(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 719 837**

(51) Int. CI.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61P 1/10 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2017 PCT/GB2017/052076**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18011593**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2017 E 17742523 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3313421**

(54) Título: **Composiciones que comprenden una cepa bacteriana de Blautia hydrogenotrophica para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal**

(30) Prioridad:

13.07.2016 GB 201612190
20.09.2016 GB 201616018
20.09.2016 GB 201616016
06.03.2017 GB 201703548
06.03.2017 GB 201703552

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2019

(73) Titular/es:

4D PHARMA PLC (100.0%)
5th floor, 9 Bond Court
Leeds, LS1 2JZ, GB

(72) Inventor/es:

CROUZET, LAUREEN;
HABOUZIT, CHLOE y
BERNALIER-DONADILLE, ANNICK

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Composiciones que comprenden una cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica* para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se encuentra en el campo de las composiciones que comprenden cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de mamíferos y el uso de tales composiciones en el tratamiento de enfermedades, como se define en las reivindicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se cree que el intestino humano es estéril en el útero, pero está expuesto a una gran variedad de microbios maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento. Después de eso, se produce un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciado por factores como el modo de administración, el entorno, la dieta y el genotipo del huésped, todos los cuales influyen en la composición de la microbiota intestinal, particularmente durante la vida temprana. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y se vuelve del tipo adulto [i]. La microbiota intestinal humana contiene más de 1500 filotipos diferentes dominados en niveles de abundancia por dos divisiones bacterianas principales (*phyla*), los Bacteroidetes y los Firmicutes [ii-iii]. Las relaciones simbióticas con éxito que surgen de la colonización bacteriana del intestino humano han producido una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales, protectoras y otras beneficiosas. Las actividades metabólicas mejoradas del intestino colonizado aseguran que los componentes de la dieta por lo demás no digeribles se degraden con la liberación de subproductos proporcionando una importante fuente de nutrientes para el huésped y beneficios adicionales para la salud. De manera similar, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es bien reconocida y se ejemplifica en animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunitario deteriorado que se reconstituye funcionalmente después de la introducción de bacterias comensales [iv-vi].

Se han documentado cambios dramáticos en la composición de la microbiota en trastornos gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Por ejemplo, los niveles de la bacteria del grupo XIVa de *Clostridium* y el grupo XI de *Clostridium (F. prausnitzii)* se reducen en pacientes con EII, mientras que los números de *E. coli* aumentan, sugiriendo un cambio en el equilibrio de simbiontes y patobiontes dentro del intestino [vii-xi].

En reconocimiento del efecto potencial positivo que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino animal, se han propuesto varias cepas para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades (ver, por ejemplo, [xii-xv]). Se han propuesto una serie de cepas, que incluyen principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, para su uso en el tratamiento de varios trastornos intestinales (ver [xvi] para una revisión). Las cepas del género *Blautia* también se han propuesto para su uso en la modulación del equilibrio microbiano del ecosistema digestivo en pacientes con SII (WO 01/85187). Sin embargo, la relación entre diferentes cepas bacterianas y diferentes enfermedades, y los efectos precisos de las cepas bacterianas particulares en el intestino y a nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades, están pobremente caracterizadas.

Hay un requisito para que los efectos potenciales de las bacterias intestinales se caractericen de tal manera que se puedan desarrollar nuevas terapias que usen bacterias intestinales.

La US 2010/0247489 describe el uso de nutrientes minerales para tratar trastornos digestivos. La US'789 propone también, opcionalmente, usar numerosos géneros diferentes de bacterias, incluyendo *Enterobacteriaceae,* para prevenir y reducir la formación de gases en el colon, por lo que este documento sugiere que el aumento de *Enterobacteriaceae spp.* en el tracto gastrointestinal pueden emplearse para tratar ciertas enfermedades. La US'789 no trata ningún método para reducir las *Enterobacteriaceae spp.*

La WO 2016/086206 sugiere que pueden usarse bacterias en el orden Clostridiales, incluyendo las *Enterbacteriaceace spp.,* para tratar o prevenir la disbiosis. No hay ninguna sugerencia en la WO'206 de que reducir el nivel de *Enterobacteriaceace spp.* en el tracto gastrointestinal pueda usarse para tratar enfermedades, ni ninguna sugerencia sobre cómo se podría conseguir una reducción del nivel de *Enterbacteriaceace spp.*

La WO 2012/142605 propone que puede ser posible tratar una serie de enfermedades diferentes con una combinación de microorganismos. La WO'605 sugiere un gran número de posibles especies bacterianas que podrían emplearse, pero no hay ninguna explicación en la WO'605 sobre cómo podría usarse cualquiera de las especies bacterianas propuestas para tratar cualquiera de las enfermedades propuestas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades asociadas con

Enterobacteriaceae, en particular *E. coli.* En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Blautia* pueden ser eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* puede reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, incluyendo *E. coli,* y puede tratar o prevenir enfermedades asociadas con *Enterobacteriaceae* o *E. coli.* Por lo tanto, en una primera realización, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO:5, para su uso en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* patógenas en el tracto gastrointestinal.

En realizaciones preferidas de todos los aspectos de la invención, las *Enterobacteriaceae* son *E. coli.* La cepa bacteriana es de *Blautia hydrogenotrophica* como se define en las reivindicaciones y es preferiblemente la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia,* para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con infección por *Enterobacteriaceae*, como infección por *E. coli*, como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de infección por *Enterobacteriaceae*, como infección por *E. coli*.

En realizaciones preferidas adicionales, las composiciones de la invención, como se definen en las reivindicaciones, son para su uso en la reducción del nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, preferiblemente el nivel de *E. coli*, en el tratamiento o prevención del SII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal.

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir la diarrea. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Blautia* pueden ser eficaces para reducir la diarrea. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* puede reducir la diarrea en pacientes que tienen síndrome de intestino irritable (SII).

La cepa bacteriana en la composición es de *Blautia hydrogenotrophica.* También se pueden usar cepas estrechamente relacionadas, como las cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia ARNr 16s de la cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica.* Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:5. Lo más preferible, la cepa bacteriana en la composición es la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas de la invención puede ser eficaz para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. Además, la administración oral es conveniente para los pacientes y los practicantes médicos, y permite el suministro y/o la colonización parcial o total del intestino.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que se ha liofilizado. La liofilización es una técnica eficaz y conveniente para preparar composiciones estables que permiten el suministro de bacterias, y se muestra que proporciona composiciones eficaces en los ejemplos.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se ha descrito anteriormente.

La divulgación proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se ha descrito anteriormente.

Además, la invención proporciona un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal y tratar o prevenir de este modo enfermedades asociadas con *Enterobacteriaceae, que* comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Medición de la población de BH por qPCR, que muestra un aumento de BH en los días 14 y 28 para ratas HMI con SII que recibieron el liofilizado de BH.

Figura 2: Estudio de dosificación en ratas HIM - cuantificación por RT-PCR de *B. hydrogenotrophica* en muestras fecales de ratas HIM sanas que recibieron diferentes concentraciones de la especie bacteriana.

Figura 3: Tiempo de tránsito de *B. hydrogenotrophica* después de la administración oral (10^9/día) a ratas HIM sanas.

Figura 4: Comparación de *los* niveles de *B. hydrogenotrophica* encontrados en muestras fecales y cecales de ratas HIM sanas (cuantificación RT-PCR) después de 14 días de administración - *B. hydrogenotrophica* administrada a 10^{10}/día/rata.

Figura 5: Efecto de la administración de *B. hydrogenotrophica* sobre la composición de la microbiota fecal de ratas asociadas con microbiota humana sana. Administración de 10^{10} *B. hydrogenotrophica*/día durante 14 días (resultados de 2 microbiota fecales humanas sanas (20 ratas HIM) - análisis de qPCR).

Figura 6: Impacto de *la* administración de *B. hydrogenotrophica* sobre las poblaciones microbianas en ratas SII-HIM.

Figura 7a: Cambio en los niveles de *Blautia hydrogenotrophica* en microbiota del paciente durante y después del tratamiento con Blautix.

Figura 7b: Cambio en los niveles de *Enterobacteriaceae* en microbiota del paciente durante y después del tratamiento con Blautix.

Figura 8: resultados de Cmax de la prueba de aliento de hidrógeno para el día 1, día 2, día 15 y día 16 para pacientes con SII tratados con Blautix (**Figura 8a**) y pacientes con SII tratados con placebo (**Figura 8b**). La **Figura 8c** es un gráfico que compara el porcentaje de pacientes tratados con Blautix con una reducción de hidrógeno entre la media de los días 15 y 16 y la media de los días 1 y 2 con el porcentaje de pacientes tratados con placebo con una reducción de hidrógeno entre estos puntos temporales.

Figura 9a: Datos emparejados de la prueba de aliento no corregida con hidrógeno y corregida con hidrógeno para el día 1 y el día 15 para pacientes con SII tratados con Blautix; **Figura 9b:** gráfico que compara los resultados de la prueba de aliento no corregida con hidrógeno medios para el día 1 y el día 15 para el grupo de tratamiento con Blautix; **Figura 9c:** gráfico que compara los resultados de la prueba de aliento corregida con hidrógeno medios para el día 1 y el día 15 para el grupo de tratamiento con Blautix.

Figura 10a: Datos emparejados de la prueba de aliento no corregida con hidrógeno y corregida con hidrógeno para el día 1 y el día 15 para pacientes con SII tratados con placebo; **Figura 10b:** gráfico que compara los resultados de la prueba de aliento no corregida con hidrógeno medios para el día 1 y el día 15 para el grupo de placebo; **Figura 10c:** gráfico que compara los resultados de la prueba de aliento corregida con hidrógeno medios para el día 1 y el día 15 para el grupo de placebo.

Figura 11: Gráficos que comparan los resultados de la prueba de aliento de hidrógeno medios del día 1 y el día 15 para el grupo de tratamiento con Bautix (Verum) y el grupo de placebo (**Figura 11a**: hidrógeno no corregido; **Figura 11b**: hidrógeno corregido).

Figura 12: Evaluación de qPCR de la población de *B. hydrogenotrophica* en muestras fecales de ratas SII-HMA tratadas o no con una composición que comprende *B.hydrogenotrophica* (BlautiX) durante 28 días.

Figura 13: Enumeración de bacterias en muestras fecales de rata SII HMA después de la administración de *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) frente a solución de control.

Figura 14: Cambios en los síntomas del paciente durante el período de dosificación (días 1-16) del ensayo clínico de Fase I.

Figura 15 : Cambios en los síntomas del paciente durante el período de reposo del ensayo clínico de Fase I.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

Cepas bacterianas

Las composiciones de la invención comprenden una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO:5. Los ejemplos demuestran que las bacterias de esta especie son útiles para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, en particular *E. coli.* Las cepas bacterianas son de la especie *Blautia hydrogenotrophica.* La más

preferida es la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

Las especies de *Blautia* son bacterias no móviles de reacción Gram positiva, que pueden ser o cocoides u ovales y son todas anaerobios obligados que producen ácido acético como el producto final principal de la fermentación de la glucosa [xvii]. La Blautia puede aislarse del intestino humano, aunque la *B. producta* se aisló de una muestra de septicemia.

La *Blautia hydrogenotrophica* (anteriormente conocida como *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) se ha aislado de los intestinos de los mamíferos, es estrictamente anaeróbico, y metaboliza H_2/CO_2 a acetato, que puede ser importante para la nutrición y la salud humana. El tipo de cepa de *Blautia hydrogenotrophica* es S5a33 = DSM 10507 = JCM 14656. El número de acceso de GenBank para la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 es X95624.1 (divulgada en la presente como SEQ ID NO: 5). Esta cepa de *Blautia hydrogenotrophica* ejemplar se describe en [xvii] y [xviii]. La cepa S5a33 y la cepa S5a36 corresponden a dos subclones de una cepa aislada de una muestra fecal de un sujeto sano. Muestran morfología, fisiología y metabolismo idénticos y tienen secuencias de ARNr 16S idénticas. Por tanto, en algunas realizaciones, la *Blautia hydrogenotrophica* para su uso en la invención tiene la secuencia ARNr 16S de la SEQ ID NO:5.

La bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294 se probó en los ejemplos y también es referida en la presente como cepa BH. La cepa BH se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [Colección de microorganismos alemana] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania) el 26 de enero de 1996 como "*Ruminococcus hydrogenotrophicus*" con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294 como "S5a33" el 14 de mayo de 2001. El depositante fue el INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, Francia. La propiedad de los depósitos ha pasado a 4D Pharma Plc mediante cesión.

También se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa probada en los ejemplos sean eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, en particular *E. coli.* En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia Hydrogenotrophica.* Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:5.

También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 sean eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, en particular *E. coli.* Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene características fisiológicas y bioquímicas iguales o muy similares.

Las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse secuenciando otras secuencias de nucleótidos para una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294. Por ejemplo, se puede secuenciar sustancialmente el completo genoma y una cepa de biotipo para su uso en la invención puede tener por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en por lo menos un 80% de su genoma completo (por ejemplo, en por lo menos el 85%, 90%, 95% o 99%, o en todo su genoma). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene por lo menos un 98% de identidad de secuencia en por lo menos un 98% de su genoma o por lo menos un 99% de identidad de secuencia en un 99% de su genoma. Otras secuencias adecuadas para su uso en la identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas como BOX, ERIC, $(GTG)_5$ o REP o [xx]. Las cepas de biotipo pueden tener secuencias con por lo menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294. En algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene una secuencia con por lo menos un 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada como DSM 10507/14294 y comprende una secuencia de ARNr 16S eso es por lo menos un 99% idéntica (por ejemplo, por lo menos el 99,5% o por lo menos el 99,9% idéntica) a la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene una secuencia con por lo menos un 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada como DSM 10507/14294 y tiene la secuencia ARNr 16S de la SEQ ID NO:5.

Alternativamente, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse usando el depósito del número de acceso DSM 10507/14294 y análisis de fragmentos de restricción y/o análisis de PCR, por ejemplo, usando polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados fluorescentes (FAFLP) e identificación de elementos de ADN repetitivos (rep)-PCR, o realización de perfiles de proteínas, o secuenciación de ADNr 16S o 23s parcial. En realizaciones preferidas, tales técnicas pueden usarse para identificar otras cepas de *Blautia hydrogenotrophica*.

En ciertas realizaciones, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y que son adecuadas para su uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 cuando se analizan por análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), por ejemplo, cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI (para métodos ejemplares y orientación, ver, por ejemplo, [xxi]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

Otras cepas de *Blautia* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, como los biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, pueden identificarse usando cualquier método o estrategia apropiada, incluyendo los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para su uso en la invención pueden identificarse cultivando bacterias y administrándolas a ratas para probarlas en el ensayo de distensión. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo metabólico y/o antígenos de superficie similares a una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 pueden ser útiles en la invención. Una cepa útil tendrá una actividad moduladora de la microbiota comparable a la cepa DSM 10507/14294. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en *Enterobacteriaceae* a los efectos mostrados en los ejemplos, que pueden identificarse usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294. Esta es la cepa de BH ejemplar probada en los ejemplos y que demostró ser eficaz para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, en particular *E. coli.* Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, o un derivado de la misma, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en la presente.

Un derivado de la cepa depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada) de la original. Un derivado de una cepa de la invención puede modificarse, por ejemplo, a nivel genético, sin eliminar la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la invención es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá una actividad moduladora de la microbiota comparable a la cepa DSM 10507/14294 original. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables sobre las *Enterobacteriaceae* a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos. Un derivado de la cepa DSM 10507/14294 será generalmente un biotipo de la cepa DSM 10507/14294.

Las referencias a las células de la cepa *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso DSM 10507/14294, y tales células están abarcadas por la invención.

En realizaciones preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino.

Usos terapéuticos

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción del nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. Los niveles aumentados de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal están asociados con numerosas afecciones y enfermedades patológicas, y los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

En realizaciones preferidas de todos los aspectos de la invención, las *Enterobacteriaceae* son *E. coli.* Por lo tanto, preferiblemente las composiciones de la invención son para su uso en la reducción del nivel de *E. coli* en el tracto gastrointestinal.

En ciertas realizaciones, las *Enterobacteriaceae* son una cepa patógena, como *E. coli* O157:H7, O104:H4, 0121, 026, 0103, O111, 0145, O104:H21 o O104:H4.

En realizaciones alternativas, las *Enterobacteriaceae* son una cepa comensal o no patógena. Los niveles aumentados de tales *Enterobacteriaceae* pueden contribuir a afecciones como el SII y la enfermedad de Crohn, y los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden tener un efecto reductor sobre las *Enterobacteriaceae* en el contexto del SII.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con infección por *Enterobacteriaceae*, como infección por *E. coli*. En ciertas

realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. En tales realizaciones, las *Enterobacteriaceae* pueden ser una cepa patógena.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con niveles aumentados de *Enterobacteriaceae,* como *E. coli.* En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. En tales realizaciones, las *Enterobacteriaceae* pueden ser una cepa comensal o no patógena.

En algunas realizaciones, la patogénesis de la enfermedad o afección afecta al intestino. En algunas realizaciones, la patogénesis de la enfermedad o afección no afecta al intestino. En algunas realizaciones, la patogénesis de la enfermedad o afección no está localizada en el intestino. En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención tienen lugar en un sitio distinto del intestino. En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención tienen lugar en el intestino y también en un sitio distinto del intestino. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección es sistémica.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por *Enterobacteriaceae*, como infección por *E. coli*. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de infección del tracto gastrointestinal, y en particular el ciego. En tales realizaciones, las *Enterobacteriaceae* pueden ser una cepa patógena.

En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en las heces en el sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en una muestra de heces del sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en el intestino distal del sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en el ciego. En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en el colon. En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en el recto. En algunas realizaciones, el nivel de *Enterobacteriaceae* se reduce en el intestino delgado.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica que* tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO:5, para su uso en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* patógenas.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO:5, para su uso en el tratamiento de la infección por *E. coli*.

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción del nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, preferiblemente el nivel de *E. coli,* en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con niveles aumentados de *Enterobacteriaceae,* tales como SII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. Se sabe que las *Enterobacteriaceae,* y en particular *E. coli*, son desencadenantes potenciales, o se sabe que exacerban, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa [xxii-xxiv], por lo que el efecto mostrado en los ejemplos para las composiciones de la invención puede ser beneficioso en el tratamiento de estas afecciones.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de SII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal reduciendo el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención comprenden la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y son para su uso en la reducción del nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, o más preferiblemente SII. En realizaciones adicionales preferidas, las composiciones de la invención comprenden la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y son para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional o, lo más preferible, SII reduciendo el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

En ciertas realizaciones, la composición se administra en combinación con un antibiótico como una fluoroquinolona, azitromicina, ciprofloxacina o rifaximina. En ciertas realizaciones, la composición se administra en combinación con un tratamiento de deshidratación como una solución de rehidratación oral. La composición de la invención puede administrarse al mismo tiempo que el tratamiento con antibiótico o de deshidratación, o secuencialmente con el tratamiento con antibiótico o de deshidratación.

En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en pacientes que muestran, o se espera que muestren, niveles aumentados de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, cuando se comparan

con un sujeto sano, o una población de sujetos sanos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método para tratar, prevenir o reducir la colonización del tracto gastrointestinal por *Enterobacteriaceae.*

En algunas realizaciones, la composición de la invención es para su uso en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal en un sujeto que tiene un nivel aumentado de hidrógeno en su aliento en relación con un sujeto sano. En algunas realizaciones, la composición de la invención es para uso en la reducción del nivel de hidrógeno en el aliento de un sujeto que muestra o se espera que muestre un nivel aumentado de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. El sujeto es preferiblemente un sujeto diagnosticado con SII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal y/o una infección provocada por *Enterobacteriaceae* patógenas, por ejemplo, *E. coli.* Los ejemplos muestran que el tratamiento con una composición de la invención reduce el nivel de hidrógeno detectado en las pruebas de aliento de hidrógeno. Por consiguiente, los niveles de hidrógeno se evalúan preferiblemente usando una prueba de aliento de hidrógeno. La prueba de aliento de hidrógeno es bien conocida en la técnica y, por lo tanto, los expertos sabrán cómo realizar dicha prueba. En algunas realizaciones, al paciente se le administra lactulosa como el sustrato para la prueba.

La prueba de aliento de hidrógeno también es una herramienta útil para monitorizar la eficacia o la eficacia probable de reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* y de tratamiento o prevención usando una composición de la invención. Por ejemplo, una reducción en el nivel de hidrógeno detectado en el aliento de un sujeto después del tratamiento con una composición de la invención puede indicar que el tratamiento tiene un efecto reductor, terapéutico o preventivo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos y usos de la invención comprenden además monitorizar el nivel de hidrógeno en el aliento de un sujeto durante y/o después del tratamiento con una composición de la invención y, por lo tanto, evaluar la eficacia o la eficacia probable de reducción, tratamiento o prevención. Por ejemplo, los niveles de hidrógeno se pueden monitorizar una o más veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4), por ejemplo, incluso antes del tratamiento, al comienzo del tratamiento, durante el tratamiento, al final del tratamiento y/o después del tratamiento, como se desee. En algunas realizaciones, el nivel de hidrógeno en el aliento del sujeto al final y/o después del período de dosificación (durante el que se administra la composición al sujeto) se compara con el nivel al comienzo y/o antes del período de dosificación y una reducción en el nivel indica la eficacia o eficacia probable de la reducción, tratamiento o prevención. Por ejemplo, en realizaciones en las que el período de dosificación es de 16 días, puede ser deseable tomar mediciones en el día 1 y el día 16, o por ejemplo en el día 1, el día 2, el día 15 y el día 16. En algunas realizaciones, se toman varias mediciones y se obtiene la media de esas mediciones (por ejemplo, la media del día 1 y el día 2 y la media del día 15 y el día 16). En algunas realizaciones, una reducción de por lo menos 40 ppm en el Cmax de nivel de hidrógeno indica que la reducción, tratamiento o prevención es eficaz o probable que sea eficaz. En algunas realizaciones, el nivel de hidrógeno en el aliento del sujeto se mide solo una vez, por ejemplo, al final o después del tratamiento, y el descubrimiento de que el nivel está en o cerca de un nivel predeterminado es indicativo de que la reducción, el tratamiento o la prevención es probable que haya sido eficaz. La prueba de aliento de hidrógeno es un ensayo estándar y por tanto los niveles predeterminados se conocen en la técnica se conocen.

El tratamiento o la prevención pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Los niveles de *Enterobacteriaceae* pueden detectarse en las heces de un paciente, usando técnicas estándar, como las técnicas de qPCR usadas en los ejemplos.

Modos de administración

Preferiblemente, las composiciones de la invención han de administrarse al tracto gastrointestinal para permitir el suministro y/o la colonización parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención. Generalmente, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero pueden administrarse por vía rectal, intranasal o bucal o sublingual.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como una espuma, como un espray o un gel.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, como un supositorio rectal, por ejemplo, en forma de un aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (por ejemplo, suppocire, witepsol), glicero-gelatina, polietilenglicol, o composición de jabón de glicerina.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra al tracto gastrointestinal a través de un tubo, como un tubo nasogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG), o un puerto como un puerto de pared torácica que proporciona acceso al estómago,

yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o pueden administrarse secuencialmente como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención han de administrarse diariamente. Los ejemplos demuestran que la administración diaria proporciona colonización con éxito y beneficios clínicos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se administran regularmente, como diariamente, cada dos días o semanalmente, durante un período de tiempo prolongado, como durante por lo menos una semana, dos semanas, un mes, dos meses, seis meses., o un año. Los ejemplos demuestran que la administración de BH puede no dar como resultado una colonización permanente de los intestinos, por lo que la administración regular durante períodos de tiempo prolongados puede proporcionar mayores beneficios terapéuticos.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran durante 7 días, 14 días, 16 días, 21 días o 28 días o no más de 7 días, 14 días, 16 días, 21 días o 28 días. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran durante 16 días.

En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento de acuerdo con la invención se acompaña de una evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si no se logra el suministro de y/o la colonización parcial o total con la cepa de la invención, de tal manera que no se observa eficacia, o el tratamiento puede cesar si el suministro y/o la colonización parcial o total tienen éxito y se observa eficacia.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal gestante, por ejemplo, un mamífero como un humano para prevenir niveles elevados de desarrollo de *Enterobacteriaceae* en su hijo *en* el útero y/o después de que nazca.

Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente al que se la han diagnosticado niveles elevados de *Enterobacteriaceae* o una enfermedad o afección asociada con niveles elevados de *Enterobacteriaceae,* o que se ha identificado como que tiene riesgo de niveles elevados de *Enterobacteriaceae.* Las composiciones también pueden administrarse como una medida profiláctica para prevenir el desarrollo de niveles elevados de *Enterobacteriaceae* en un paciente sano.

Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente que se ha identificado que tiene una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener una colonización reducida o ausente por parte de *Blautia,* y en particular *Blautia hydrogenotrophica, Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae.*

Las composiciones de la invención pueden administrarse como un producto alimenticio, como un suplemento nutricional.

Generalmente, las composiciones de la invención son para el tratamiento de seres humanos, aunque pueden usarse para tratar animales incluyendo mamíferos monogástricos como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los animales. Si se administra a animales, se puede usar alimentación forzada oral.

En algunas realizaciones, el sujeto al que se va a administrar la composición es un humano adulto. En algunas realizaciones, el sujeto al que se va a administrar la composición es un niño humano.

Composiciones

Generalmente, la composición de la invención comprende bacterias como se define en las reivindicaciones. En realizaciones preferidas de la invención, la composición se formula en forma secada por congelación. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender gránulos o cápsulas de gelatina, por ejemplo cápsulas de gelatina dura, que comprenden una cepa bacteriana de la invención.

Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento bien establecido y la orientación relevante está disponible, por ejemplo, en las referencias [xxv-xxvii]. Los ejemplos demuestran que las composiciones de liofilizado son particularmente eficaces.

Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano activo vivo. Los ejemplos demuestran que los cultivos de las bacterias de la invención son terapéuticamente eficaces.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha inactivado, por ejemplo, no se ha inactivado por calor. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha matado, por ejemplo, no se ha matado por calor. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha atenuado, por ejemplo, no se ha atenuado por calor. Por ejemplo, en

algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha matado, inactivado y/o atenuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención está viva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viable y capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino.

En algunas realizaciones, la composición comprende una mezcla de cepas bacterianas vivas y cepas bacterianas que se han matado.

En realizaciones preferidas, la composición de la invención se encapsula para permitir el suministro de la cepa bacteriana al intestino. La encapsulación protege a la composición de la degradación hasta el suministro en la localización deseada mediante, por ejemplo, la ruptura con estímulos químicos o físicos, como la presión, la actividad enzimática o la disgregación física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Se puede usar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación ejemplares incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en superficies de portadores sólidos, auto-agregación por floculación o con agentes de reticulación, y contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. La orientación sobre la encapsulación que puede ser útil para preparar composiciones de la invención está disponible, por ejemplo, en las referencias [xxviii-xxix].

La composición puede administrarse por vía oral y puede estar en forma de un comprimido, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque las *Blautia* son anaerobias. Pueden incluirse otros ingredientes (como la vitamina C, por ejemplo), como captadores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar el suministro y/o la colonización parcial o total y la supervivencia *in vivo.* Alternativamente, la composición probiótica de la invención puede administrarse por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, como un producto lácteo fermentado a base de leche o suero de leche, o como un producto farmacéutico.

La composición puede formularse como un probiótico.

Una composición de la invención incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana de la invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso sobre un paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar como resultado el suministro y/o la colonización parcial o total del intestino del paciente.

Una dosis diaria adecuada de la bacteria, por ejemplo para un humano adulto, puede ser de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC); por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} UFC; en otro ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} UFC; en otro ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{11} UFC; en otro ejemplo, de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{10} UFC; en otro ejemplo, de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{11} UFC.

En ciertas realizaciones, la dosis de la bacteria es por lo menos de 10^9 células por día, como por lo menos 10^{10}, por lo menos 10^{11}, o por lo menos 10^{12} células por día.

En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{11} UFC/g, con respecto al peso de la composición; por ejemplo, de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{10} UFC/g. La dosis puede ser, por ejemplo, 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

Típicamente, un probiótico, como la composición de la invención, se combina opcionalmente con por lo menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico es generalmente un carbohidrato no digerible, como un oligo- o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no se degrada ni se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales como inulina y transgalacto-oligosacáridos.

En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 30% en peso, con respecto al peso total de la composición (por ejemplo, del 5 al 20% en peso). Los carbohidratos pueden seleccionarse del grupo que consiste de: fructo- oligosacáridos (o FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalt-oligosacáridos, pectinas, xilo-oligosacáridos (o XOS), quitosan-oligosacáridos (o COS), beta -glucanos, almidones modificados y resistentes de goma arábiga, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena y fibras de cítricos. En un aspecto, los prebióticos son los fructo-oligosacáridos de cadena corta (por simplicidad mostrados en la presente a continuación como FOSs-c.c); tales FOSs-c.c no son carbohidratos digeribles, obtenidos generalmente mediante la conversión de la azúcar de remolacha y que incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o portadores farmacéuticamente

aceptables. Ejemplos de tales excipientes adecuados se pueden encontrar en la referencia [xxx]. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [xxxi]. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del portador, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) de solubilización. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico, cisteína y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, por ejemplo, en algunas realizaciones el conservante se selecciona de benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión. Un ejemplo adicional de un portador adecuado es la sacarosa. Un ejemplo adicional de un conservante es la cisteína.

Las composiciones de la invención pueden formularse como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la invención, tal como en un suplemento nutricional. De manera similar, un producto alimenticio puede formularse para mejorar el sabor de la composición de la invención o para hacer que la composición sea más atractiva para consumir al ser más similar a un artículo alimenticio común, en lugar de a una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición de la invención se formula como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier producto a base de leche o suero de leche líquido o semisólido que tenga un contenido de grasa variable. El producto a base de leche puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche desnatada, leche entera, leche recombinada a partir de leche en polvo y suero de leche sin ningún procesamiento, o un producto procesado, como yogur, leche cuajada, cuajada, leche agria, leche entera agria, leche de mantequilla y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye las bebidas lácteas, como las bebidas de suero de leche, las leches fermentadas, las leches condensadas, las leches para bebés o niños; leches con sabores, helados; alimentos que contienen leche como los dulces.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención, como se define en las reivindicaciones, comprenden una o más cepas bacterianas del género *Blautia* y no contienen bacterias de ningún otro género, o que comprenden solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otro género.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención, como se definen en las reivindicaciones, contienen una única cepa o especie bacteriana y no contienen ninguna otra cepa o especie bacteriana. Tales composiciones pueden comprender solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de otras cepas o especies bacterianas. Tales composiciones pueden ser un cultivo que está sustancialmente libre de otras especies de organismos. En algunas realizaciones, tales composiciones pueden ser un liofilizado que está sustancialmente libre de otras especies de organismos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención, como se definen en las reivindicaciones, comprenden una o más cepas bacterianas del género *Blautia,* por ejemplo, una *Blautia hydrogenotrophica,* y no contienen ningún otro género bacteriano, o que comprenden solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otro género. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden *Blautia hydrogenotrophica,* y no contienen ninguna otra especie bacteriana, o comprenden solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra especie. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una única cepa de *Blautia hydrogenotrophica,* y no contienen ninguna otra cepa o especie bacteriana, o comprenden solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra cepa o especie.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden más de una cepa o especie bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden más de una cepa de la misma especie (por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 cepas) y, opcionalmente, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 cepas de la misma especie (por ejemplo, menos de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 cepas), y, opcionalmente, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden 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, o 31-50 cepas de la misma especie y, opcionalmente, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden más de una especie dentro del mismo género (por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 30, 35 o 40 especies), y, opcionalmente, no contienen bacterias de ningún otro género. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 especies dentro del mismo género (por ejemplo, menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 especies), y, opcionalmente, no

contienen bacterias de ningún otro género. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden 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, o 31-50 especies dentro del mismo género y, opcionalmente, no contienen bacterias de ningún otro género. La invención comprende cualquier combinación de lo anterior.

En algunas realizaciones, la composición comprende un consorcio microbiano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición comprende la cepa bacteriana *Blautia hydrogenotrophica* como se define en las reivindicaciones como parte de un consorcio microbiano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica* está presente en combinación con una o más (por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20) otras cepas bacterianas de otros géneros con las que puede vivir simbióticamente *In vivo* en el intestino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición comprende una cepa bacteriana de *Blautia hydroneotrophica* en combinación con una cepa bacteriana de un género diferente. En algunas realizaciones, el consorcio microbiano comprende dos o más cepas bacterianas obtenidas de una muestra de heces de un solo organismo, por ejemplo, un humano. En algunas realizaciones, el consorcio microbiano no se encuentra junto en la naturaleza. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el consorcio microbiano comprende cepas bacterianas obtenidas de muestras de heces de por lo menos dos organismos diferentes. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son de la misma especie, por ejemplo, dos humanos diferentes. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son un humano infante y un humano adulto. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son un mamífero humano y uno no humano.

En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende adicionalmente una cepa bacteriana que tiene las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, pero que no es la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, o que no es una *Blautia hydrogenotrophica* o que no es una *Blautia.*

En algunas realizaciones en las que la composición de la invención comprende más de una cepa, especie o género bacteriano, las cepas, especies o géneros bacterianos individuales pueden ser para administración separada, simultánea o secuencial. Por ejemplo, la composición puede comprender la totalidad de más de una cepa, especie o género bacteriano, o las cepas, especies o géneros bacterianos pueden almacenarse por separado y administrarse por separado, simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, las más de una cepa, especie o género bacteriano se almacenan por separado, pero se mezclan entre sí antes del uso.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana para su uso en la invención se obtiene de heces humanas adultas. En algunas realizaciones en las que la composición de la invención comprende más de una cepa bacteriana, todas las cepas bacterianas se obtienen de heces humanas adultas o si hay otras cepas bacterianas, están presentes solo en cantidades mínimas. Las bacterias pueden haberse cultivado después de obtenerse de heces adultas humanas y usarse en una composición de la invención.

En algunas realizaciones, la una o más cepas bacterianas de *Blautia* es/son el único agente(s) terapéuticamente activo en una composición de la invención. En algunas realizaciones, la(s) cepa(s) bacteriana(s) en la composición es/son el único agente(s) terapéuticamente activo en una composición de la invención.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden o no requerir aprobación de comercialización.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que dicha cepa bacteriana se liofiliza. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que dicha cepa bacteriana se seca por pulverización. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana se liofiliza o se seca por pulverización y en la que está viva. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana se liofiliza o se seca por pulverización y en la que es viable. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana se liofiliza o se seca por pulverización y en la que es capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana se liofiliza o se seca por pulverización y en la que es viable y capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino

En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada o secada por pulverización se reconstituye antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito en la presente.

Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana como se define en las reivindicaciones; y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente

aceptable; en la que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para reducir los niveles de *Enterobacteriaceae* y/o tratar un trastorno asociado con niveles elevados de *Enterobacteriaceae* cuando se administra a un sujeto con necesidad de ello; y en donde el trastorno está asociado con niveles elevados de *Enterobacteriaceae,* como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional o, más preferiblemente, SII o diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la cantidad de la cepa bacteriana es de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo con respecto a un peso de la composición.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la composición se administra a una dosis de 1 g, 3 g, 5 g o 10 g.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste de oral, rectal, subcutáneo, nasal, bucal y sublingual.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un portador seleccionado del grupo que consiste de lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol y sorbitol.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste de etanol, glicerol y agua.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste de almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorante de maíz, acacia, tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además por lo menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizante.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un conservante seleccionado del grupo que consiste de benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

En ciertas realizaciones, se proporciona la composición farmacéutica de la invención, en donde la composición no comprende ningún mineral, o más específicamente, no comprende ningún metal con un número atómico mayor que 33, por ejemplo, en donde la composición no comprende ningún mineral del grupo que consiste de selenio, molibdeno, tungsteno, compuestos de selenio, compuestos de molibdeno y compuestos de tungsteno.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que dicha cepa bacteriana está liofilizada.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde cuando la composición se almacena en un recipiente sellado a aproximadamente 4º C o aproximadamente 25º C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene un 50% de humedad relativa, por lo menos el 80% de la cepa bacteriana medida en unidades formadoras de colonias, permanece después de un período de por lo menos aproximadamente 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

En algunas realizaciones, la composición de la invención se proporciona en un recipiente sellado que comprende una composición como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el recipiente sellado es una bolsita o una botella. En algunas realizaciones, la composición de la invención se proporciona en una jeringuilla que comprende una composición como se describe en la presente.

La composición de la presente invención puede, en algunas realizaciones, proporcionarse como una formulación farmacéutica. Por ejemplo, la composición puede proporcionarse como un comprimido o cápsula. En algunas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina ("gel-cap").

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran por vía oral. La administración oral puede involucrar tragar, de tal manera que el compuesto se introduzca en el tracto gastrointestinal y/o la administración bucal, lingual o sublingual por medio de la cual el compuesto se introduce en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen tapones sólidos,

micropartículas sólidas, semisólidos y líquidos (incluyendo sistemas de múltiples fases o dispersos) como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi- o nanopartículas, líquidos (por ejemplo, soluciones acuosas), emulsiones o polvos; grageas (incluyendo las rellenas de líquido); goma de mascar; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; espráis y parches bucales/mucoadhesivos.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación entérica, es decir, una formulación gastro-resistente (por ejemplo, resistente al pH gástrico) que es adecuada para el suministro de la composición de la invención al intestino mediante administración oral. Las formulaciones entéricas pueden ser particularmente útiles cuando la bacteria u otro componente de la composición es sensible al ácido, por ejemplo, propenso a la degradación en condiciones gástricas.

En algunas realizaciones, la formulación entérica comprende un recubrimiento entérico. En algunas realizaciones, la formulación es una forma de dosificación con recubrimiento entérico. Por ejemplo, la formulación puede ser un comprimido con recubrimiento entérico o una cápsula con recubrimiento entérico, o similar. El recubrimiento entérico puede ser un recubrimiento entérico convencional, por ejemplo, un recubrimiento convencional para un comprimido, cápsula o similar para administración oral. La formulación puede comprender un recubrimiento de película, por ejemplo, una capa de película delgada de un polímero entérico, por ejemplo, un polímero insoluble en ácido.

En algunas realizaciones, la formulación entérica es intrínsecamente entérica, por ejemplo, gastro-resistente sin la necesidad de un recubrimiento entérico. Por tanto, en algunas realizaciones, la formulación es una formulación entérica que no comprende un recubrimiento entérico. En algunas realizaciones, la formulación es una cápsula hecha de un material termo-gelificante. En algunas realizaciones, el material termo-gelificante es un material celulósico, como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En algunas realizaciones, la cápsula comprende una cáscara que no contiene ningún polímero formador de película. En algunas realizaciones, la cápsula comprende una cáscara y la cáscara comprende hidroxipropilmetilcelulosa y no comprende ningún polímero formador de película (por ejemplo, ver [xxxii]). En algunas realizaciones, la formulación es una cápsula intrínsecamente entérica (por ejemplo, Vcaps® de Capsugel).

En algunas realizaciones, la formulación es una cápsula blanda. Las cápsulas blandas son cápsulas que, debido a las adiciones de ablandadores, como, por ejemplo, glicerol, sorbitol, maltitol y polietilenglicoles, presentes en la cáscara de la cápsula, tienen una cierta elasticidad y suavidad. Las cápsulas blandas pueden producirse, por ejemplo, a base de gelatina o almidón. Las cápsulas blandas a base de gelatina están disponibles comercialmente de varios proveedores. Dependiendo del método de administración, como por ejemplo, por vía oral o rectal, las cápsulas blandas pueden tener varias formas, pueden ser, por ejemplo, redondas, ovaladas, oblongas o en forma de torpedo. Las cápsulas blandas pueden producirse mediante procesos convencionales, como, por ejemplo, el proceso de Scherer, el proceso de Accogel o el proceso de gotitas o soplado.

Métodos de cultivo

Las cepas bacterianas para su uso en la presente invención pueden cultivarse usando técnicas de microbiología estándar como se detalla, por ejemplo, en las referencias [xxxiii-xxxv].

El medio sólido o líquido usado para el cultivo puede ser, por ejemplo, agar YCFA o medio YCFA. El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): Casitona (1,0 g), extracto de levadura (0,25 g), $NaHCO_3$ (0,4 g), cisteína (0,1 g), K_2HPO_4 (0,045 g), KH_2PO_4 (0,045 g), NaCl (0,09 g), $(NH4)_2SO_4$ (0,09 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,009 g), $CaCl_2$ (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), ácido *p*-aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) y piridoxamina (15 µg).

General

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, referencias [xxxvi- xliii], *etc.*

El término "comprende" abarca "incluye" así como "consiste", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico *x* es opcional y significa, por ejemplo, *x* ± 10%.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo en la comparación de las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. [xliv]. Una alineación preferida se determina por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, una matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se divulga en la ref. [xlv].

A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende numerosos pasos puede comprender pasos adicionales al principio o al final del método, o puede comprender pasos intermedios adicionales. Además, los pasos pueden combinarse, omitirse o realizarse en un orden alternativo, si es apropiado.

En la presente se describen varias realizaciones de la invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones resaltadas en la presente como adecuadas, típicas o preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando sean mutuamente excluyentes).

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo 1 - Administración de inóculos bacterianos en ratas que albergan microbiota intestinal de SII

Resumen

Las ratas se inocularon con la microbiota fecal de un sujeto con SII humano. A las ratas se les administró luego composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y se analizó la colonización por *Blautia hydrogenotrophica*.

Cepa

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

Composiciones y administración.

Liofilizado de BH: administrado por alimentación forzada oral
Solución de control administrada por alimentación forzada oral.

Ratas

Inoculadas con microbiota intestinal humana de un sujeto con SII.

Diseño del estudio

Día -14 - ratas inoculadas con microbiota intestinal humana de un sujeto con SII
Días 0 a 28 - dosis diaria de liofilizado de BH, o solución de control
Días 0, 14 y 28 - qPCR de la población de BH en muestras fecales

Resultados

La Figura 1 presenta los resultados de un análisis de qPCR de la población de BH en muestras fecales de ratas a las que se administró una solución de control (SII) o liofilizado de BH (SII + BH). Se observó un aumento en la población de BH en los días 14 y 28 en ratas que recibieron el liofilizado de BH, lo que confirma la colonización con éxito.

Conclusiones

La administración de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* llevo a una colonización con éxito.

***Ejemplo 2 - administración de liofilizado bacteriano a ratas sanas y efecto sobre* Enterobacteriaceae**

Se estudiaron los efectos de la administración de un liofilizado de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 en ratas HIM sanas y los resultados se informan en las Figuras 2-5. Detalles adicionales sobre los experimentos se proporcionan más arriba en las descripciones de las figuras. La Figura 2muestra que una dosis apropiada para BH en ratas es de 10^9 células por día o más. La figura 3 muestra que en estos experimentos

BH no colonizó permanentemente el tracto digestivo de la rata. La figura 4 muestra que la BH se encuentra principalmente en el ciego. Sorprendentemente, la Figura 5muestra que la administración de BH induce una reducción estadísticamente significativa de *Enterobacteriaceae* en heces de rata como se detecta por qPCR.

Ejemplo 3 - Administración de liofilizado bacteriano en un modelo de rata de SII

Se investigaron más a fondo los efectos de la administración de un liofilizado de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) DSM 10507/14294 sobre un modelo de rata con SII. Se inoculó a ratas libres de gérmenes con muestras fecales de pacientes de C-SII (con estreñimiento) o con U-SII (sin alterar). Los resultados se informan en la Figura 6 y detalles adicionales sobre los experimentos se proporcionan más arriba en las descripciones de las figuras. La Figura 6 confirma que la administración del liofilizado de BH provoca una reducción estadísticamente significativa en las *Enterobacteriaceae,* que es principalmente *E. coli.* Como era de esperar, también se observa un aumento en BH.

Ejemplo 4 -Comparación de* Blautia hydrogenotrophica *de la microbiota de los pacientes

Se realizó un ensayo clínico de Fase I en el que se administró *Blautia hydrogenotrophica*("Blautix", cepa depositada con el número de acceso DSM 10507/14294) a pacientes humanos con síndrome de intestino irritable (SII). A los pacientes se les administró Blautix durante un período de dosificación (días 1-16), siendo el período de reposo siendo el día 19-23. Se encontró el Blautix tanto seguro como bien tolerado. La *Blautia hydrogenotrophica* (Blautix) de la microbiota del paciente se midió el día 1, el día 16 y al final del estudio (EOS) con los siguientes resultados:

Tabla 1:

Paciente	**Tratamiento**	**Blautix día 1**		**Blautix día 16**		**Blautix EOS**	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Placebo	Sano	4.30E + 07	8.40E + 07	4.79E + 07	7.63E + 07	3.59E + 07	6.23E + 07
Blautix	Sano	2.92E + 07	2.25E + 07	6.35E + 07	1.02E + 08	2.58E + 07	3.34E + 07
Placebo	SII	3.58E + 07	3.45E + 07	2.44E + 07	3.13E + 07	2.09E + 07	2.47E + 07
Blautix	SII	3.17E + 07	6.28E + 07	8.53E + 07	1.57E + 08	3.71E + 07	5.56E + 07

El análisis muestra tendencias en los niveles de *Blautia hydrogenotropica* en muestras de heces de pacientes (ver Figura 7a). Los participantes que reciben Blautix tienen niveles aumentados de bacterias en sus muestras de heces después del período de dosificación (día 16). Esto demuestra el suministro con éxito de Blautix al intestino. Los niveles vuelven a la normalidad después del período de reposo (Fin del estudio; EOS). Por tanto, Blautix no coloniza permanentemente el intestino una vez que cesa la dosificación. Ambas observaciones concuerdan con el modelo pre-clínico.

Ejemplo 5 - Comparación de* Enterobacteriaceae *de la microbiota de los pacientes.

Las Enterobacteriaceae de la microbiota de los pacientes también se midieron durante el ensayo clínico de Fase I el día 1, el día 16 y al final del estudio con los siguientes resultados:

Paciente	**Tratamiento**	**Enterobacteriaceae Día 1**		**Enterobacteriaceae Día 16**		**Enterobacteriaceae EOS**	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Placebo	Sano	5.89E + 08	1.00E + 09	3.32E + 08	6.26E + 08	2.85E + 08	4.28E + 08
Blautix	Sano	9.96E + 08	1.06E + 09	4.87E + 08	6.64E + 08	2.70E + 08	3.76E + 08
Placebo	SII	7.85E + 08	1.28E + 09	3.01E + 08	4.92E + 08	2.45E + 09	2.45E + 09
Blautix	SII	8.38E + 09	1.96E + 10	1.12E + 09	1.45E + 09	6.17E + 08	9.91E + 08

El análisis muestra tendencias en los niveles de Enterobacteriaceae en muestras de heces de pacientes (ver Figura 7b). Los pacientes con SII tratados con Blautix tuvieron una reducción de las Enterobacteriaceae. Esto es consistente con las observaciones del modelo preclínico.

Ejemplo 6 - Resultados de la prueba de aliento de hidrógeno

Los niveles de hidrógeno del aliento son un biomarcador de la actividad Blautix - MoA implica el metabolismo de H_2 endógeno para producir acetato. A los sujetos humanos se les administró lactulosa y se muestrearon los niveles de hidrógeno (H_2) (Cmax) en cuatro puntos temporales: día 1, día 2, día 15 y día 16. Los resultados no corregidos con hidrógeno se convirtieron a resultados corregidos con hidrógeno.

Algunos pacientes se excluyeron del análisis. Hubo tres razones por las que un sujeto no se incluyó en el análisis de la prueba de aliento de hidrógeno: 1) Produjeron un resultado de prueba de aliento de hidrógeno CMAX de <20 en uno de los cuatro días de muestreo y, por lo tanto, se consideró que no habían respondido a la prueba; 2) Eran productores de metano (entendido como que producían más metano que hidrógeno en la prueba de aliento), esto afecta la respuesta del hidrógeno; y/o 3) hubo un valor aberrante obtenido en la prueba de aliento de hidrógeno (232 ppm). Los sujetos 3.12 (Blautix), 3.24 (Blautix), 4.07 (Blautix) fueron excluidos como no respondedores. Los sujetos 3.03 (Blautix) y 3.08 (Placebo) fueron excluidos como productores de metano (4.07, mencionado como excluido anteriormente, también era un productor de metano). El sujeto 4.09 (Placebo) se excluyó debido a un valor aberrante.

Los resultados del análisis de hidrógeno corregido desde el final del período de dosificación (día 15/16) se compararon con los del valor de referencia (día 1/2). 10 de los 12 pacientes (83%) que recibieron Blautix tuvieron una reducción en los niveles de hidrógeno durante este período (Figura 8a y 8c). Por el contrario, 3 de 6 (50%) pacientes que recibieron placebo tuvieron niveles de hidrógeno reducidos (Figura 8b y 8c).

La Figura 9 muestra los resultados de hidrógeno no corregidos y corregidos para el grupo de tratamiento con Blautix (Verum) junto con un análisis estadístico de los resultados. Se encontró que los valores medios tanto de H_2 no corregido como corregido difieren entre el día 1 y el día 15. Después de 13,5 días de tratamiento, se detectó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de H_2 en Cmax de la prueba de aliento después de la estimulación con lactulosa. Por el contrario, para el grupo placebo, se encontró que la media era equivalente para el día 1 y el día 15 ($p > 0,05$) (Figura 10). Por lo tanto, la media para el grupo de tratamiento (también referido como el grupo VERUM), disminuye entre el día 1 y el día 15, mientras que la media para el grupo de placebo es equivalente entre el día 1 y el día 15 tanto para los resultados de hidrógeno no corregidos como para los resultados de hidrógeno corregidos (Figura 11).

Ejemplo 7 - Pruebas de estabilidad

Una composición descrita en la presente que contiene por lo menos una cepa bacteriana descrita en la presente se almacena en un recipiente sellado a 25º C o 4º C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%. 75%, 80%, 90% o 95% de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, permanecerá por lo menos el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la cepa bacteriana como se mide en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

Ejemplo 8 - La capacidad de B. hydrogenotrophica para alterar la microbiota en el modelo de rata asociado a microbiota humana (rata HMA)

Resumen

Se inocularon grupos de 16 ratas libres de gérmenes (que comprenden 8 ratas en el grupo control y 8 ratas en el grupo de tratamiento) con la microbiota fecal de un sujeto con SII humano (ratas SII-HMA). Se llevaron a cabo tres experimentos sucesivos usando muestras fecales de 3 pacientes con SII diferentes. Otros dos grupos de ratas (n = 10) se inocularon con muestras fecales de sujetos sanos (n = 2 sujetos; 2 grupos de ratas HMA sanas) como control. Por tanto, había 24 ratas asociadas con microbiota de SII (control), 24 ratas asociadas con microbiota de SII tratadas con Blautix y 20 ratas asociadas con microbiota sana. La mitad de las ratas SII-HMA se administraron durante 28 días con una composición que comprende la cepa bacteriana de *B. hydrogenotrophica* de acuerdo con la invención, mientras que la otra mitad de los animales recibió una solución de control. El día 28 después de la administración, se analizaron los niveles de microorganismos de la microbiota fecal, que se habían encontrado previamente afectados en pacientes con SII.

Cepa

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

Composición y administración

El liofilizado de BH se suspendió en solución mineral estéril a una concentración de 10^{10} bacterias por ml. Dos ml de esta suspensión se administraron diariamente por rata SII-HMA, por alimentación forzada oral, durante un período de 28 días.

La solución de control fue la solución mineral estéril que se administró diariamente (2 ml por rata) por alimentación forzada oral al grupo de control de ratas SII-HMA.

Ratas

Se inocularon ratas Fisher macho libres gérmenes (de 10 semanas de edad) con microbiota fecal humana de un sujeto con SII (ratas SII-HMA). Se inocularon dieciséis ratas con el mismo inóculo fecal humano. Se realizaron tres experimentos sucesivos con muestras fecales de tres sujetos con SII diferentes. Otros dos grupos de ratas se inocularon con una muestra fecal de 2 sujetos sanos (grupos de control de sensibilidad normal).

Diseño del estudio

Día -14 - Inoculación de ratas libres de gérmenes con microbiota fecal humana.
Días 0 a 28 - Dosis diaria de liofilizado de BH (grupo de ensayo) o solución de control (grupo de control) mediante alimentación forzada oral
Días 0, 14 y 28 - Recogida de muestras fecales para análisis microbiano: qPCR para evaluar la población de BH y otros grupos comensales de microorganismos y enumeración de grupos funcionales de microorganismos usando medios selectivos y método estrictamente anaeróbico.

Resultados

La **Figura 12** presenta los resultados del análisis qPCR de la población de *B. hydrogenotrophica* en muestras fecales de ratas SII-HMA que recibieron una solución de control o liofilizado de BH. Se observó un aumento significativo en la población de BH al final del período de administración (D 28) en ratas que recibieron el liofilizado de BH, lo que confirma la administración con éxito de BH en el colon.

La **Figura 13** informa sobre el efecto de la administración de *B.hydrogenotrophica* sobre ciertos microorganismos en la microbiota fecal, que anteriormente se había encontrado afectada en pacientes con SII. El nivel de especies de *Enterobacteriaceae* disminuyó después de *la* administración de *B. hydrogenotrophica*.

Conclusiones

La administración de *Blautia hydrogenotrophica* dio como resultado a una reducción de las *Enterobacteriaceae.*

Ejemplo 9 - Cambios en los síntomas de los pacientes durante el ensayo clínico de Fase I

Se realizó un ensayo clínico de Fase I en el que se administró *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", cepa depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294) a pacientes humanos que tenían síndrome del intestino irritable (SII). A los pacientes se les administró Blautix durante un período de dosificación (días 1-16), siendo el período de reposo siendo el día 19-23. Se encontró que el Blautix era tanto seguro como bien tolerado. Se monitorizaron cuatro síntomas, de los cuales uno era diarrea. El estudio registró si los pacientes experimentaron una mejora, ningún cambio o empeoramiento de cada uno de estos síntomas. Los resultados de los pacientes a los que se administró Blautix se compararon con los obtenidos usando pacientes a los que se les administró un placebo. Los síntomas fueron monitorizados en tres puntos temporales: día 1, día 15/16 y al final del estudio. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15.

Cuando los síntomas informados por los pacientes en el día 16 se compararon con los valores de referencia del día 1, el 82% de los 17 pacientes con SII que recibieron Blautix informaron de una mejora en los síntomas (Figura 14). La mejora de los síntomas, de los cuales uno era diarrea, apoya el uso de Blautix para tratar o prevenir la diarrea.

El 50% de los pacientes que recibieron placebo informaron de una mejora de los síntomas (Figura 14). Las altas tasas de respuesta al placebo son un fenómeno establecido en los estudios clínicos de SII. El Xifaxan se aprobó recientemente para tratar el SII ben base a mejoras mucho más pequeñas que el placebo (ver: http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d.xml).

Se espera un empeoramiento de los síntomas al finalizar el estudio (día 19-23) en comparación con los síntomas presentes tras finalizar la dosificación (día 16) en base a las enseñanzas presentadas en al presente. Este empeoramiento de los síntomas se observó en el ensayo clínico de Fase I: el 41% de los pacientes con SII informaron de un empeoramiento de los síntomas después del cese de la dosificación con Blautix (Figura 15). El empeoramiento de los síntomas, uno de los cuales es la diarrea, después del cese de la dosificación con Blautix, también apoya el uso de Blautix para tratar o prevenir la diarrea.

Secuencias

SEQ ID NO: 1 (gen de ARN 16S ribosómico de la cepa GAM6-1 de *Blautia stercoris*, secuencia parcial - HM626177)

```
   1 tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
  61 gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
 121 ggctgctaat accgcataag cgcacggtat cgcatgatac agtgtgaaaa actccggtgg
 181 tatgagatgg acccgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggcccac caaggcgacg
 241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc
 301 ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc
 361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
 421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggggcga
 481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
 541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag
 601 gtaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
 661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
 721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg ggagcaaagc
 781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
 841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag
 901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
 961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt
1021 gggttaagtc ccgcaacgag cgcaacccct atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg
1321 ggtcttgtac acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc
```

SEQ ID NO:2 (gen de ARN 16S ribosómico de la cepa WAL 14507 de *Blautia wexlerae*, secuencia parcial - EF036467)

```
   1 caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
  61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
 181 aagatggacc cgcgttggat tagcttgttg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
 601 agcggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
 661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
```

```
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
 901 acgcgaagaa ccttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatctttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg
1021 gttaagtccc gcaacgagcg caacccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcact
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 cggtgaatac gttcccgggt
1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt
```

SEQ ID NO:3 (Secuencia de ARNr 16S de consenso para cepa 830 de *Blautia stercoris*)

```
TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACA
GTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
CCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG
TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCCAGGACTGCATTGG
AAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCAA
TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTCGTAATGGAACCTT
TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
AAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
AAGCGAGCCCGCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
GGGTGAAGTCTAGGGGGT
```

SEQ ID NO:4 (secuencia de ARNr 16S de consenso para la cepa MRX008 de *Blautia wexlerae*)

```
TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTTAT
ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAAACTC
CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG
GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAG
```

CGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
GTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
CCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGA
TCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
GGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO:5 (gen de ARN ribosómico 16S de la cepa S5a36 de *Blautia hydrogenotrophica*, secuencia parcial - X95624.1)

```
   1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
  61 tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaat accgcataag cgcacagctt
 181 cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcgttg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcggtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcggtgc cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca
 901 caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca
1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct
1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg
1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggtcttgta cacaccgccc gtcacaccat
1381 gggagtcagt aacgcccgaa gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtgg
1441 gactgataac tggggtga
```

REFERENCIAS

[i] Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol. 9(4):279-90.
[ii] Eckburg et al. (2005) Science. 10;308(5728):1635-8.
[iii] Tap et al. (2009), Environ Microbiol, 11(10):2574-84.

[iv] Macpherson et al. (2001) Microbes Infect. 3(12):1021-35
[v] Macpherson et al. (2002) Cell Mol Life Sci. 59(12):2088-96.
[vi] Mazmanian et al. (2005) Cell 15;122(1):107-18.
[vii] Frank et al. (2007) PNAS 104(34):13780-5.
[viii] Scanlan et al. (2006) J Clin Microbiol. 44(11):3980-8.
[ix] Kang et al. (2010) Inflamm Bowel Dis. 16(12):2034-42.
[x] Machiels et al. (2013) Gut. 63(8):1275-83.
[xi] Lopetuso et al. (2013), Gut Pathogens, 5: 23
[xii] WO 2013/050792
[xiii] WO 03/046580
[xiv] WO 2013/008039
[xv] WO 2014/167338
[xvi] Lee and Lee (2014) World J Gastroenterol. 20(27): 8886-8897.
[xvii] Liu et al. (2008) Int J Syst Evol Microbiol 58, 1896-1902.
[xviii] Bernalier et al. (1996) Arch. Microbiol. 166 (3), 176-183.
[xx] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.
[xxi] Srutková et al. (2011) J. Microbiol. Methods, 87(1):10-6.
[xxii] Darfeuille-Michaud et al. (2004) Gastroenterology 127(2):412-21.
[xxiii] Strus et al. (2015) Cent Eur J Immunol.40(4):420-30.
[xxiv] Petersen et al. (2015) Scand J Gastroenterol.;50(10):1199-207.
[xxv] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) J. Gen. Appl. Microbiol., 54, 9-24.
[xxvi] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. por Day and McLellan, Humana Press.
[xxvii] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.
[xxviii] Mitropoulou et al. (2013) JNutr Metab. (2013) 716861.
[xxix] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
[xxx] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade and PJ Weller
[xxxi] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
[xxxii] US 2016/0067188
[xxxiii] Handbook of Microbiological Media, Cuarta Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
[xxxiv] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
[xxxv] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
[xxxvi] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
[xxxvii] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
[xxxviii] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
[xxxix] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
[xl] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
[xli] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
[xlii] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
[xliii] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
[xliv] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Suplemento 30
[xlv] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> 4D PHARMA PLC

<120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS

<130> P068687WO

<141> 2017-03-06

<150> GB 1612190.7
<151> 2016-07-13

<150> GB 1616018.6
<151> 2016-09-20

<150> GB 1616016.0
<151> 2016-09-20

<150> GB 1703548.6
<151> 2017-03-06

<150> GB 1703552.8
<151> 2017-03-06

<160> 5

<170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1
<211> 1372
<212> ADN
<213> Blautia stercoris

<400> 1

tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg 60
gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac 120
ggctgctaat accgcataag cgcacggtat cgcatgatac agtgtgaaaa actccggtgg 180
tatgagatgg acccgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggcccac caaggcgacg 240
atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc 300
ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc 360
gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt 420
acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggggcga 480
agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg 540
aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag 600
gtaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc 660
gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg 720
attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg ggagcaaagc 780
tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg 840
aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag 900
caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt 960
ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1020
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaacccct atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc 1080
actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat 1140
gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc 1200
gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac 1260
tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg 1320
ggtcttgtac acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc 1372

<210> 2
<211> 1438
<212> ADN
<213> Blautia wexlerae

<220>
<221> n
<222> 19
<223> 'n' es a, c, g o t

<400> 2

caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg 60
gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc 120
tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat 180
aagatggacc cgcgttggat tagcttgttg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc 240
catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta 300
cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg 360
tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtacc 420
tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc 480
gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa 540
ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta 600
agcggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa 660
ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 720
agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca 780
ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa 840
actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca 900
acgcgaagaa ccttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatctttcc 960
ttcgggacag gcgagacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg 1020
gttaagtccc gcaacgagcg caacccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcact 1080
ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc 1140
ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg 1200
agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac 1260
acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cggtgaatac gttcccgggt 1320
cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac 1380
tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt 1438

<210> 3
<211> 1481
<212> ADN
<213> Blautia stercoris

<220>
<221> k
<222> 4
<223> 'k' es g o t

<400> 3

tttkgtctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgagcgaagc 60
gcttacgaca gaaccttcgg gggaagatgt aagggactga gcggcggacg ggtgagtaac 120
gcgtgggtaa cctgcctcat acagggggat aacagttgga aacggctgct aataccgcat 180
aagcgcacag tatcgcatga tacagtgtga aaaactccgg tggtatgaga tggacccgcg 240
tctgattagc tagttggagg ggtaacggcc caccaaggcg acgatcagta gccggcctga 300
gagggtgaac ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt 360
ggggaatatt gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgac gccgcgtgaa ggaagaagta 420
tctcggtatg taaacttcta tcagcaggga agaaaatgac ggtacctgac taagaagccc 480
cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg gcaagcgtta tccggattta 540
ctgggtgtaa agggagcgta gacggaagag caagtctgat gtgaaaggct ggggcttaac 600
cccaggactg cattggaaac tgttttcttt gagtgccgga gaggtaagcg gaattcctag 660
tgtagcggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt ggcgaaggcg gcttactgga 720
cggtaactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag 780
tccacgccgt aaacgatgaa tactaggtgt tggggagcaa agctcttcgg tgccgcagca 840
aacgcaataa gtattccacc tggggagtac gttcgcaaga atgaaactca aaggaattga 900
cggggacccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttattcga agcaacgcga agaaccttac 960
caagtcttga catcgatctg accggttcgt aatggaacct ttccttcggg acagagaaga 1020
caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 1080
agcgcaaccc ctatcgtcag tagccagcag gtaaagctgg gcactctgag gagactgcca 1140
gggataacct ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgatttgggc 1200

tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgagc ccgcgagggg gagcaaatcc 1260
caaaaataac gtcccagttc ggactgcagt ctgcaactcg actgcacgaa gctggaatcg 1320
ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc 1380
cgtcacacca tgggagtcag taacgcccga agtcagtgac ccaaccttag ggagggagct 1440
gccgaaggcg ggattgataa ctggggtgaa gtctaggggg t 1481

<210> 4
<211> 1384
<212> ADN
<213> Blautia wexlerae

<220>
<221> n
<222> 749
<223> 'n' es a, c, g o t

<400> 4

ttcattgaga cttcggtgga tttagattct atttctagtg gcggacgggt gagtaacgcg 60
tgggtaacct gccttataca gggggataac agtcagaaat ggctgctaat accgcataag 120
cgcacagagc tgcatggctc agtgtgaaaa actccggtgg tataagatgg acccgcgttg 180
gattagcttg ttggtggggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag 240
ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtggg 300
gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct 360
cggtatgtaa acttctatca gcagggaaga tagtgacggt acctgactaa gaagccccgg 420
ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggggggca agcgttatcc ggatttactg 480
ggtgtaaagg gagcgtagac ggtgtggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg 540
tggactgcat tggaaactgt catacttgag tgccggaggg gtaagcggaa ttcctagtgt 600
agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggct tactggacgg 660
taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc 720
acgccgtaaa cgatgaatac taggtgtcng gggagcatgg ctcttcggtg ccgtcgcaaa 780
cgcagtaagt attccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg 840
gggacccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 900
aagtcttgac atccgcctga ccgatcctta accggatctt tccttcggga caggcgagac 960
aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga 1020
gcgcaacccc tatcctcagt agccagcatt taaggtgggc actctgggga gactgccagg 1080
gataacctgg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg atttgggcta 1140
cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagatc gtgagatgga gcaaatccca 1200
aaaataacgt cccagttcgg actgtagtct gcaacccgac tacacgaagc tggaatcgct 1260
agtaatcgcg gatcagaatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac acaccgcccg 1320
tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tcagtgacct aactgcaaag aaggagctgc 1380
cgaa 1384

<210> 5
<211> 1458
<212> ADN
<213> Blautia hydrogenotrophica

<220>
<221> n
<222> 1416
<223> 'n' es a, c, g o t

<400> 5

gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga 60
tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct 120
gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaat accgcataag cgcacagctt 180
cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcgttg gattagctag 240
ttggtgaggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc 300
cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca 360
caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa 420
acttctatca gcagggaaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt 480
gccagcagcc gcggtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg 540
gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat 600

tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa 660
tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt 720
tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa 780
cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcggtgc cgcagcaaac gcaataagta 840
ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca 900
caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac 960
atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca 1020
tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1080
tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg 1140
gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc 1200
tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg 1260
tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320
gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggtcttgta cacaccgccc gtcacaccat 1380
gggagtcagt aacgcccgaa gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtgg 1440
gactgataac tggggtga 1458

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica que* tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO: 5, para su uso en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* patógenas en el tracto gastrointestinal.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que las *Enterobacteriaceae* son *E. coli.*

3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición es para su uso en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal en el tratamiento o prevención del SII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal.

4. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición es para su uso en el tratamiento o prevención de diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal.

5. Una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica que* tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO: 5, para su uso en el tratamiento de infecciones provocadas por *Enterobacteriaceae* patógenas en el tracto gastrointestinal.

6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en donde la infección provocada por *Enterobacteriaceae* patógenas es una infección por *E. coli*.

7. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en la que la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:5 o que tiene la secuencia de ARNr 16s de la SEQ ID NO:5.

8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia hydrogenotrophica que* tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO:5, para su uso en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* patógenas en el tracto gastrointestinal en un sujeto diagnosticado con SII.

9. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es para administración oral.

10. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

11. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la cepa bacteriana está liofilizada.

12. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la cepa bacteriana es viable.

13. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende una única cepa.

14. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, que comprende la cepa bacteriana *Blautia hydrogenotrophica* como parte de un consorcio microbiano.

15. Un producto alimenticio que comprende la composición de cualquier reivindicación anterior, para el uso de cualquier reivindicación anterior.

FIG. 1

Medición de población de BH mediante q-PCR

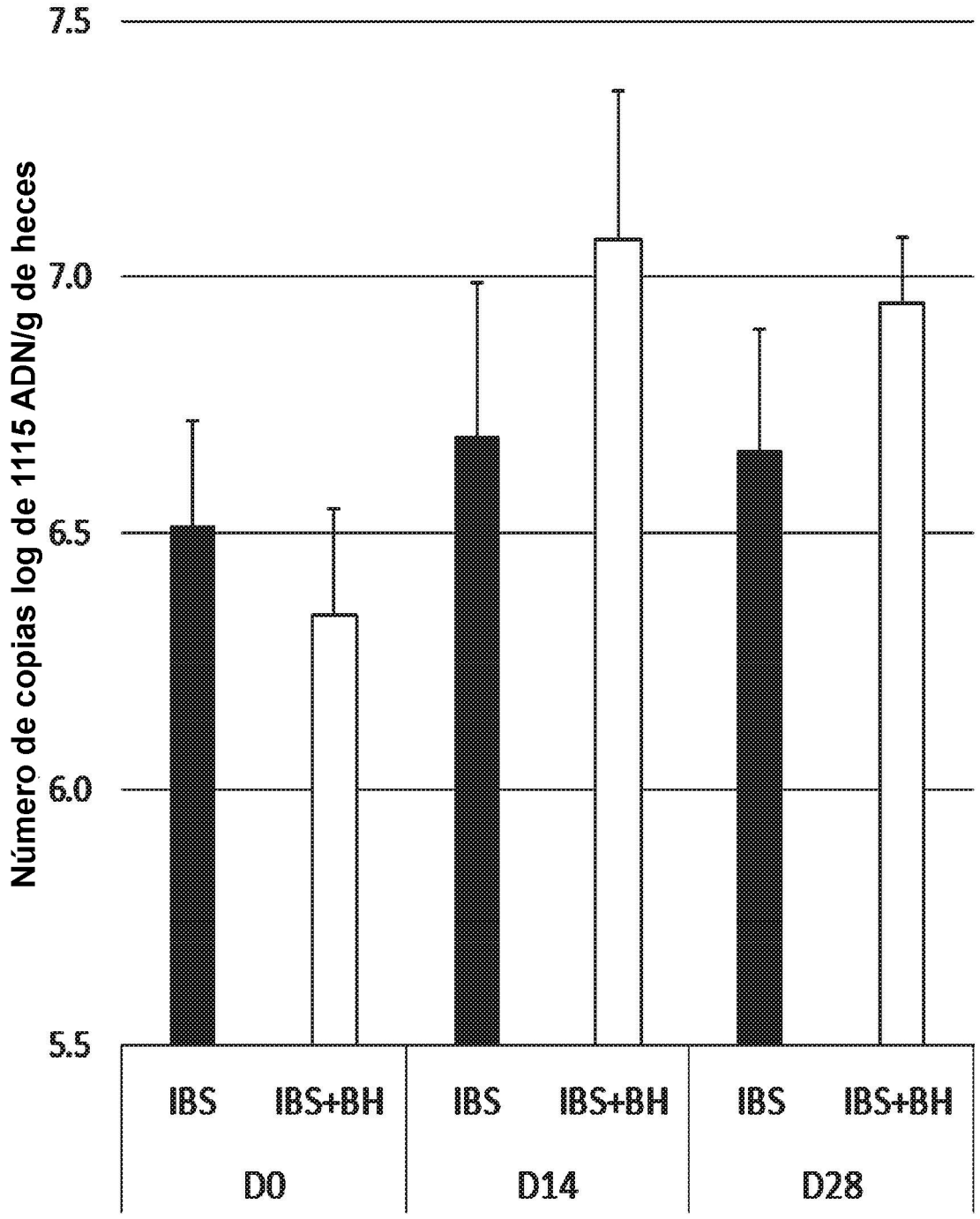


FIG. 2

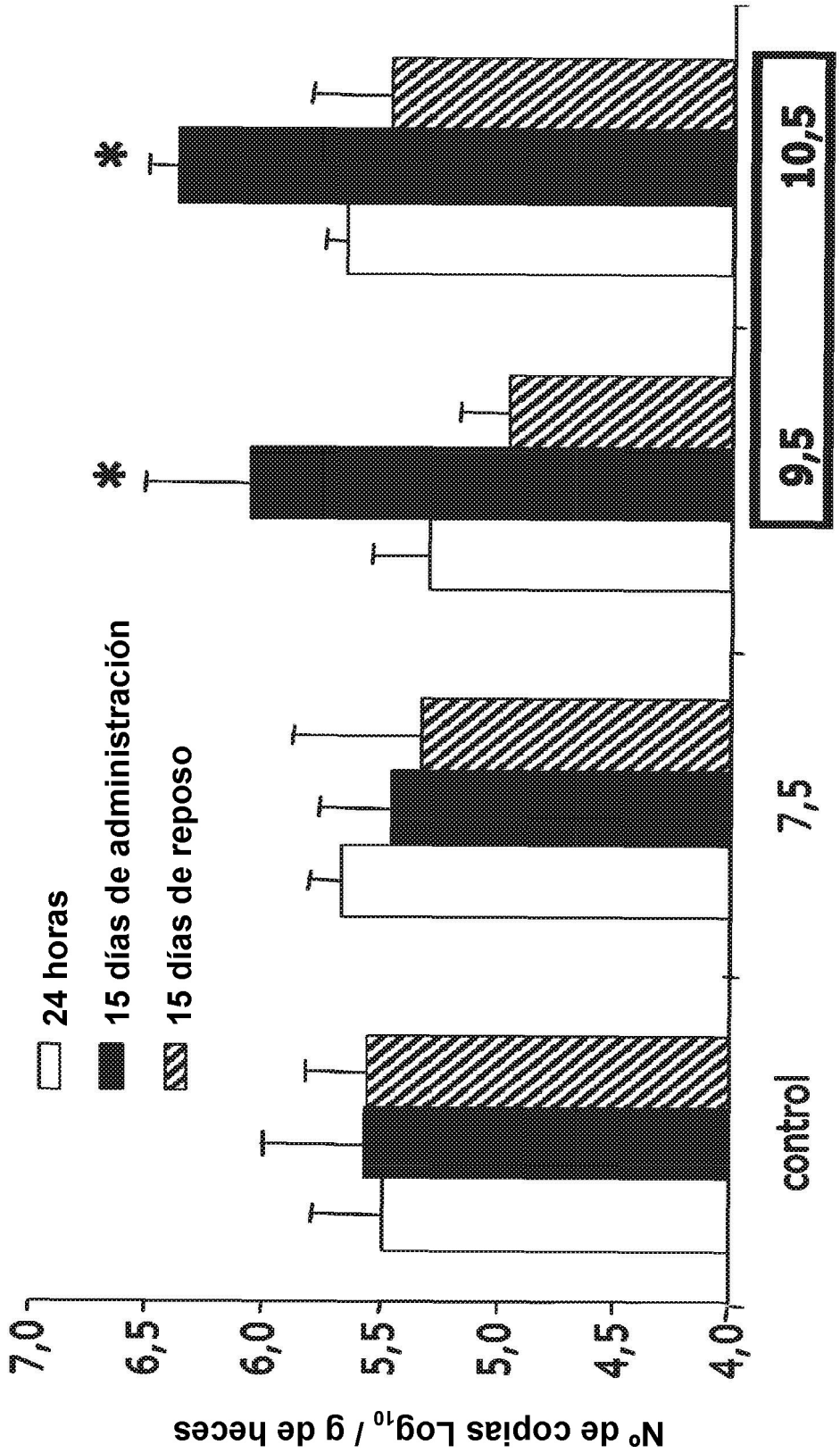

24 horas
15 días de administración
15 días de reposo
Nº de copias Log10 / g de heces
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
4,5
4,0
control
7,5
9,5
10,5
*
*
B. hydrogenotrophica administrada (log10 por ml)

FIG. 3

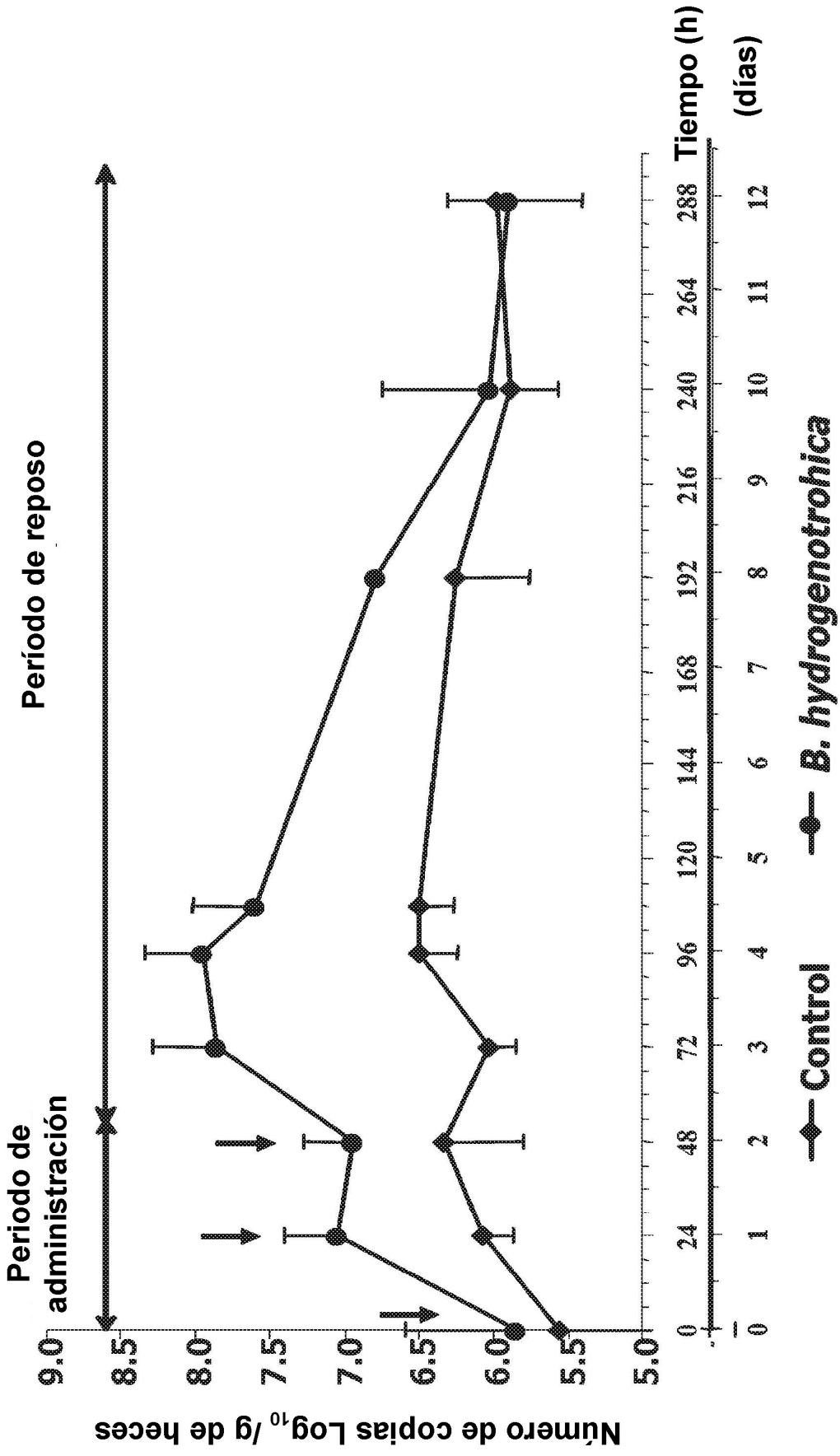

Período de reposo
Periodo de administración
Número de copias Log10 /g de heces
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
240
264
288
Tiempo (h)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
(días)
Control
B. hydrogenotrohica

FIG. 4

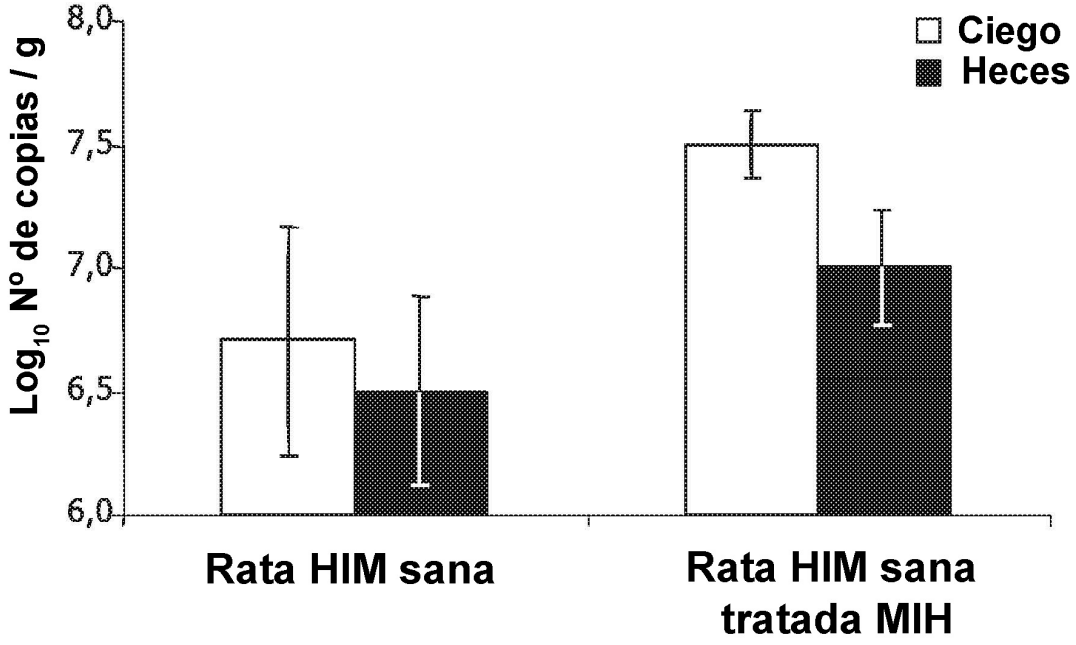

8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
Log10 Nº de copias / g
Ciego
Heces
Rata HIM sana
Rata HIM sana tratada MIH

FIG. 6

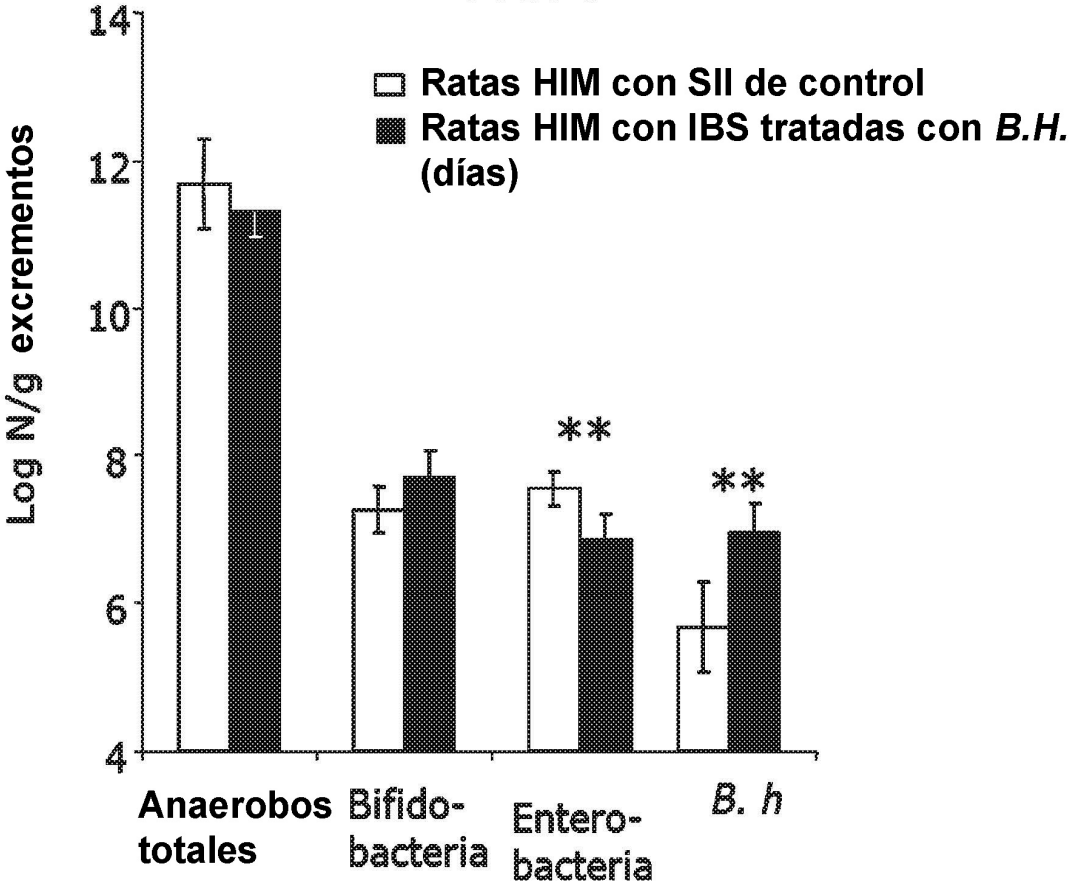
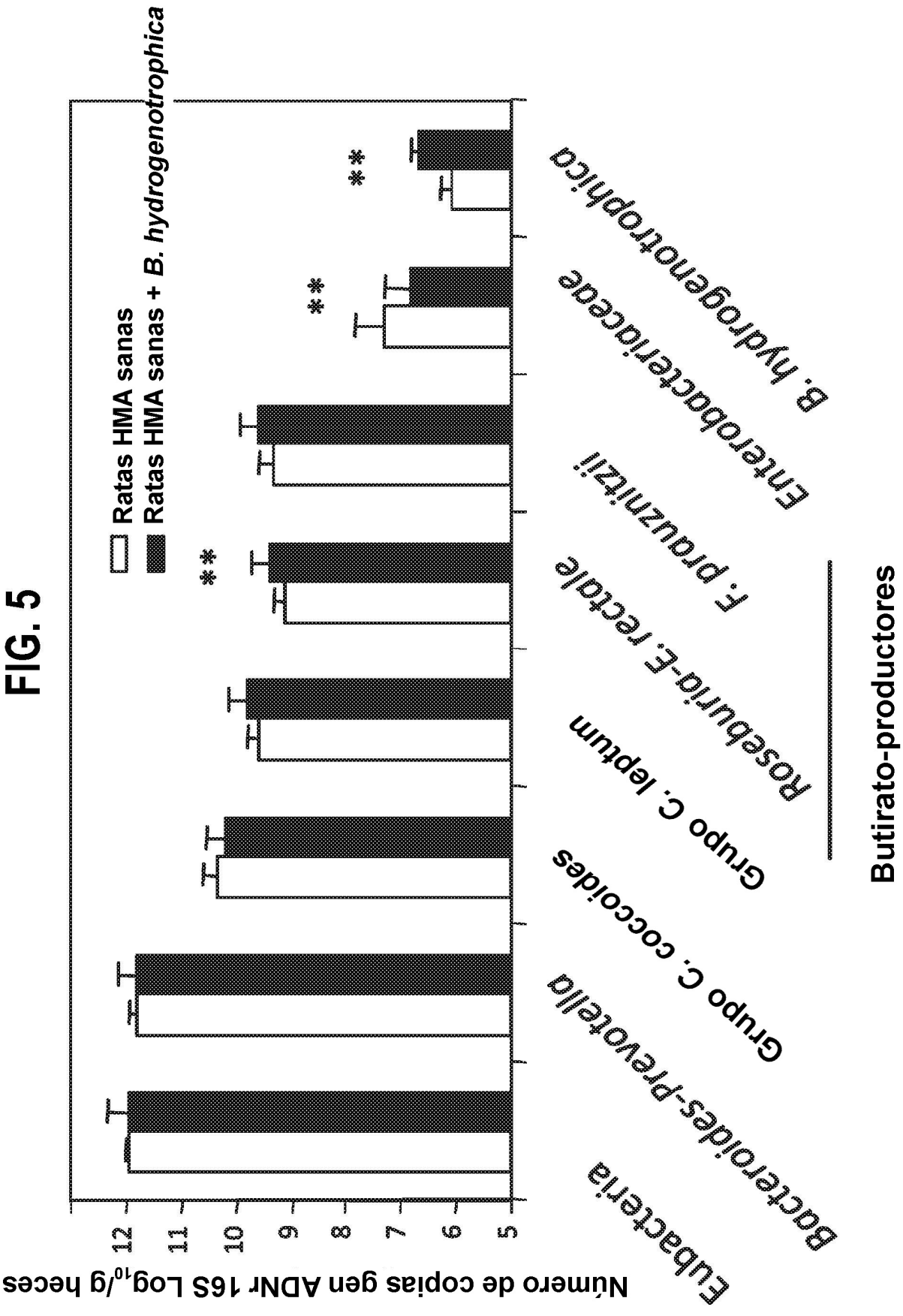

14
12
10
8
6
4
Log N/g excrementos
Ratas HIM con SII de control
Ratas HIM con IBS tratadas con B.H.
(días)
**
**
Anaerobos totales
Bifido-bacteria
Entero-bacteria
B. h

FIG. 5


Ratas HMA sanas
Ratas HMA sanas + B. hydrogenotrophica
Número de copias gen ADNr 16S Log10/g heces
12
11
10
9
8
7
6
5
**
**
**
Eubacteria
Bacteroides-Prevotella
Grupo C. coccoides
Grupo C. leptum
Roseburia-E. rectale
F. prausnitzii
Enterobacteriaceae
B. hydrogenotrophica
Butirato-productores

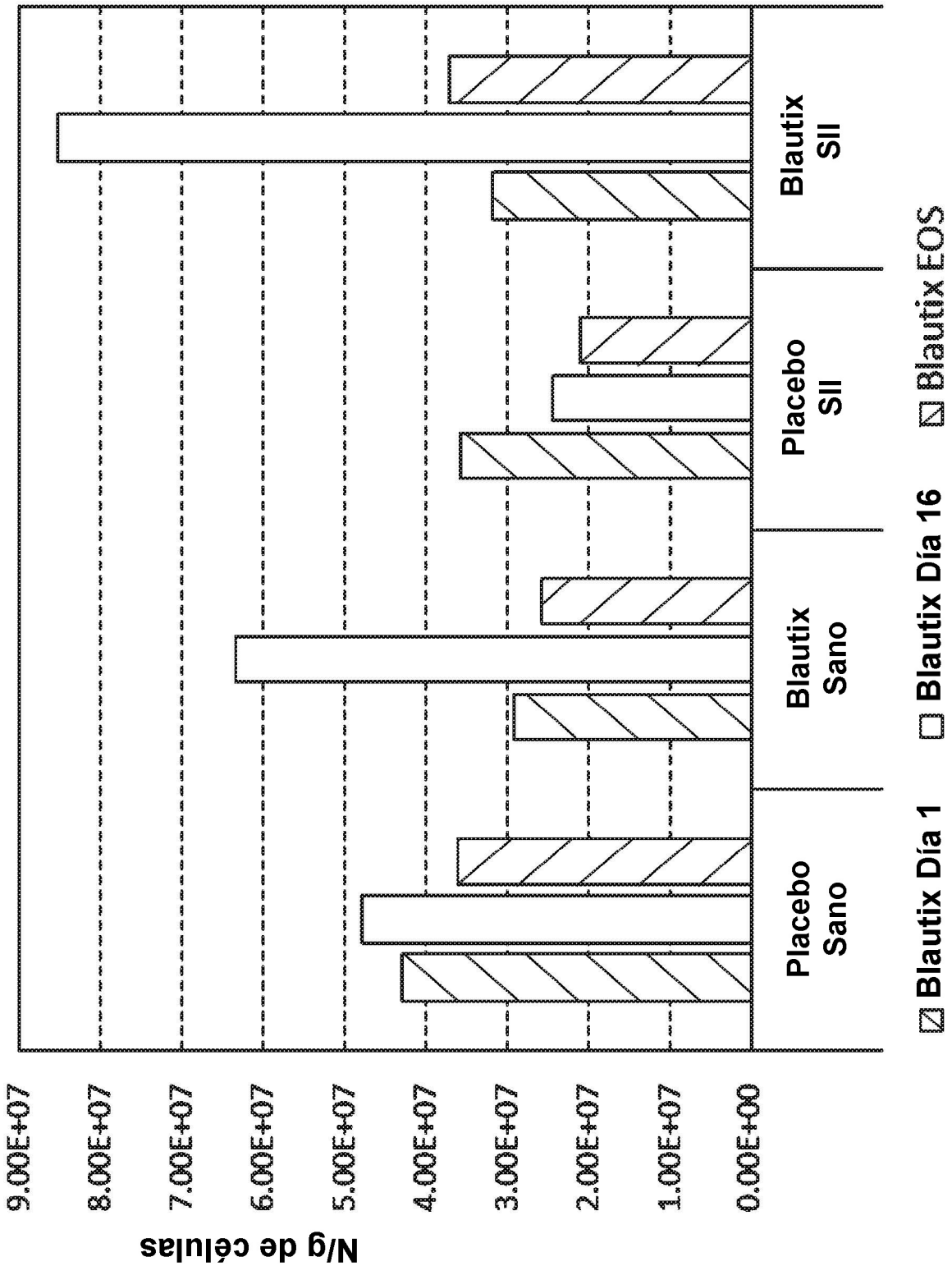

9.00E+07
8.00E+07
7.00E+07
6.00E+07
5.00E+07
4.00E+07
3.00E+07
2.00E+07
1.00E+07
0.00E+00
N/g de células
Placebo Sano
Blautix Sano
Placebo SII
Blautix SII
Blautix Día 1
Blautix Día 16
Blautix EOS

FIG. 7a

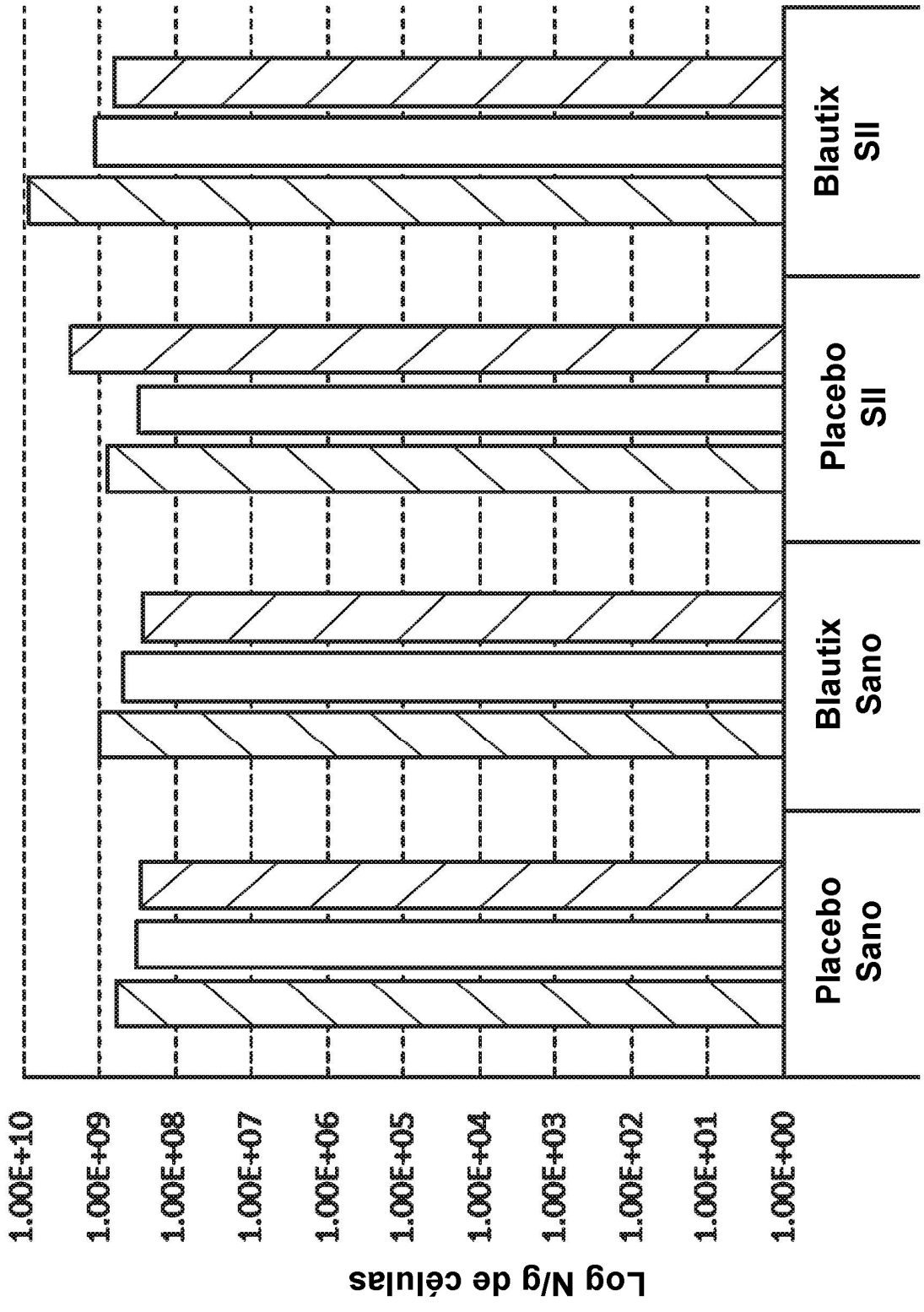

Log N/g de células
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
Placebo Sano
Blautix Sano
Placebo SII
Blautix SII
Enterobacteria Día 1
Enterobacteria Día 16
Enterobacteria EOS

FIG. 7b

FIG. 8a Blautix 10/12 muestra reducción en hidrógeno (83%)

	DIA 1	DIA 2	MEDIA	DIA 15	DIA 16	MEDIA		DIF
ID de Paciente	CMAX	CMAX		CMAX	CMAX			CMAX
3.02	123.0	94.0	108.5	34.0	74.0	54.0		-54.5
3.04	70.0	32.0	51.0	25.0	46.0	35.5		-15.5
3.05	163.0	116.0	139.5	167.0	111.0	139.0		-0.5
3.07	71.0	69.0	70.0	46.0	80.0	63.0		-7.0
3.09	121.0	76.0	98.5	66.0	65.0	65.5		-33.0
3.11	75.0	98.0	86.5	128.0	76.0	102.0		15.5
3.13	118.0	41.0	79.5	85.0	59.0	72.0		-7.5
3.15	155.0	99.0	127.0	63.0	87.0	75.0		-52.0
3.17	134.0	210.0	172.0	139.0	107.0	123.0		-49.0
3.19	72.0	53.0	62.5	87.0	85.0	86.0		23.5
3.21	144.0	139.0	141.5	75.0	126.0	100.5		-41.0
3.22	59.0	71.0	65.0	55.0	34.0	44.5		-20.5
Media	108.8	91.5	100.1	80.8	79.2	80.0		-20.1
SD	37.3	48.4		43.5	26.7			26.2
Mediana	119.5	85.0		70.5	78.0			-18.0
							Pacientes con reducción en H_2	10 (83%)

ES 2 719 837 T3

FIG. 8b Placebo 3/6 muestra reducción en hidrógeno (50%)

	DIA 1	DIA 2	MEDIA		DIA 15	DIA 16	MEDIA		DIF
ID de Paciente	CMAX	CMAX			CMAX	CMAX			CMAX
3.06	126.0	91.0	108.5		86.0	131.0	108.5		0.0
3.10	124.0	168.0	146.0		107.0	88.0	97.5		-48.5
3.14	55.0	79.0	67.0		53.0	68.0	60.5		-6.5
3.16	98.0	123.0	110.5		123.0	151.0	137.0		26.5
3.23	58.0	113.0	85.5		79.0	99.0	89.0		3.5
4.13	58.0	69.0	63.5		25.0	38.0	31.5		-32.0
MEDIA	86.5	107.2	96.8		78.8	95.8	87.3		-9.5
SD	33.8	36.0	31.2		35.7	41.2	37.0		26.8
MEDIANA	78.0	102.0	97.0		82.5	93.5	93.3		-3.3
						Pacientes con reducción en H_2			3 (50%)

FIG. 8c

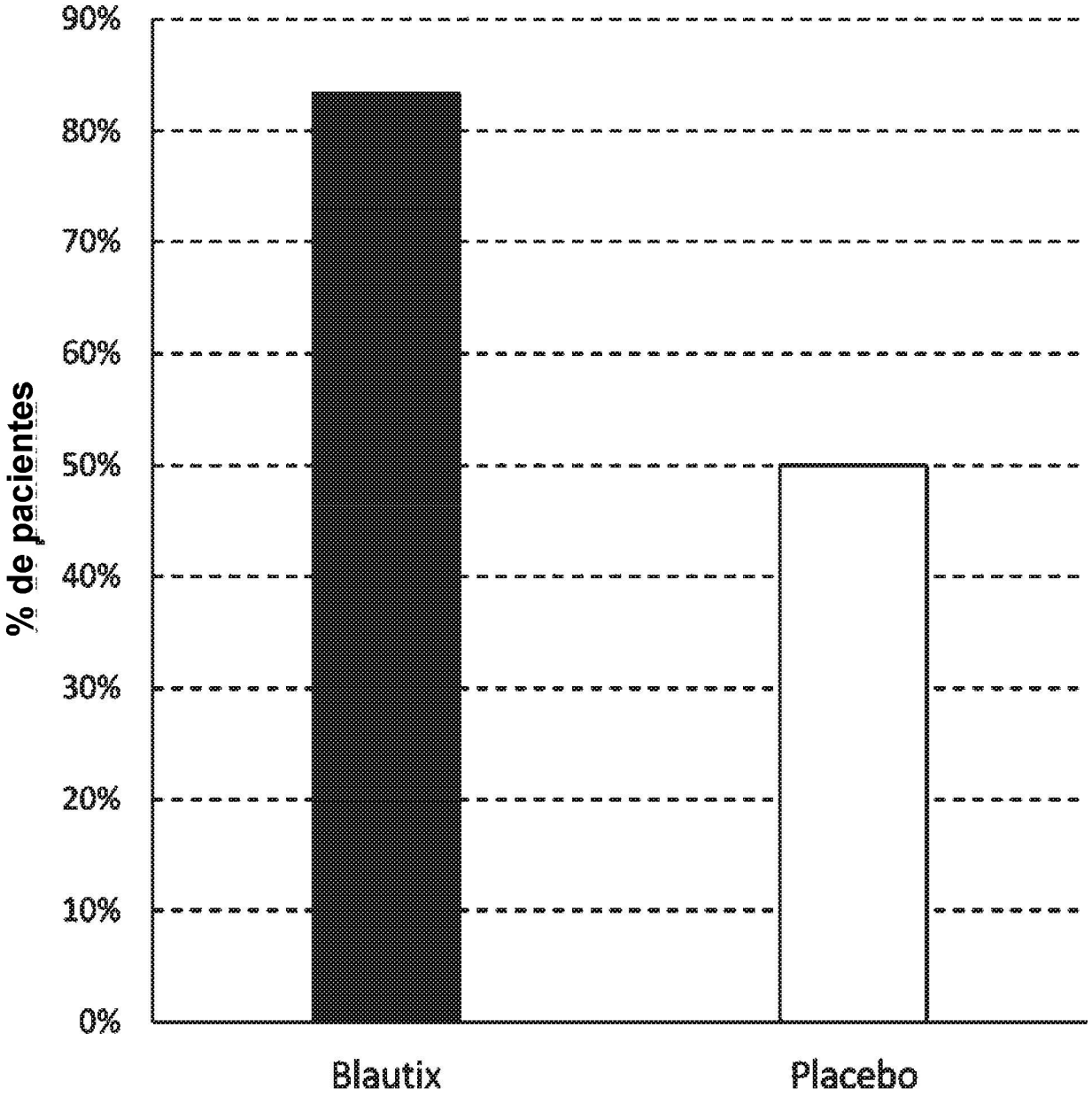


FIG. 9a

grupo VERUM

ALEATORIO	DIA 1	DIA 15			Corregido con H2	ALEATORIO	DIA 1	DIA 15	
NUMERO	CMAX	CMAX				NUMERO	CMAX	CMAX	
3.02	89.8	23.0				3.02	123.0	34.0	
3.04	68.0	21.0				3.04	70.0	25.0	
3.05	130.4	112.8				3.05	163.0	167.0	
3.07	56.8	37.6				3.07	71.0	46.0	
3.09	96.8	52.8				3.09	121.0	66.0	
3.11	63.0	104.9				3.11	75.0	128.0	
3.12	12.3	38.7				3.12	16.0	53.0	
3.13	110.3	82.5				3.13	118.0	85.0	
3.15	115.7	53.8				3.15	155.0	63.0	
3.17	97.8	83.7				3.17	134.0	139.0	
3.19	51.1	66.1				3.19	72.0	87.0	
3.21	144.0	71.4				3.21	144.0	75.0	
3.22	52.7	43.9				3.22	59.0	55.0	
3.24	27.1	26.7				3.24	29.0	27.0	
		Prueba T unilateral	0.02032643					Prueba T unilateral	0.04798585
	Día 1	Día 15					Día 1	Día 15	
MEDIA	79.7	58.5				MEDIA	96.4	75.0	
SD	38.7	29.5				SD	46.5	43.0	
N	14	14				N	14	14	
MEDIANA	78.9	53.3				MEDIANA	96.5	64.5	
MIN	12.3	21.0				MIN	16.0	25.0	
MAX	144.0	112.8				MAX	163.0	167.0	

FIG. 9b

No corregido con hidrógeno

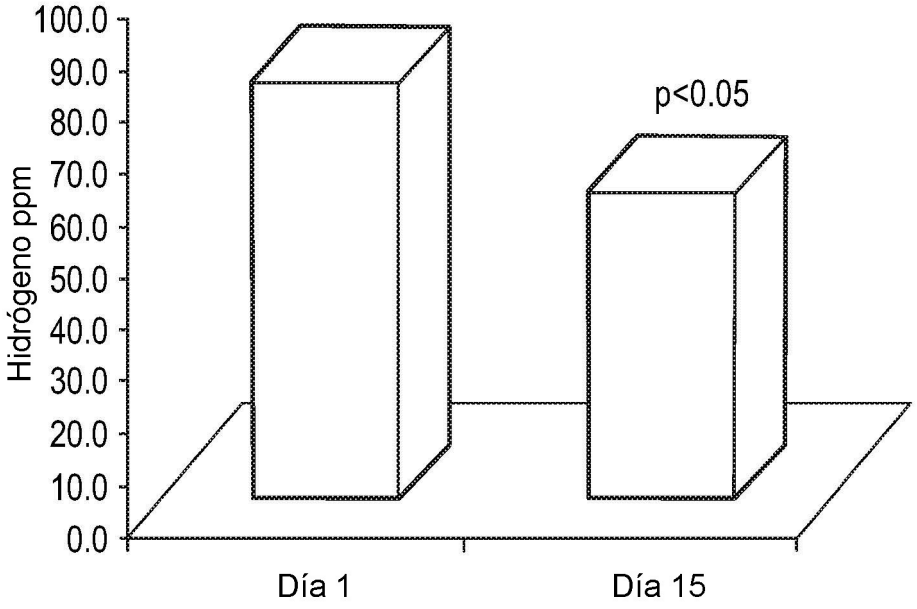


FIG. 9c

Corregido con hidrógeno

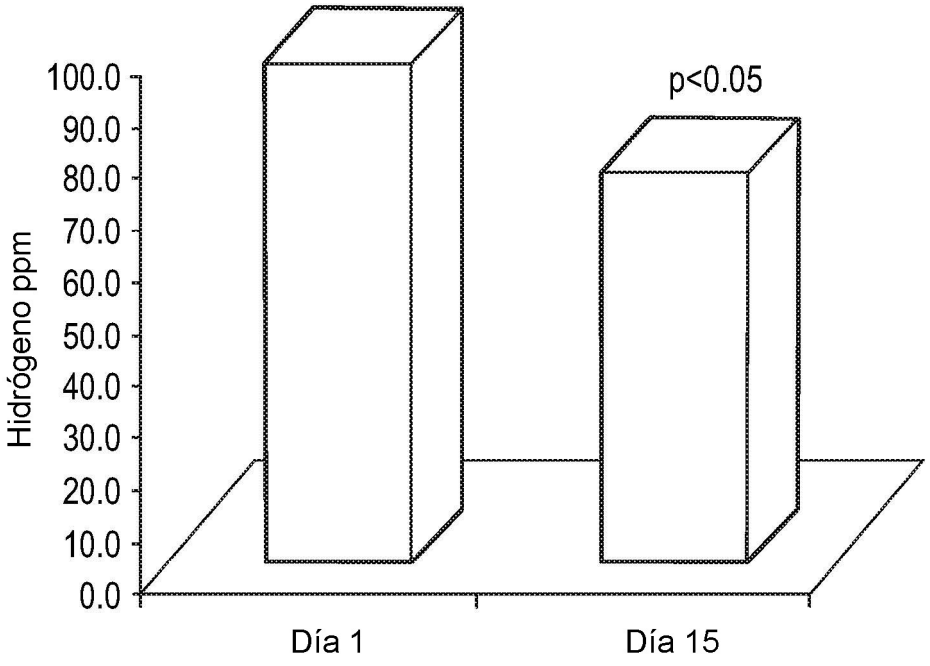


FIG. 10a

Grupo PLACEBO

ALEATORIO	DIA 1	DIA 15			corregido con H2	ALEATORIO	DIA 1	DIA 15	
NUMERO	CMAX	CMAX				NUMERO	CMAX	CMAX	
3.06	103.3	81.9				3.06	126.0	86.0	
3.08	42.3	43.3				3.08	55.0	58.0	
3.10	97.6	84.3				3.10	124.0	107.0	
3.14	35.0	42.4				3.14	55.0	53.0	
3.16	59.0	80.9				3.16	98.0	123.0	
3.23	41.1	62.2				3.23	58.0	79.0	
4.13	53.2	25.0				4.13	58.0	25.0	
		Prueba T unilateral	0.41620609					Prueba T unilateral	0.27096549
	DIA 1	DIA 15					DIA 1	DIA 15	
MEDIA	61.7	60.0				MEDIA	82.0	75.9	
SD	27.7	23.5				SD	33.1	33.5	
N	7	7				N	7	7	
MEDIANA	53.2	62.2				MEDIANA	58.0	79.0	
MIN	35.0	25.0				MIN	55.0	25.0	
MAX	103.3	84.3				MAX	126.0	123.0	

ES 2 719 837 T3

FIG. 10b

Placebo no corregido con hidrógeno

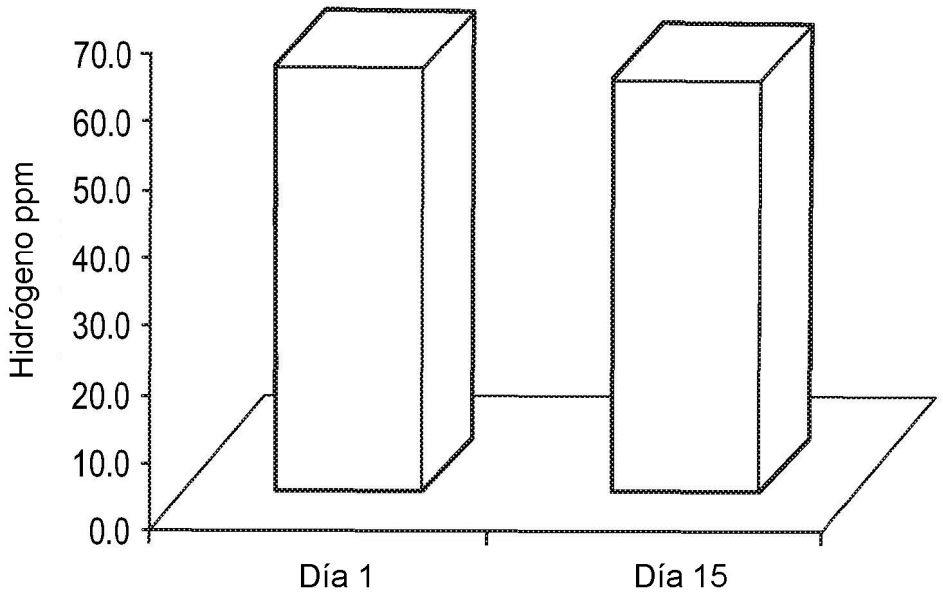


FIG. 10c

Placebo corregido con hidrógeno

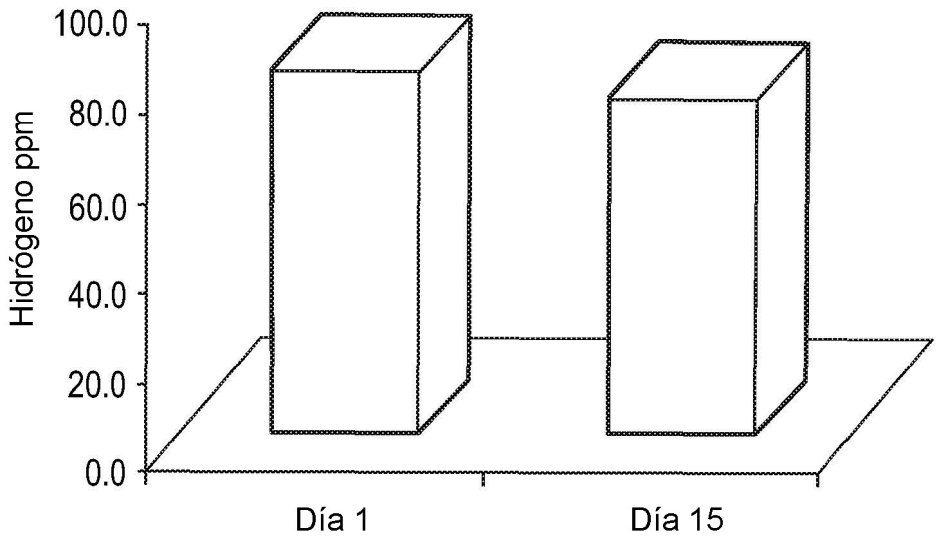


FIG. 11a

	DIA 1	DIA 15	N
Grupo VERUM	79.7	58.5	14
Grupo PLACEBO	61.7	60	7

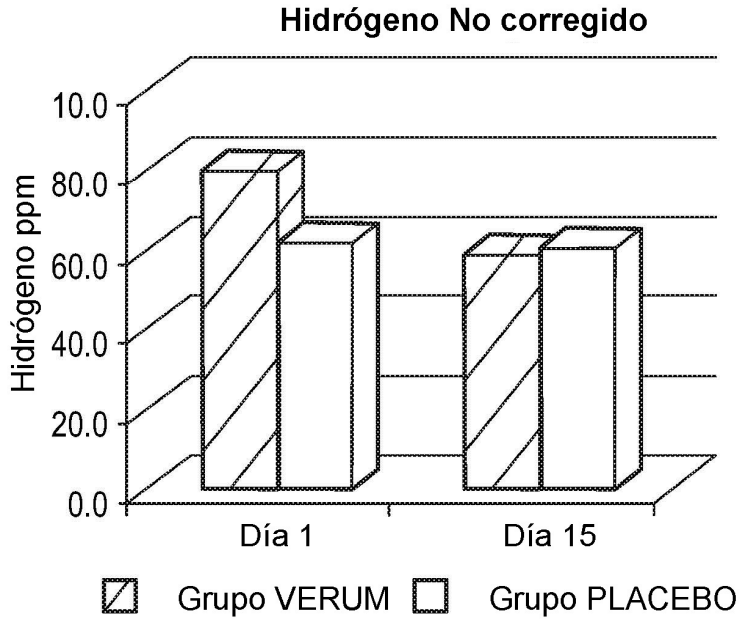


FIG. 11b

	DIA 1	DIA 15	N
Grupo VERUM	96.4	75	14
Grupo PLACEBO	82	75.9	7

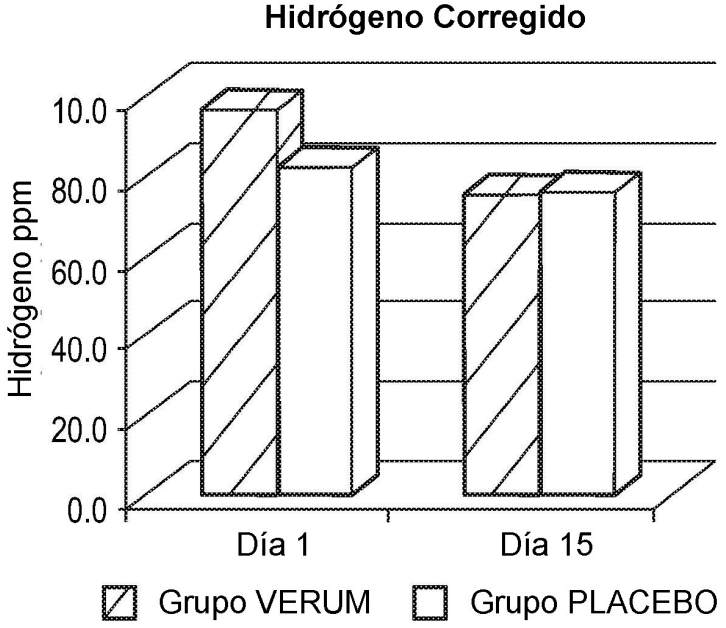


FIG. 12

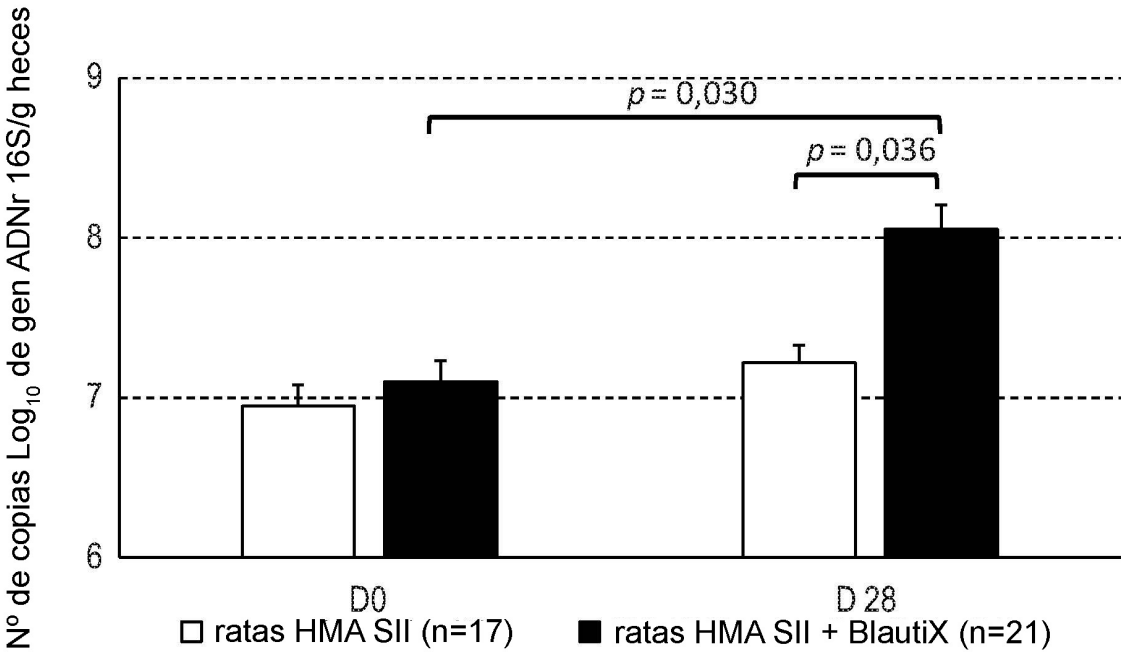

Nº de copias Log10 de gen ADNr 16S/g heces
9
8
7
6
p = 0,030
p = 0,036
D0
D 28
ratas HMA SII (n=17)
ratas HMA SII + BlautiX (n=21)

FIG. 13

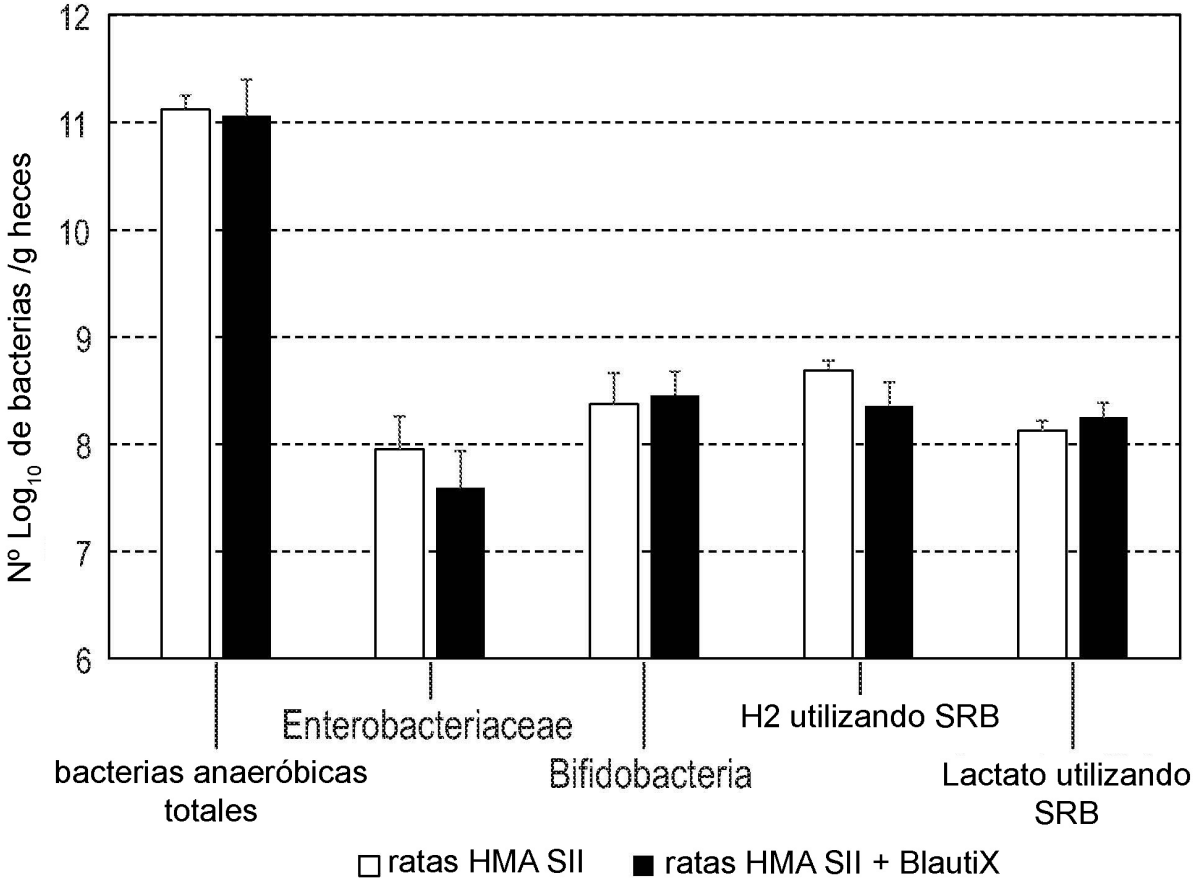

Nº Log10 de bacterias /g heces
12
11
10
9
8
7
6
bacterias anaeróbicas totales
Enterobacteriaceae
Bifidobacteria
H2 utilizando SRB
Lactato utilizando SRB
ratas HMA SII
ratas HMA SII + BlautiX

FIG. 14

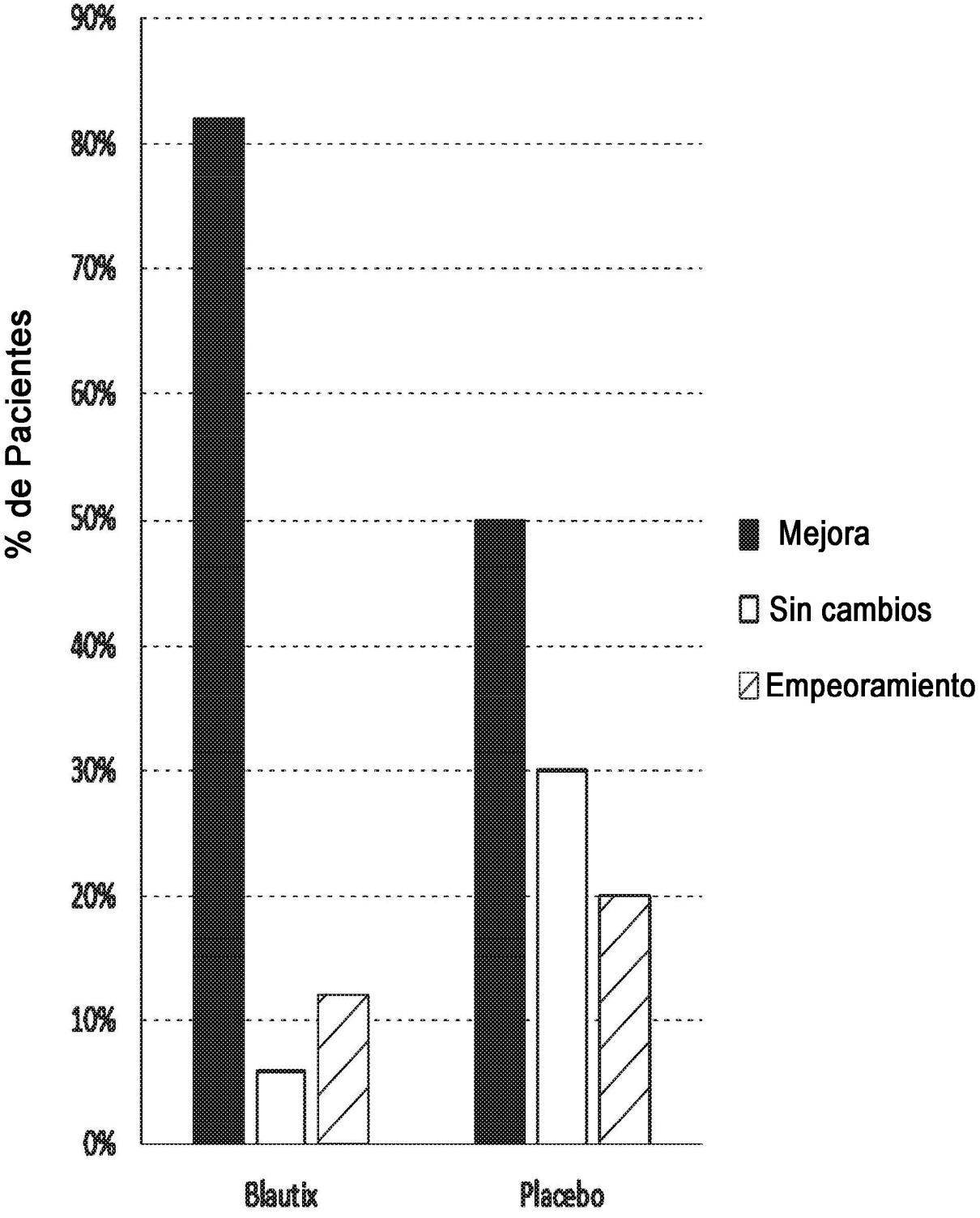
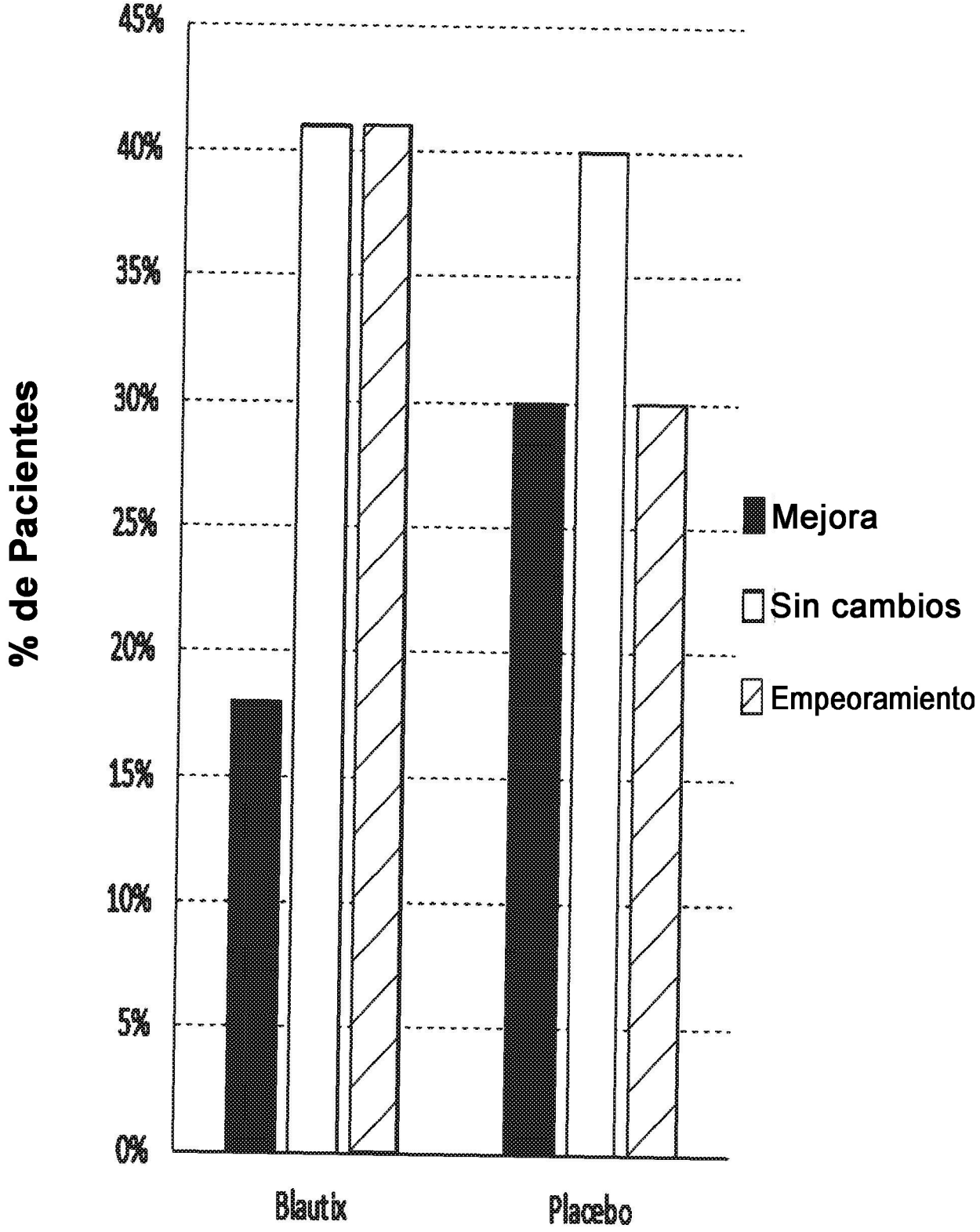

90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
% de Pacientes
Blautix
Placebo
Mejora
Sin cambios
Empeoramiento

FIG. 15


% de Pacientes
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
Mejora
Sin cambios
Empeoramiento
Blautix
Placebo