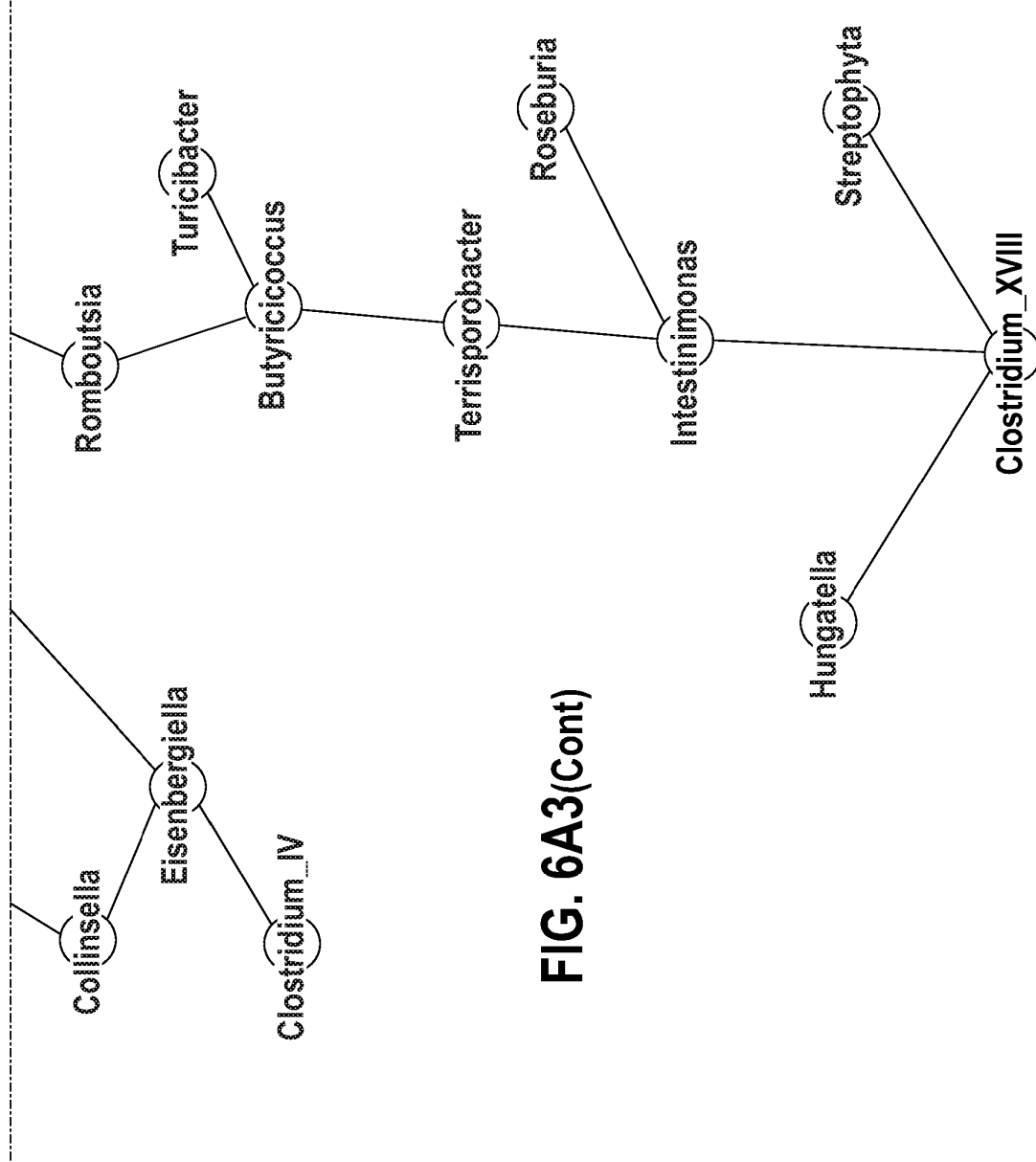
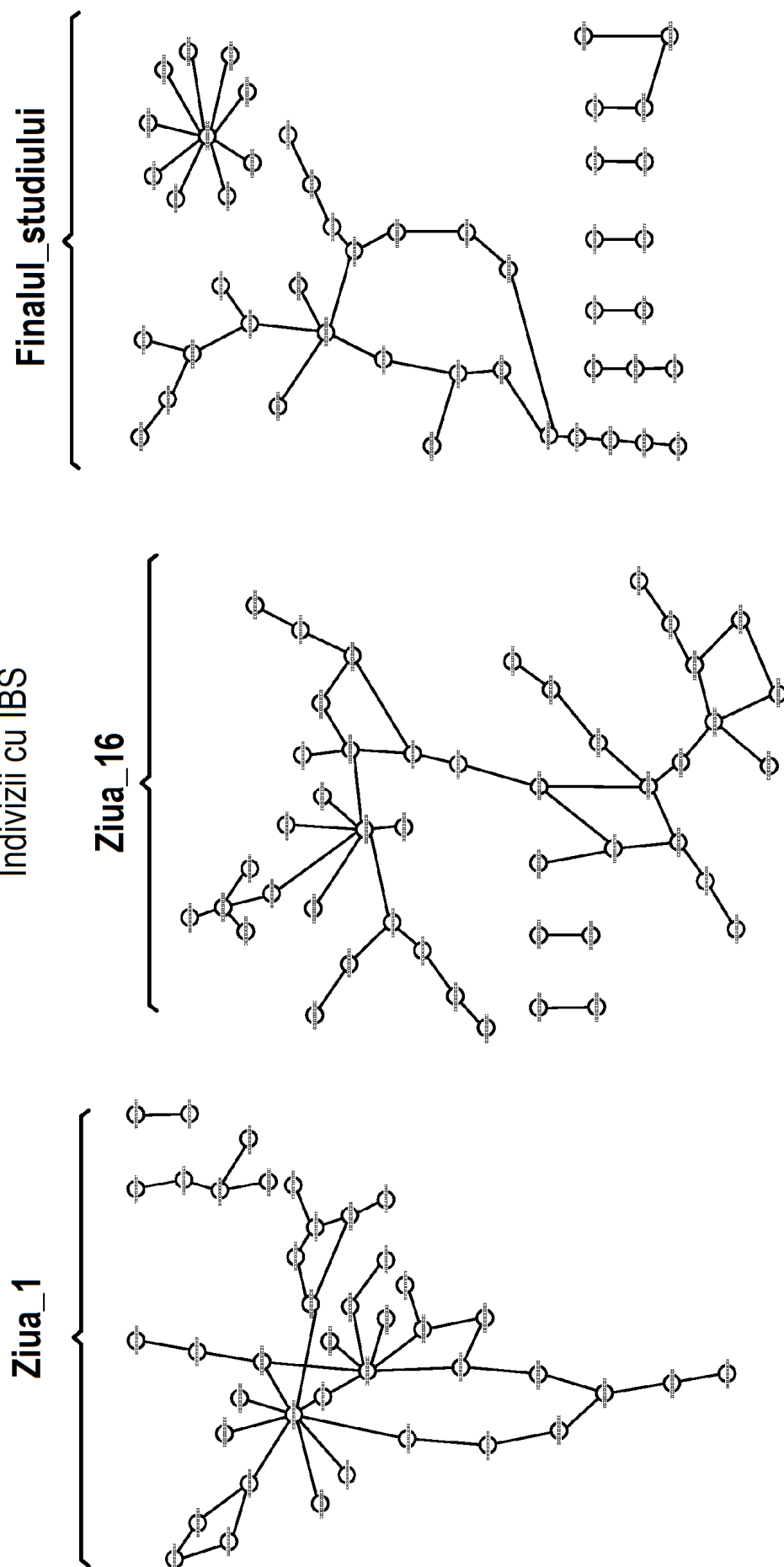
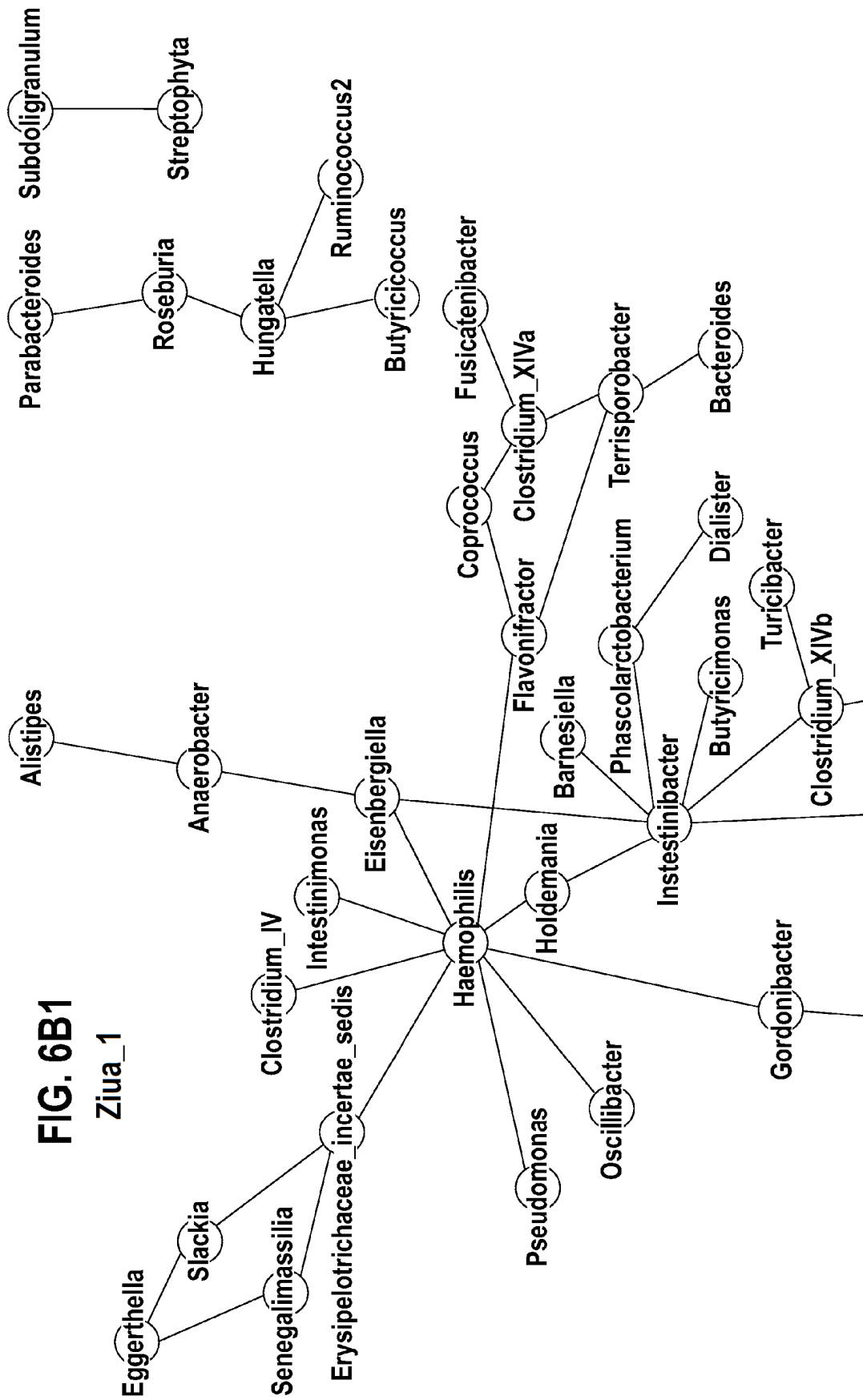
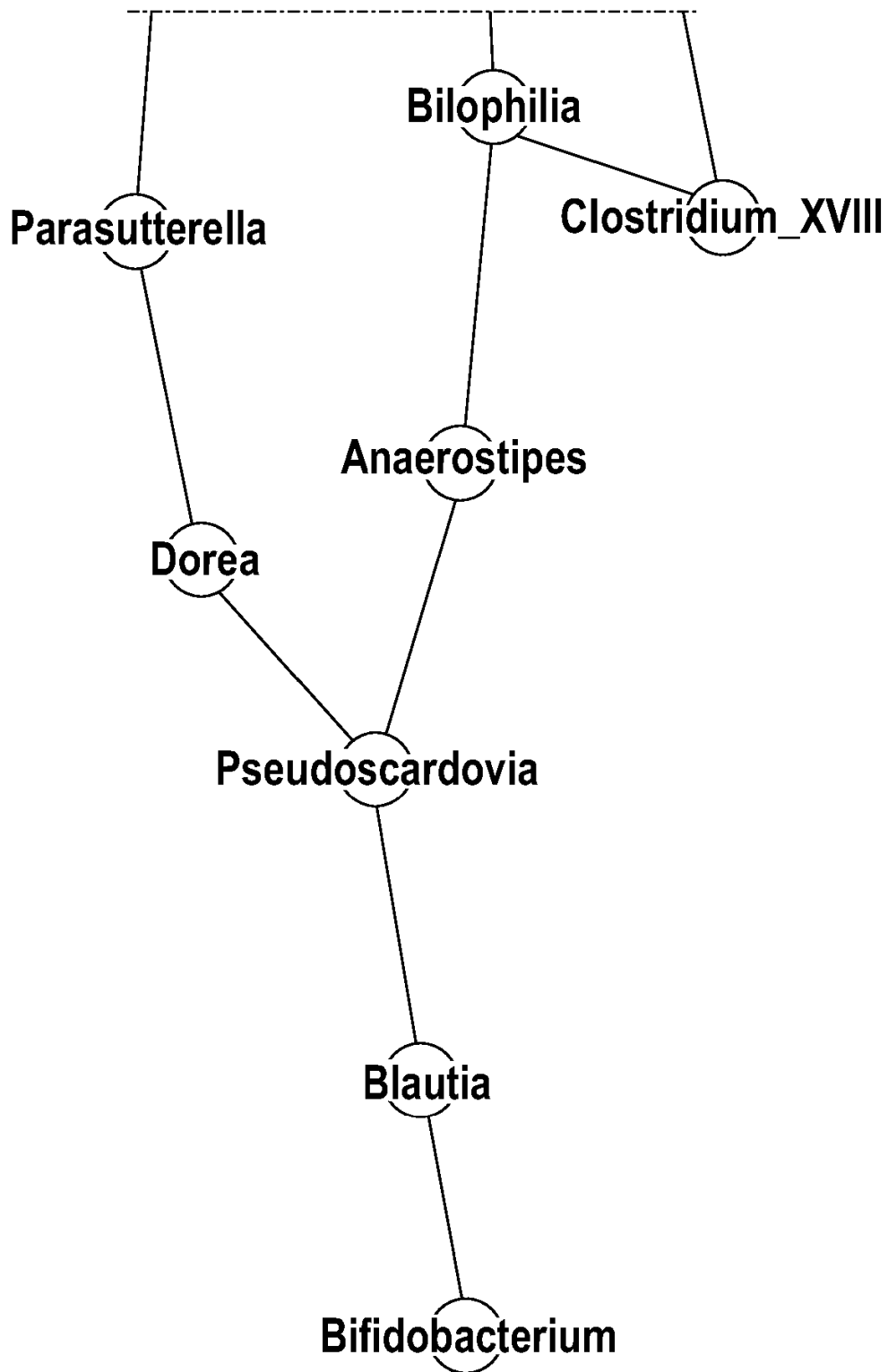


FIG. 6A3(Cont)

FIG. 6B
Indivizii cu IBS





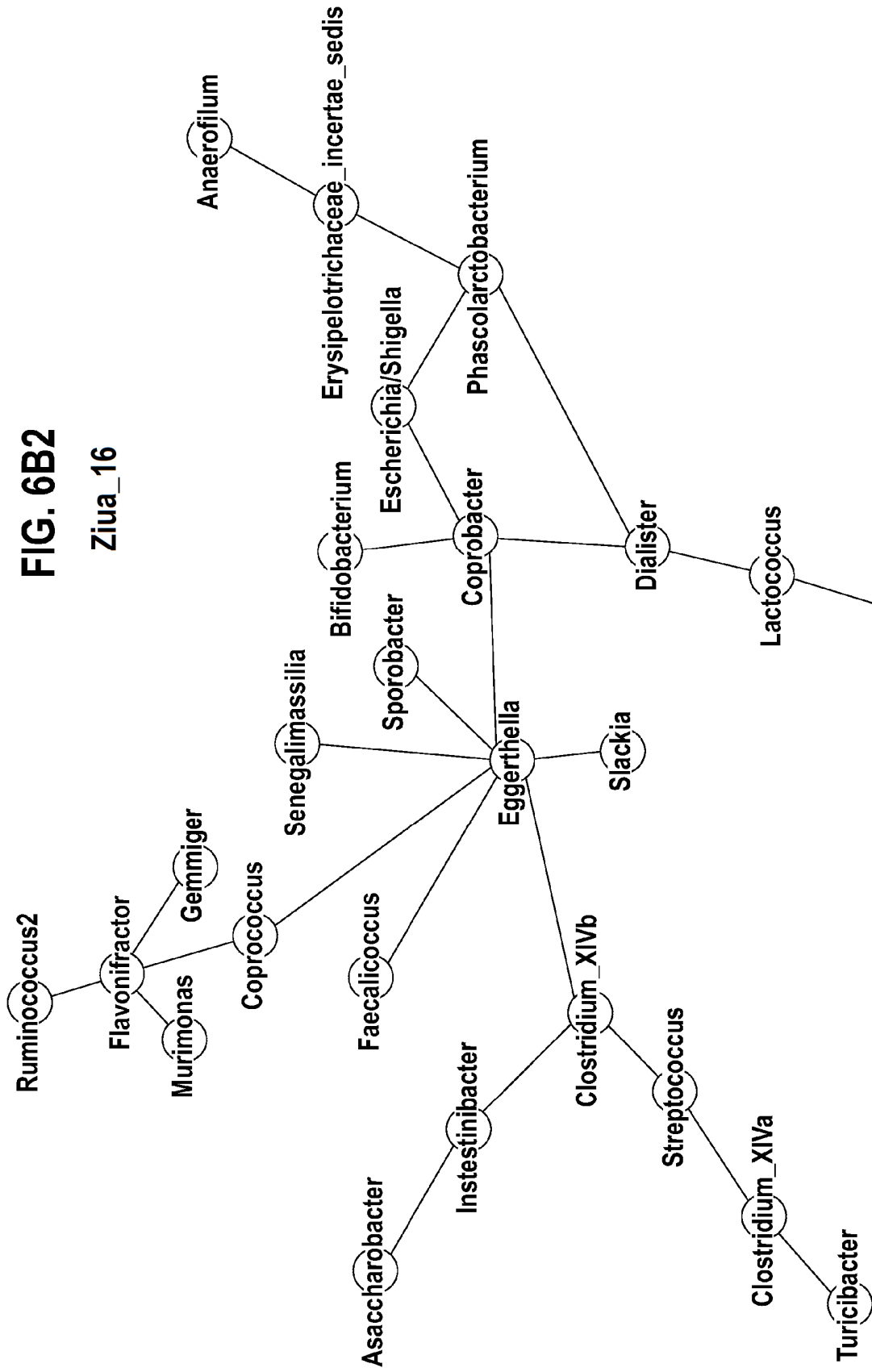


Ziua_1

FIG. 6B1(Cont)

FIG. 6B2

Ziua_16



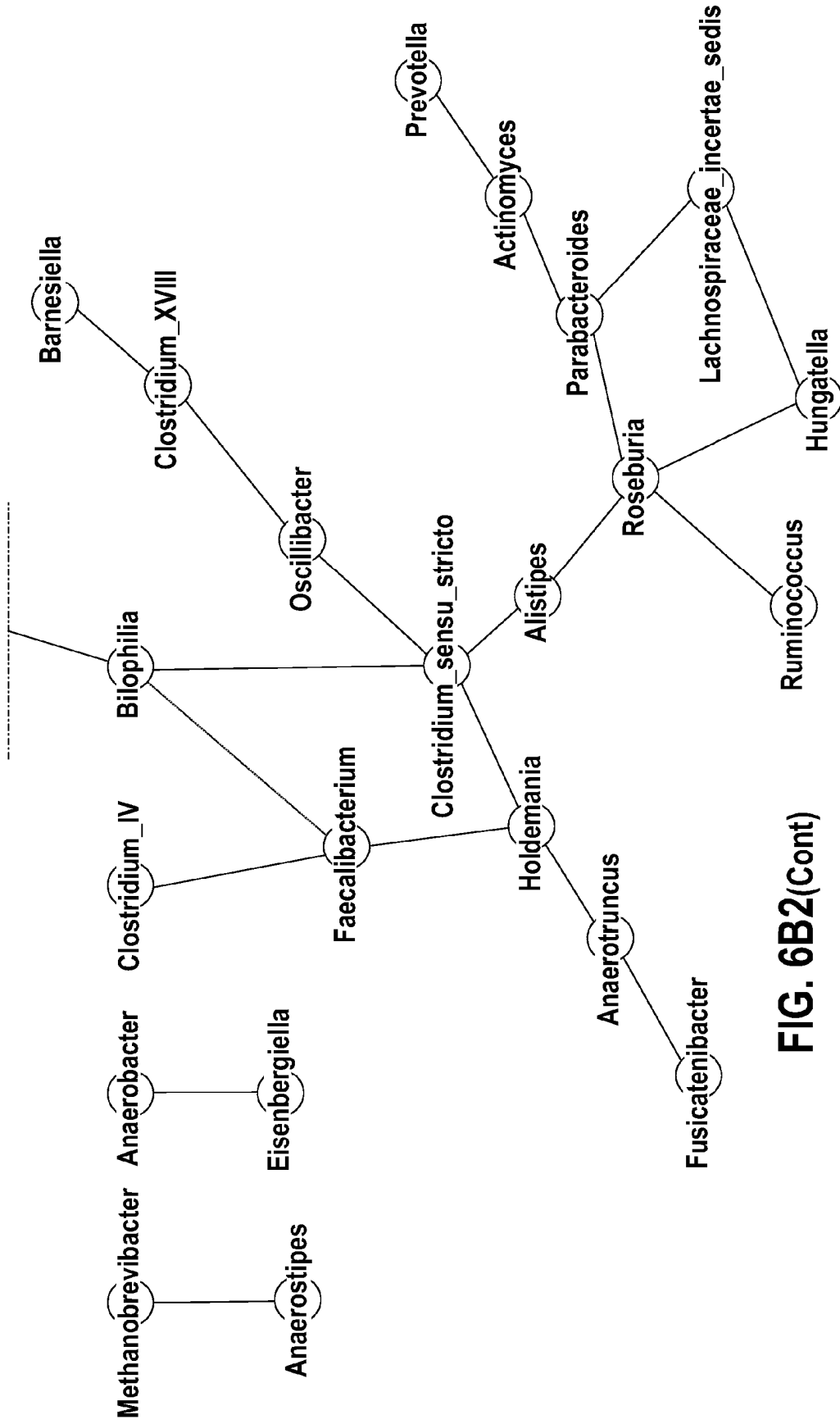


FIG. 6B2(cont)

Ziua_16

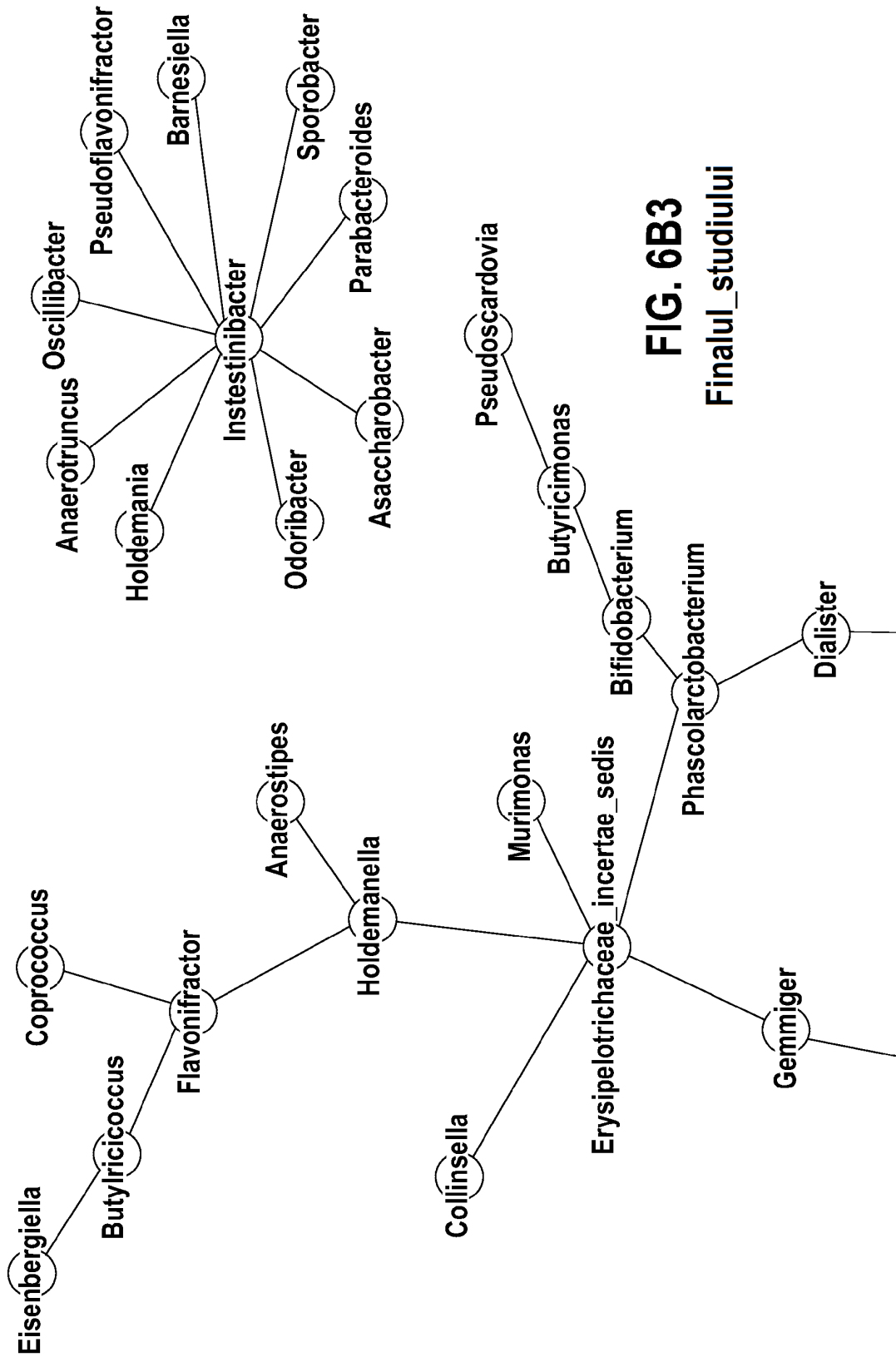
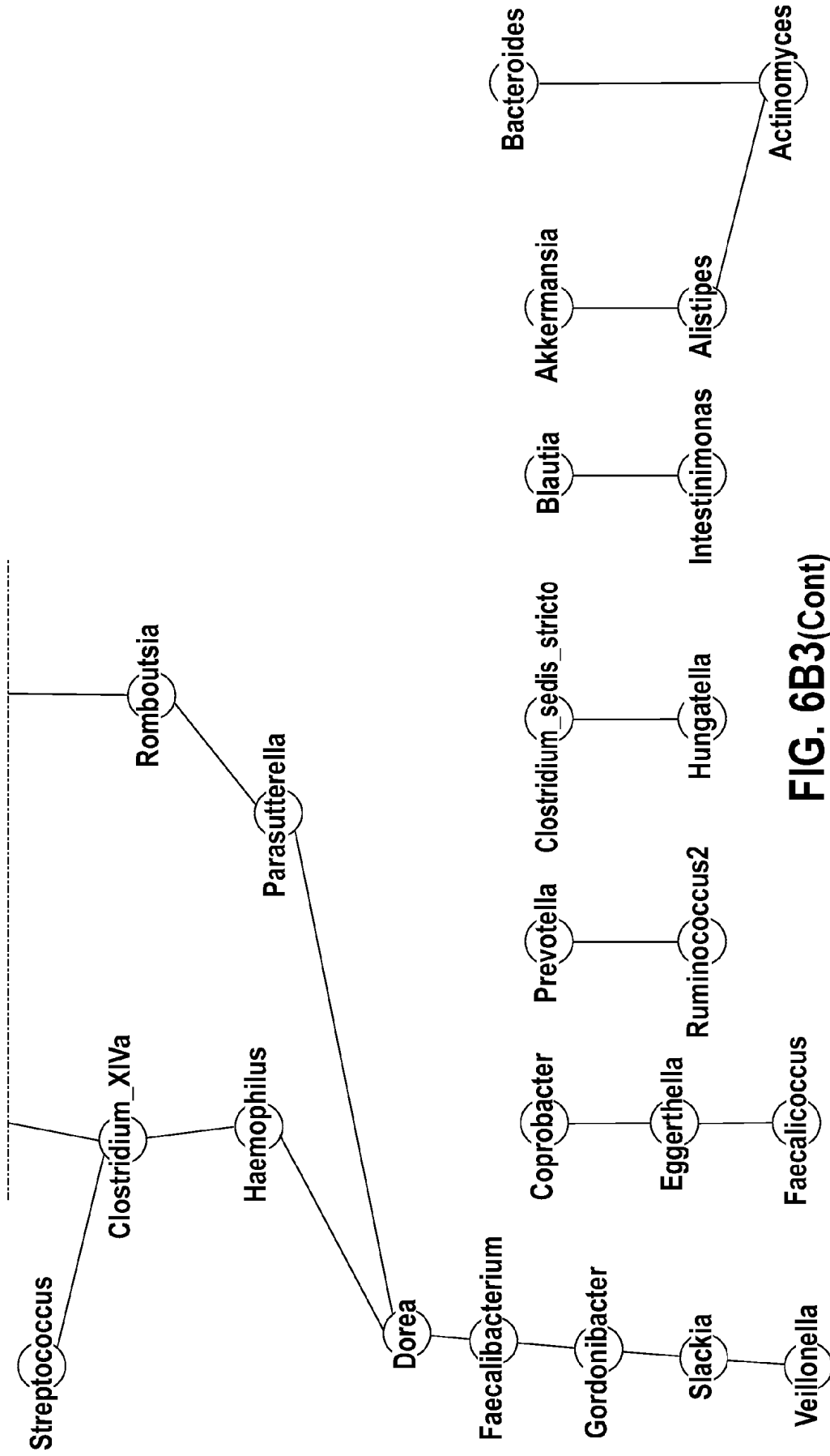


FIG. 6B3
Finalul_studiului

**FIG. 6B3(Cont)**

Finalul_studiului

FIG. 7

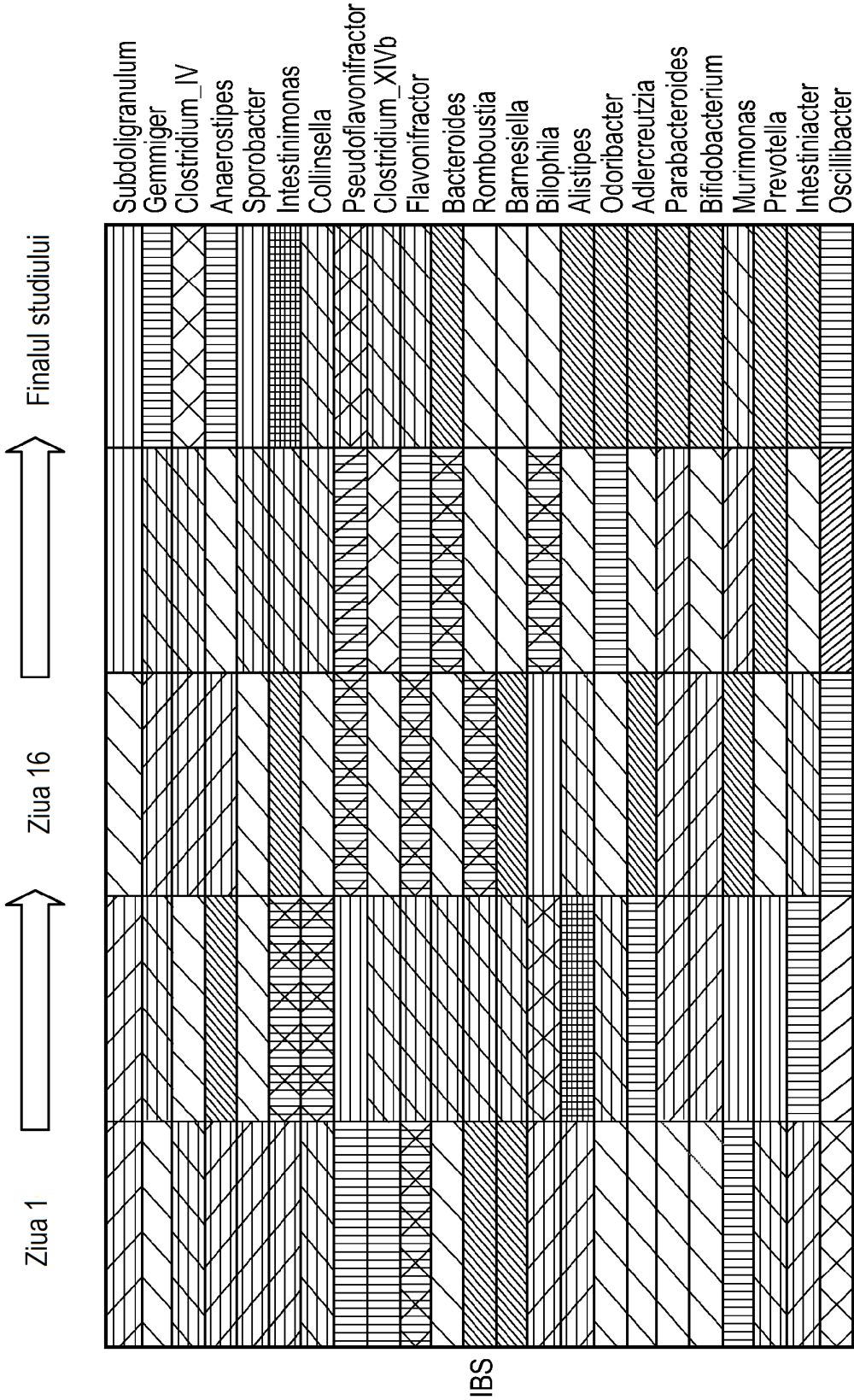
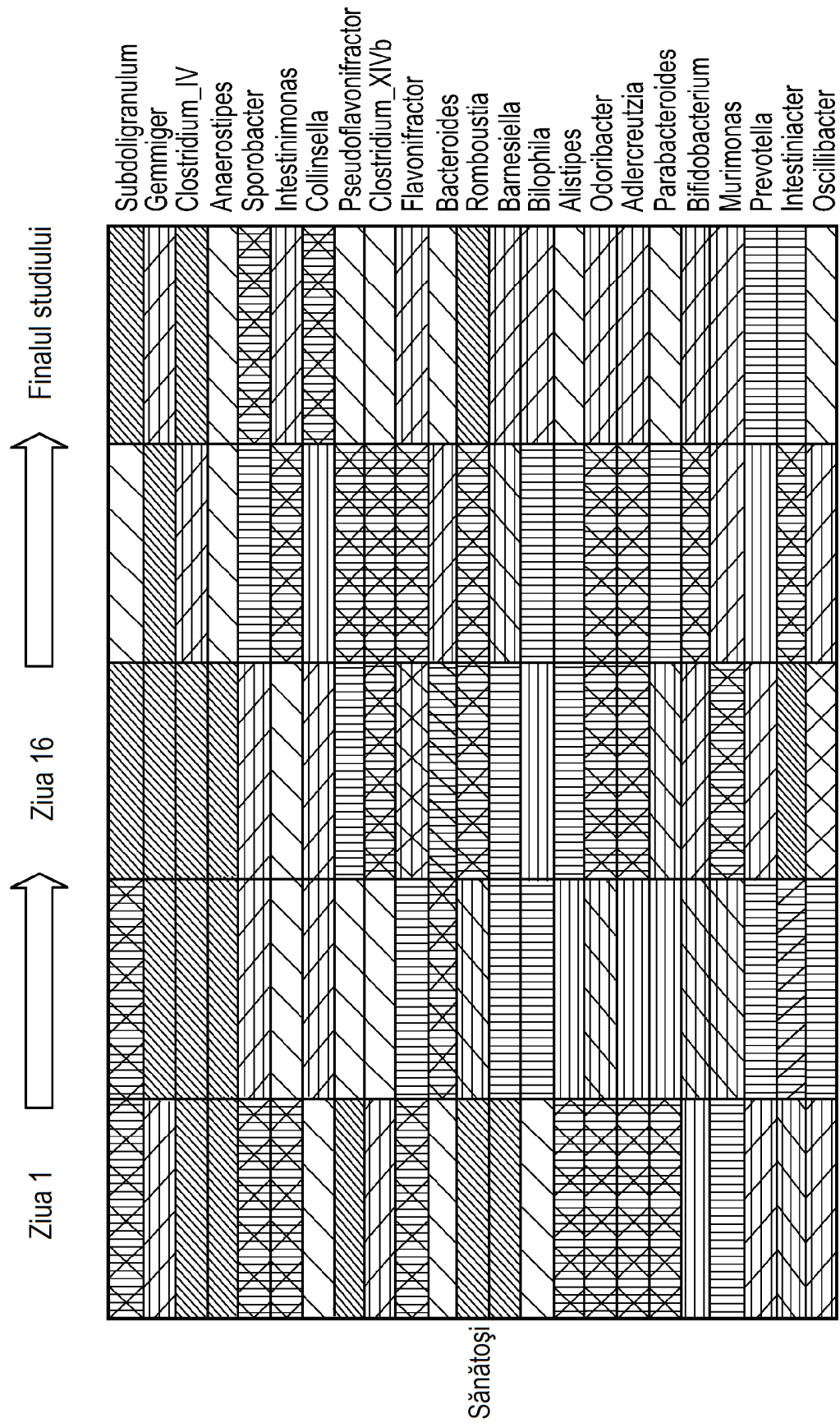
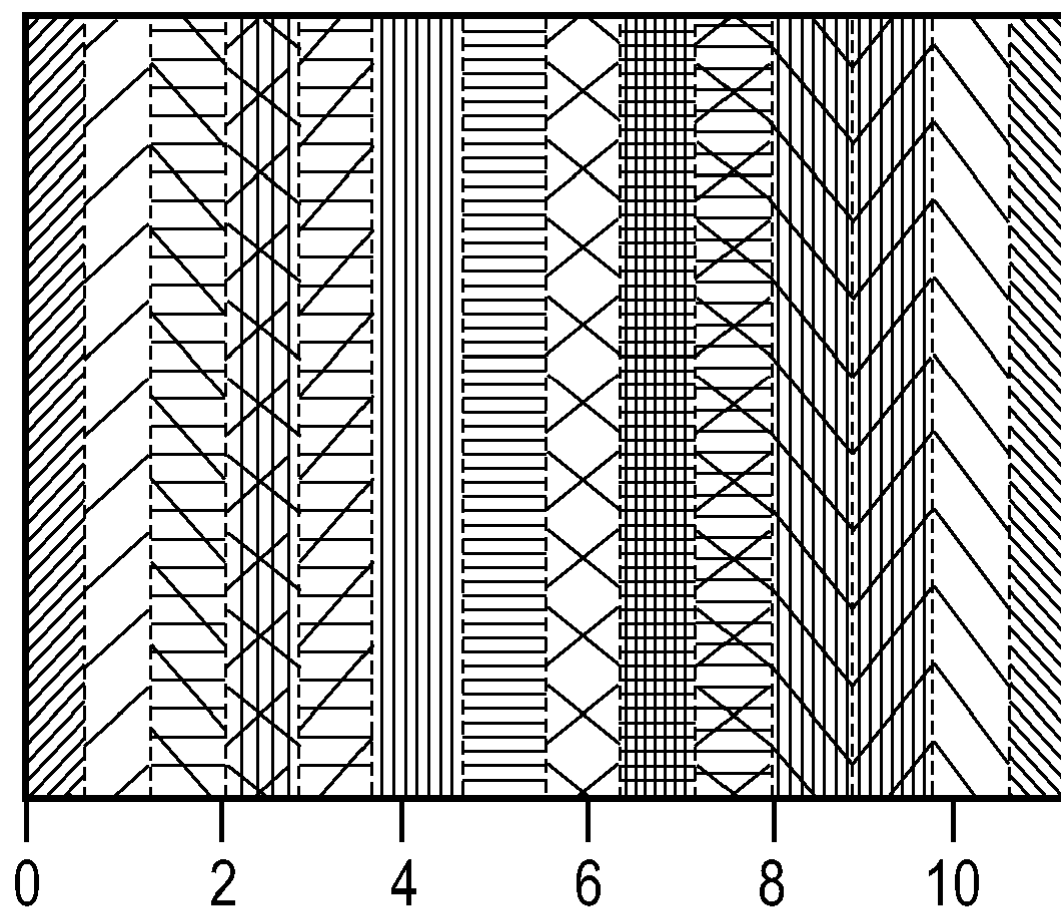


FIG. 7(Cont)



**FIG. 7(Cont)**

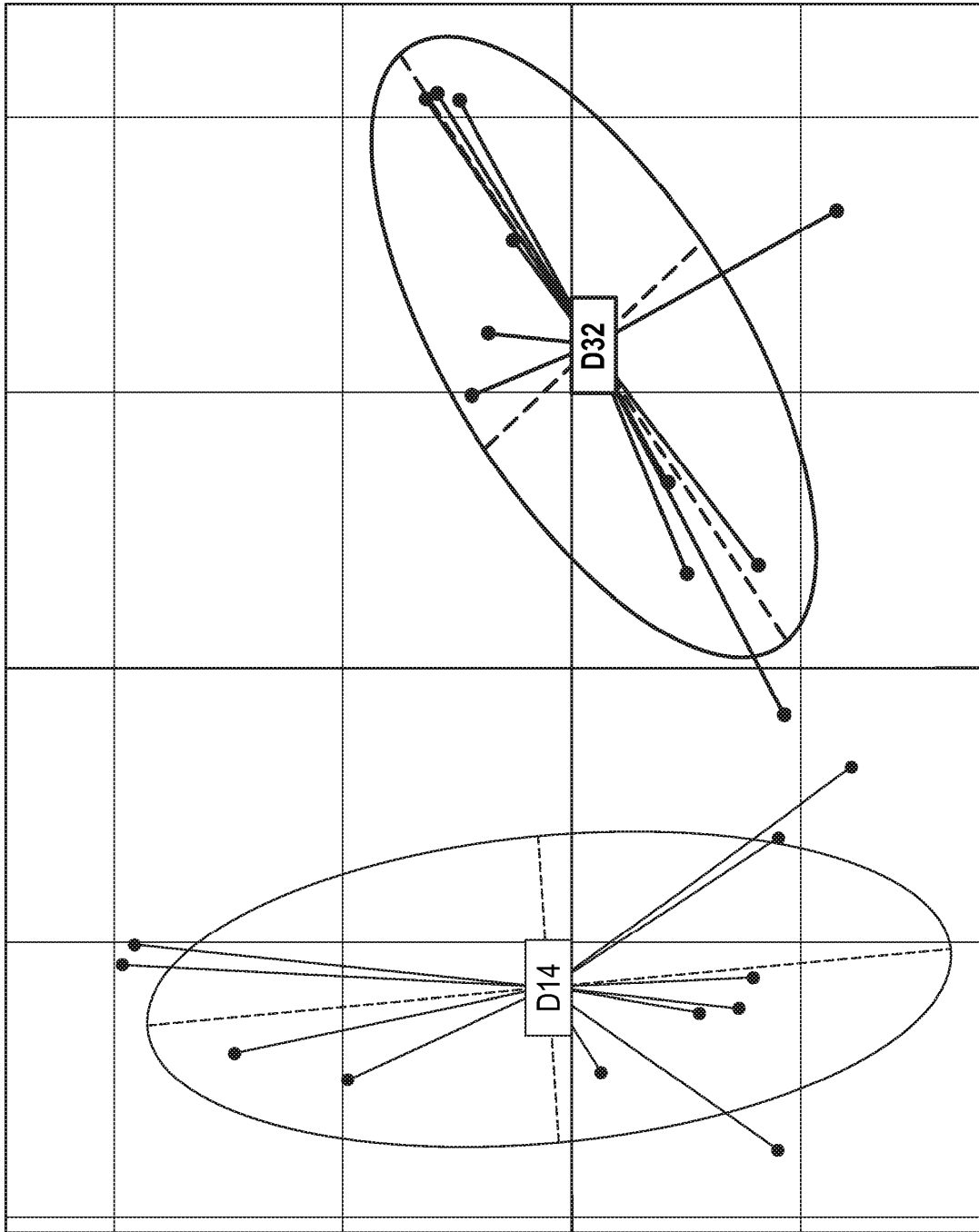


FIG. 8

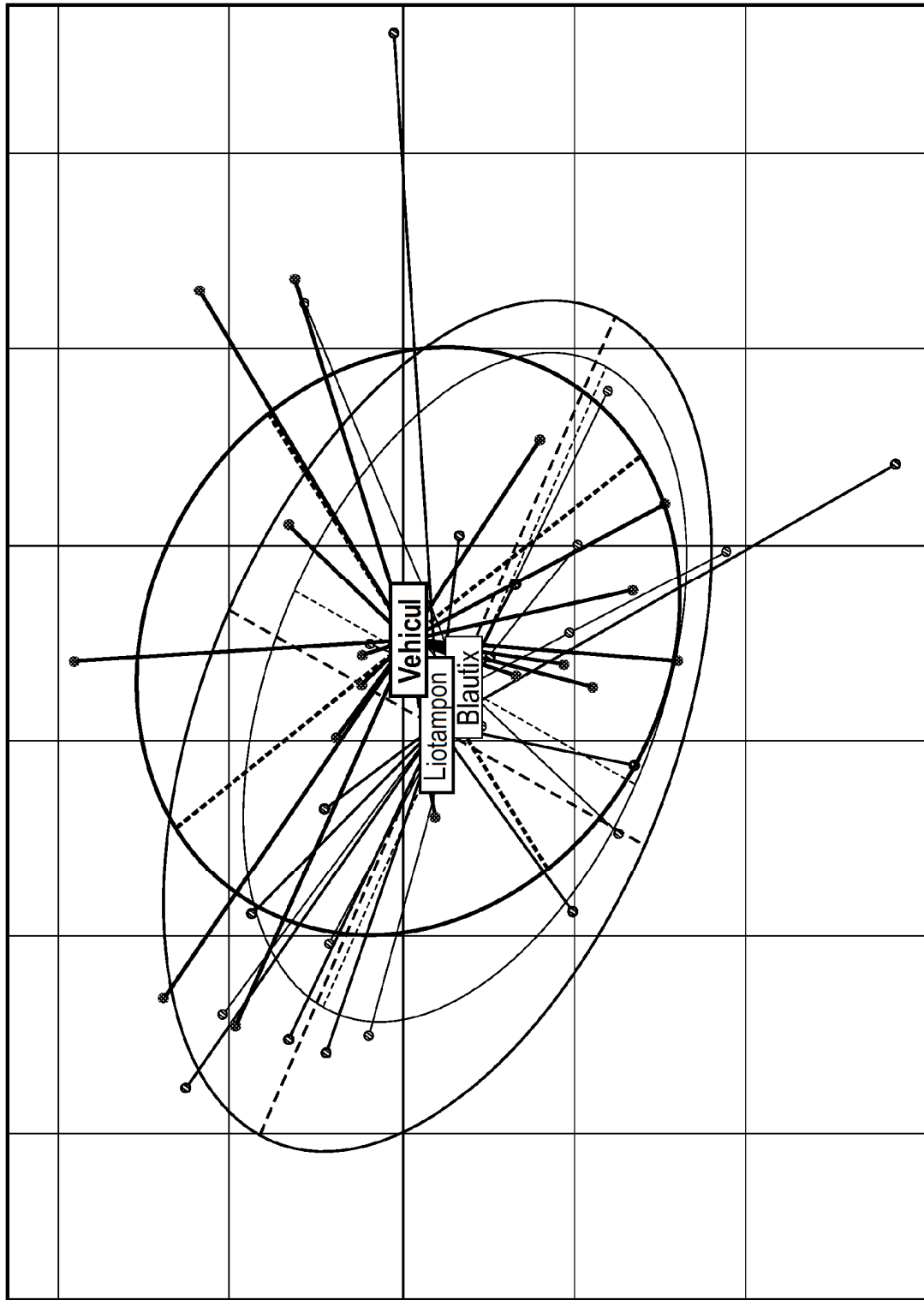


FIG. 9A

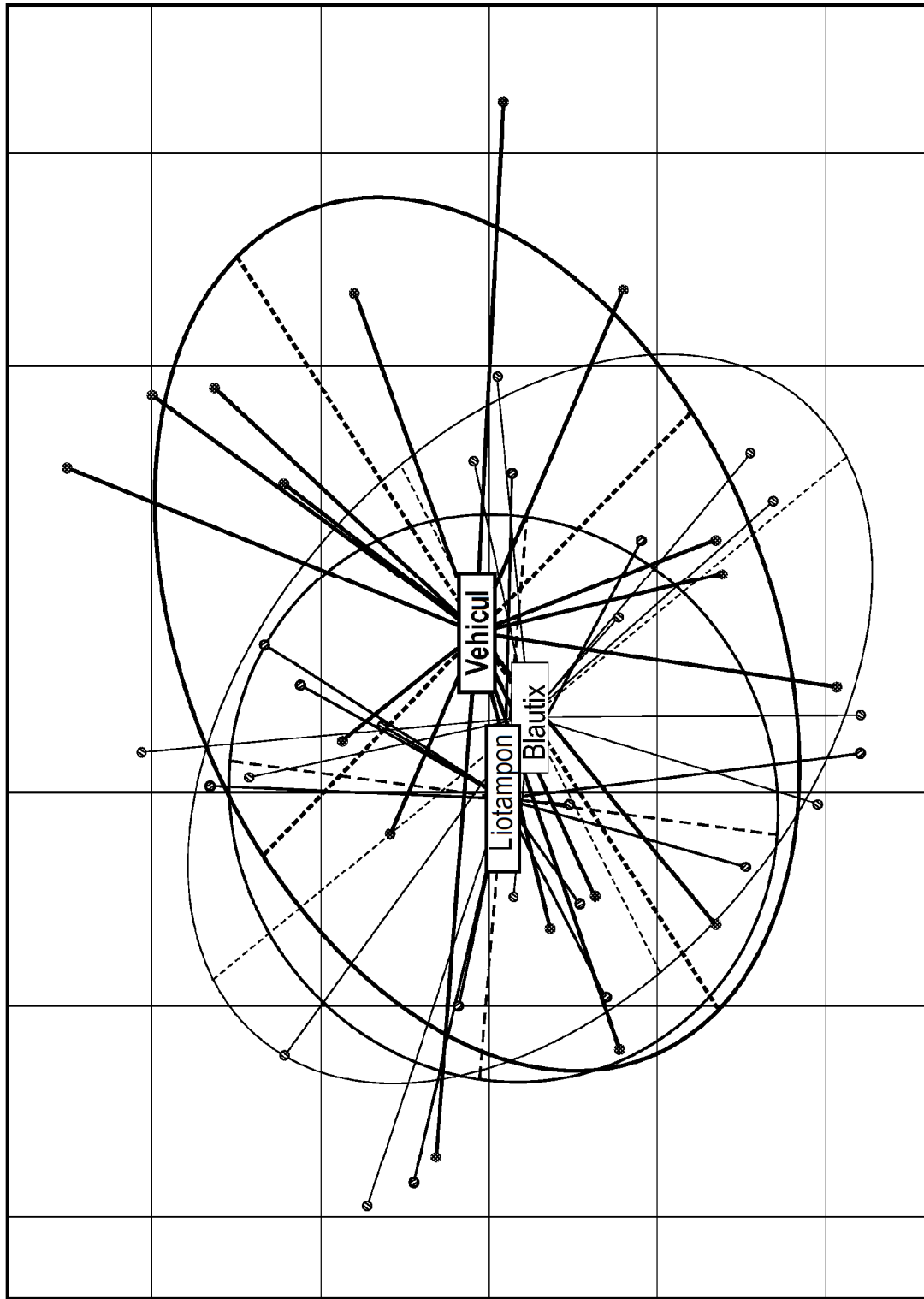


FIG. 9B

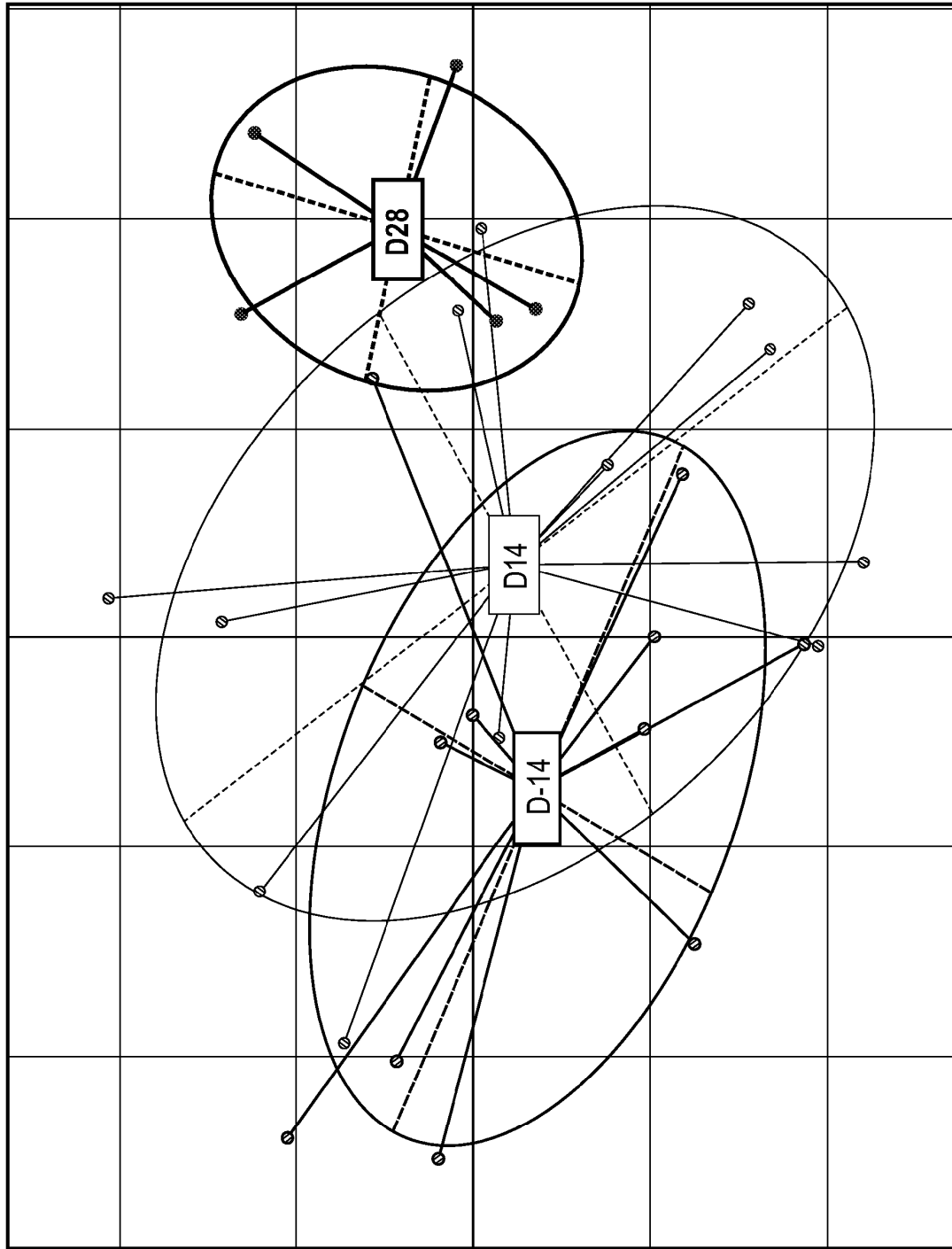


FIG. 9C

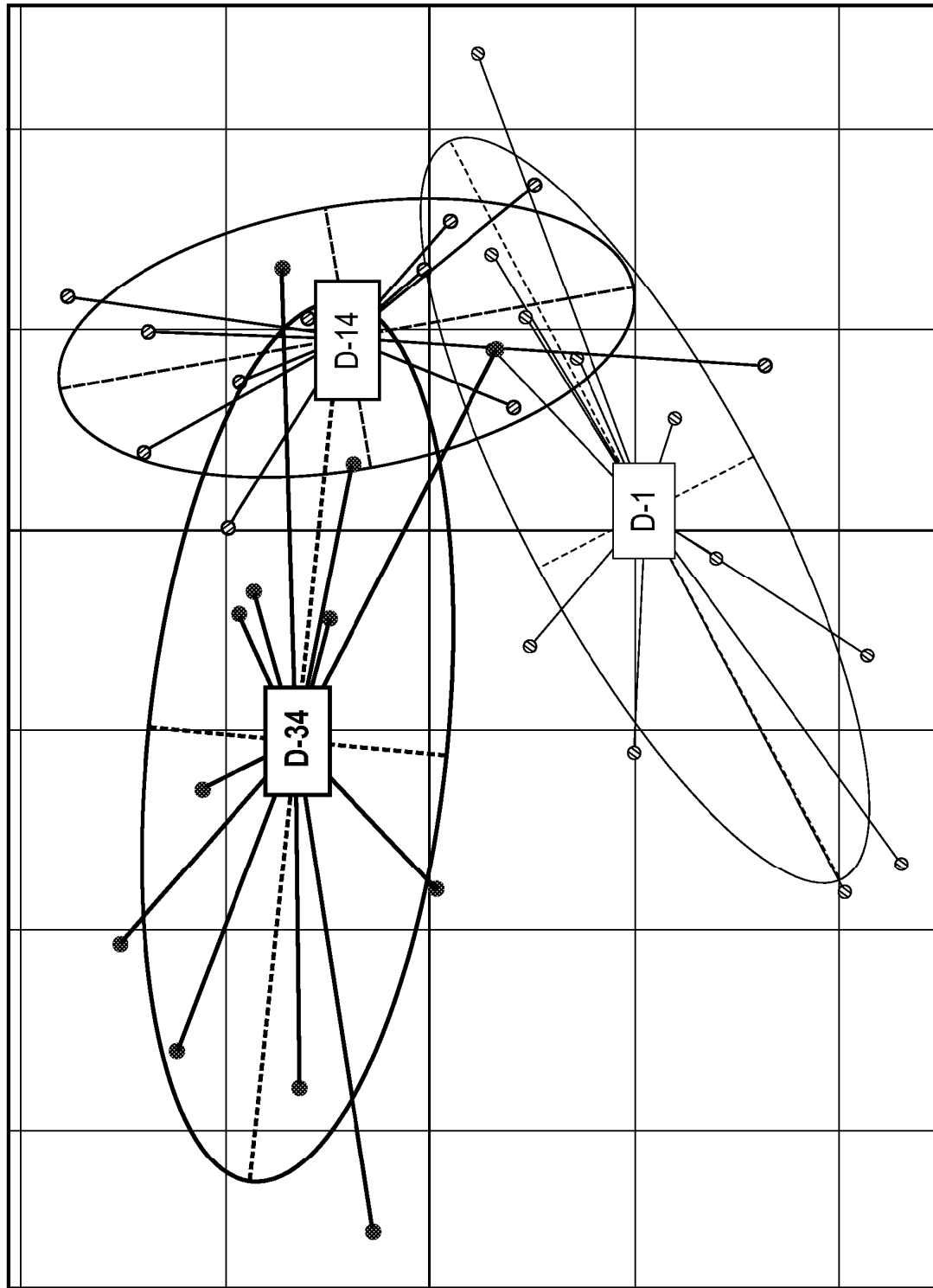


FIG. 10