

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 135**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 1/14 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2017 PCT/GB2017/053722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018 WO18109461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2017 E 17818220 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3359172**

54 Título: **Composiciones que comprenden cepas bacterianas**

30 Prioridad:

12.12.2016 GB 201621123

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

27.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JEFFERY, IAN;
SHANAHAN, FERGUS;
O'TOOLE, PAUL;
STEVENSON, ALEX;
MULDER, IMKE y
SAVIGNAC, HELENE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 745 135 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden cepas bacterianas

5 **Campo de la técnica**

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

10

Antecedentes de la invención

Se cree que el intestino humano es estéril dentro del útero, pero está expuesto a una gran variedad de microbios maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento. A partir de entonces, se produce un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciado por factores como el modo de liberación, el medio ambiente, la dieta y el genotipo del huésped, todos los cuales impactan en la composición de la microbiota intestinal, particularmente durante los primeros años de vida. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y se vuelve adulta [1]. La microbiota intestinal humana contiene más de 1500 filotipos diferentes dominados en niveles de abundancia por dos divisiones bacterianas principales (filos), los Bacteroidetes y los Firmicutes [2]. Las exitosas relaciones simbióticas 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 que de otro modo no serían digeribles se degradan con la liberación de subproductos que proporcionan una fuente importante de nutrientes para el huésped y beneficios adicionales para la salud. Del mismo modo, 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 [3-5].

15

20

25

Se han documentado cambios dramáticos en la composición de la microbiota en trastornos gastrointestinales, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Por ejemplo, los niveles de bacterias del clúster de *Clostridium* XIVa se reducen en sujetos con EII mientras que el número de *E. coli* se incrementa, lo que sugiere un cambio en el equilibrio de simbiosis y patobiosis en el intestino [6-9, 18].

30

En reconocimiento del posible efecto positivo que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino del animal, se han propuesto diversas cepas para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, por ejemplo, [10-13]). Una serie de cepas, que incluyen principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, se han propuesto para su uso en el tratamiento de diversos trastornos intestinales (véase [14] para una revisión y véase [15]). La referencia [16] propone el uso de cepas del género *Blautia* para su uso en la modulación del equilibrio microbiano del ecosistema digestivo. En el contexto de la referencia 16, la modulación se refiere a promover la actividad de la flora bacteriana acetogénica en detrimento de las bacterias metanogénicas y reductoras de azufre. Por lo tanto, el presente documento enseña solo un aumento de bacterias acetogénicas. No hay discusión relacionada con la diversidad de especies que pertenecen a varios taxones. La referencia [17] trata el uso de *Blautia* para mejorar la supervivencia en pacientes afectados por enfermedad de injerto contra huésped (GVDH). Menciona que el aumento de la diversidad bacteriana se asocia con una reducción de la mortalidad relacionada con la GVDH y que el aumento de la cantidad de bacterias del género *Blautia* se asoció con GVDH reducida. Sin embargo, no hay indicios de que la administración de *Blautia* a un paciente provoque un aumento en la diversidad de la microbiota y/o induzca la estabilidad de la microbiota en un sujeto.

35

40

45

La relación entre diferentes cepas bacterianas y diferentes enfermedades, y los efectos precisos de cepas bacterianas particulares en el intestino y a nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades, están pobremente caracterizados y los resultados hasta la fecha son variables y plantean más preguntas que respuestas.[18].

50

Una característica distintiva de muchas enfermedades humanas relacionadas con la alteración de la microbiota es la pérdida de la diversidad de la microbiota. A diferencia de la llamada *disbiosis*, que es simplemente una composición de microbiota alterada en comparación con la microbiota agregada típica en sujetos sanos, la pérdida de diversidad de la microbiota puede cuantificarse mediante una reducción cuantificable en el número de clasificaciones bacterianas basadas en la secuencia o Unidades Taxonómicas Operativas (UTO) en una muestra, generalmente determinada por métodos de secuenciación del amplicón de ARNr 16S. La pérdida de diversidad también se mide por reducciones en el índice de diversidad de Shannon o el índice Chao. La diversidad reducida de la microbiota se ha documentado en estudios recientes de obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome del intestino irritable (SII), diabetes de tipo 2 y personas mayores más débiles [20]. Restablecer la microbiota saludable puede ser difícil, ya que las bacterias en el intestino son resistentes a la colonización. Esto plantea un desafío cuando a la hora de tratar la microbiota de sujetos poco saludables al aumentar la diversidad de la microbiota [19]. Se supone que la pérdida acompañante de la función metabólica microbiana es un factor contribuyente a los síntomas de estas fisiopatologías. A diferencia de los adultos sanos en los que la microbiota es estable, la microbiota de sujetos no sanos, como los que padecen EII, SII y sujetos ancianos frágiles, es inestable [18, 20].

55

60

65

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

5 Sumario de la invención

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades y trastornos al aumentar o mantener la diversidad de la microbiota intestinal en un sujeto. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Blautia* puede ser eficaz para aumentar o mantener el número y/o la uniformidad de diferentes tipos de bacterias en el intestino distal de un sujeto. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* aumenta la diversidad de la microbiota en las heces. Este aumento en la diversidad se observó en sujetos sanos y con SII. Sin embargo, los sujetos con SII que recibieron placebo experimentaron una reducción estadísticamente significativa en la diversidad de microbiomas durante el curso del estudio. Además, los ejemplos muestran que el tratamiento con composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica*, pero no placebo, aumentó la estabilidad de la microbiota en sujetos con SII a lo largo del curso del estudio. La estabilidad de la microbiota en sujetos que reciben la composición que comprende *Blautia hydrogenotrophica* fue comparable a la de los sujetos sanos de control.

Por lo tanto, en una primera realización, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia hydrogenotrophica*, para su uso en el tratamiento o prevención del síndrome del intestino irritable en el que el tratamiento o prevención comprende aumentar la diversidad de la microbiota en el sujeto.

La expresión "aumentar o mantener la diversidad de la microbiota" se usa en el presente documento para hacer referencia a aumentar o mantener el número de diferentes tipos de bacterias y/o la uniformidad de los diferentes tipos de bacterias en la microbiota de un sujeto. La diversidad de la microbiota aumenta. En algunas realizaciones, se incrementa el número de géneros diferentes de bacterias en la microbiota. En algunas realizaciones, se incrementa el número de especies diferentes de bacterias en la microbiota. En algunas realizaciones, se incrementa el número de cepas diferentes de bacterias en la microbiota. En algunas realizaciones, se mantiene la diversidad de la microbiota. En algunas realizaciones, se mantiene el número de géneros diferentes de bacterias en la microbiota. En algunas realizaciones, se mantiene el número de especies diferentes de bacterias en la microbiota. En algunas realizaciones, se mantiene el número de cepas diferentes de bacterias en la microbiota. En algunas realizaciones, se incrementa o mantiene el número de géneros, especies y cepas en la microbiota.

El aumento en la diversidad de la microbiota puede ser para bacterias no acetogénicas. También puede ser para bacterias acetogénicas y no acetogénicas. Tales bacterias son bien conocidos en la técnica. Brevemente, las bacterias acetogénicas producen acetato como producto final de la respiración o fermentación anaeróbica.

En algunas realizaciones, la pérdida, el aumento o el mantenimiento de la diversidad de la microbiota puede cuantificarse mediante una reducción, aumento o mantenimiento mensurable, respectivamente, en el número de clasificaciones bacterianas basadas en la secuencia o unidades taxonómicas operativas (UTO) en una muestra, normalmente determinado por métodos de secuenciación de amplicones del ARNr 16S. En algunas realizaciones, la pérdida de diversidad puede medirse mediante reducciones en el índice de diversidad de Shannon o el índice de Chao. Por el contrario, en algunas realizaciones, un aumento de la diversidad puede medirse por un aumento en el índice de diversidad de Shannon o el índice Chao. De manera similar, en algunas realizaciones, el mantenimiento de la diversidad puede medirse por el mismo resultado en el Índice de Diversidad de Shannon o el índice Chao.

En algunas realizaciones, aumenta la uniformidad de los diferentes tipos de bacterias. En algunas realizaciones, la abundancia relativa de los diferentes tipos de bacterias en la microbiota se vuelve más uniforme después del tratamiento o prevención con una composición de la invención.

Los inventores también han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades y trastornos induciendo la estabilidad de la microbiota intestinal. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Blautia* inducen la estabilidad de la microbiota intestinal. Por "inducir estabilidad" se entiende que la diversidad de la microbiota permanece estable y también los números relativos de los diferentes géneros en la microbiota permanecen estables. Esto es importante, ya que una serie de enfermedades y trastornos, incluidos el SII y la EII, se caracterizan por una estabilidad reducida de la microbiota. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* induce la estabilidad de la microbiota en las heces. Por lo tanto, en una realización adicional, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia* para usar en un método para inducir la estabilidad de la microbiota en un sujeto. De manera similar, también se proporciona un método para inducir la estabilidad de la microbiota en un sujeto que comprende el uso de una cepa bacteriana del género *Blautia*.

En algunas realizaciones de la divulgación, el número relativo de las diferentes especies bacterianas en la microbiota de un sujeto se vuelve más estable después del tratamiento o prevención con una composición de la divulgación, por ejemplo, en un sujeto diagnosticado con una enfermedad o trastorno caracterizado por una

reducción en la diversidad de la microbiota. En algunas realizaciones de la divulgación, los números relativos de los diferentes géneros bacterianos en la microbiota de un sujeto se vuelven más estables después del tratamiento o prevención con una composición de la divulgación, por ejemplo, en un sujeto diagnosticado con una enfermedad o trastorno caracterizado por una reducción de la diversidad de la microbiota. La estabilidad de la microbiota de un sujeto puede evaluarse comparando el microbioma del sujeto en dos puntos de tiempo diferentes. Si hay una diferencia en el microbioma, esto puede ser indicativo de enfermedad o de un trastorno presente. En algunas realizaciones, los dos puntos de tiempo diferentes están separados por al menos tres días (por ejemplo, al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años de diferencia). En algunas realizaciones, los dos puntos de tiempo diferentes están separados por 3-7 días, separados por 1-2 semanas, separados por 2-4 semanas, separados por 4-8 semanas, separados por 8-24 semanas, separados por 24-40 semanas, 40-52 semanas aparte o separados por más de 52 semanas. En algunas realizaciones, se usan más de dos puntos de tiempo diferentes, por ejemplo, tres, cuatro, cinco o más de cinco puntos de tiempo. Se eligen intervalos adecuados entre los diversos puntos de tiempo, por ejemplo, como se ha expuesto anteriormente.

15 La cepa bacteriana es de *Blautia hydrogenotrophica* y es, preferentemente, la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

En algunas realizaciones, la diversidad de la microbiota se refiere a la diversidad de la microbiota en las heces en el sujeto. En algunas realizaciones, la diversidad de la microbiota se refiere a la diversidad de la microbiota en una muestra de heces del sujeto. En algunas realizaciones, la diversidad de la microbiota se refiere a la diversidad de la microbiota en el intestino distal del sujeto. En algunas realizaciones, la diversidad de la microbiota se refiere a la diversidad de la microbiota en el tracto gastrointestinal del sujeto. En algunas realizaciones, la diversidad de la microbiota se refiere a la diversidad de la microbiota en el ciego. En algunas realizaciones, la diversidad de la microbiota se refiere a la diversidad de la microbiota en el colon.

La invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia hydrogenotrophica* para su uso en un método de tratamiento o prevención del síndrome del intestino irritable, en el que el tratamiento o prevención comprende aumentar la diversidad de la microbiota. En algunas realizaciones, el tratamiento o prevención usando una composición de la invención da como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a los niveles presentes en un individuo sano. En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención usando una composición de la invención da como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a niveles mayores que los presentes en algunos individuos sanos. En algunas realizaciones, el individuo sano es de una edad similar/igual a la del sujeto y/o es de una raza similar/igual a la del sujeto. De manera similar, la invención también proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con un nivel de diversidad de la microbiota que se reduce en relación con la diversidad de la microbiota de un sujeto sano en el que el método comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*. Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con un nivel reducido de diversidad de la microbiota incluyen, pero sin limitaciones: SII, EII [21], obesidad [22], diabetes de tipo 2, enfermedades infecciosas, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades/trastornos metabólicos. La invención abarca el tratamiento o la prevención de estas enfermedades y trastornos. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es SII.

En algunas realizaciones, el sujeto es un bebé o niño con una diversidad reducida de la microbiota en comparación con un bebé o niño sano, respectivamente. Se ha observado que algunos niños que desarrollan una enfermedad alérgica más adelante en la vida tienen una diversidad reducida de la microbiota fecal como bebés de 1 semana de edad [23]. Así, en algunas realizaciones, el bebé tiene menos de 1 semana de edad, tiene menos de 2 semanas, tiene menos de un mes, tiene menos de dos meses o tiene menos de cuatro meses. En algunas realizaciones, el sujeto es un bebé que no ha nacido mediante parto vaginal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sujeto es un bebé que ha nacido mediante cesárea. También se ha informado de una diversidad reducida de la microbiota en sujetos ancianos frágiles. En algunas realizaciones, por lo tanto, el sujeto es un sujeto anciano, por ejemplo, un sujeto anciano frágil. En algunas realizaciones, el sujeto tiene 65 años o más de edad (por ejemplo, 70 años o más, 75 años o más, 80 años o más, 85 años o más o 90 años o más) [20].

Se ha estimado que un solo individuo humano tiene aproximadamente 101 especies bacterianas diferentes y 195 cepas diferentes en su microbiota [24]. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la composición es para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene menos de 101 especies bacterianas diferentes (por ejemplo, menos de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 especies bacterianas) y/o menos de 195 cepas diferentes (por ejemplo, menos de 194, 193, 192, 191, 190, 189, 188, 187, 186, 185, 183, 180, 175, 170, 165, 160, 150, 140 cepas bacterianas) en su microbiota. En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 80 especies bacterianas (por ejemplo, más de 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 especies bacterianas) o a 101 especies bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 90 especies bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 95 especies bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 97 especies bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 99 especies bacterianas. En algunas realizaciones, el tratamiento o la

prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 160 cepas bacterianas (por ejemplo, más de 165, 170, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193 o 194 especies bacterianas) o a 195 cepas bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 175 cepas bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 185 cepas bacterianas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta a más de 190 cepas bacterianas.

En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta en al menos un género bacteriano (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez géneros bacterianos). En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta en al menos una especie bacteriana (por ejemplo, en al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 17 o 20 especies bacterianas). En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención dan como resultado que la diversidad de la microbiota aumenta en al menos una cepa bacteriana (por ejemplo, en al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 17, 20 o 25 cepas bacterianas).

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia* para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una estabilidad reducida de la microbiota en comparación con la estabilidad de la microbiota en un sujeto sano (o en comparación con una población de sujetos sanos). Por "estabilidad reducida de la microbiota" se entiende que la diversidad de la microbiota no se mantiene tan estable y que los números relativos de los diferentes géneros en la microbiota no se mantienen tan estables como la estabilidad observada en un sujeto sano o en una población de sujetos sanos. En algunas realizaciones, inducir la estabilidad de la microbiota da como resultado que se induzca la estabilidad a un nivel similar al que está presente en un sujeto sano o en una población de sujetos sanos. En algunas realizaciones, inducir la estabilidad de la microbiota da como resultado que se induzca la estabilidad al mismo nivel que está presente en un sujeto sano o en una población de sujetos sanos. De manera similar, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una estabilidad reducida de la microbiota en el que el método comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*. Por ejemplo, la patogenia de algunas enfermedades o trastornos se caracteriza por una estabilidad reducida de la microbiota. Ejemplos de tales enfermedades y trastornos son SII, EII, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo 2), enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades/trastornos metabólicos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia* para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una estabilidad reducida de la microbiota, en el que el tratamiento o prevención comprende inducir la estabilidad de la microbiota. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno se selecciona de entre SII, EII, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo 2), enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades/trastornos metabólicos. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es SII o EII. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es SII. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia* para su uso en un método de tratamiento o prevención de SII o EII, en el que el tratamiento o prevención comprende inducir la estabilidad de la microbiota.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia hydrogenotrophica*, para su uso en el tratamiento o prevención del síndrome del intestino irritable en el que el tratamiento o prevención comprende aumentar la diversidad de la microbiota en el sujeto, que comprende además diagnosticar que un sujeto tiene un nivel reducido de diversidad de la microbiota y, a continuación, si se encuentra presente un nivel reducido de diversidad, administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica* al sujeto.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una estabilidad reducida de la microbiota en relación con la estabilidad de la microbiota en un sujeto sano en el que el método comprende diagnosticar que un sujeto tiene una estabilidad reducida de la microbiota y, a continuación, si se encuentra presente una estabilidad reducida, administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia* al sujeto.

La cepa bacteriana en la composición es de *Blautia hydrogenotrophica*. Las cepas estrechamente relacionadas tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica*. La cepa bacteriana puede tener una secuencia de ARNr 16s que es al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:5. Preferentemente, la cepa bacteriana tiene la secuencia de ARNr 16s de SEQ ID NO:5. Lo más preferentemente, 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 efectiva para aumentar la diversidad de la microbiota y/o inducir la estabilidad de la

microbiota. Además, la administración oral es conveniente para sujetos y profesionales y permite la administración y/o colonización parcial o total del intestino.

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

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

10 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se define en las reivindicaciones.

15 En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

20 **Figura 1:** Comparación de la microbiota en pacientes sanos y con SII.

Figura 2: Comparación de la diversidad de la microbiota entre el día 16 y el día 1 para pacientes sanos y con SII después del tratamiento con BlautiX o placebo.

25 **Figura 3:** A) Interconectividad de la microbioma en pacientes sanos el día 1, día 16 y final del estudio después del tratamiento con BlautiX, B) interconectividad del microbioma en pacientes con SII el día 1, día 16 y final del estudio después del tratamiento con BlautiX. Los resultados de interconectividad observados el día 1, día 16 y al final del estudio para individuos sanos que se presentan en la figura 3A también se muestran en las figuras 3A1, 3A2 y 3A3, respectivamente. Los resultados de interconectividad observados el día 1, día 16 y al final del estudio para pacientes con SII que se presentan en la figura 3B también se muestran en las figuras 3B1, 3B2 y 3B3, respectivamente.

30 **Figura 4:** Una comparación de la inestabilidad en los perfiles de microbiota en pacientes sanos y con SII después del tratamiento con BlautiX o placebos en A) Día 16 y Día 1, B) fin de estudio y Día 1 y C) fin de estudio y Día 16.

35 **Figura 5:** Comparación de la diversidad de la microbiota en diferentes puntos de tiempo para pacientes sanos y con SII después del tratamiento con BlautiX.

40 **Figura 6:** A) La red de exclusión mutua en pacientes sanos el día 1, día 16 y al final del estudio después del tratamiento con BlautiX, B) La red de exclusión mutua en pacientes con SII el día 1, día 16 y al final del estudio después del tratamiento con BlautiX. Los resultados de exclusión mutua observados el día 1, día 16 y al final del estudio para individuos sanos que se presentan en la figura 6A también se muestran en las figuras 6A1, 6A2 y 6A3, respectivamente. Los resultados de exclusión mutua observados el día 1, día 16 y al final del estudio para pacientes con SII que se presentan en la figura 6B también se muestran en las figuras 6B1, 6B2 y 6B3, respectivamente.

45 **Figura 7:** Agrupación jerárquica de microbiota.

Figura 8: Comparación de los perfiles de microbiota antes (D14) y después (D32) del tratamiento con Blautix basado en las diferencias de Bray-Curtis.

50 **Figura 9:** (A) Visualización de los perfiles de microbiota de diferentes grupos el D-14 utilizando PCoA basado en las diferencias de Bray-Curtis. (B) Visualización de los perfiles de microbiota de los grupos el D14 utilizando PCoA basado en las diferencias de Bray-Curtis. (C) Se observó una diferencia significativa (valor de $p = 0,002$) en los perfiles de microbiota para el grupo de Blautix a través de los puntos de tiempo.

55 **Figura 10:** Comparación de los perfiles de microbiota para el tratamiento con Blautix en los puntos de tiempo del estudio (D-14, D-1, D34) según las diferencias de Bray-Curtis.

Divulgación de la invención

Cepas bacterianas

60 Las composiciones para su uso según la invención comprenden una cepa bacteriana del género *Blautia hydrogenotrophica*. Los ejemplos demuestran que las bacterias de esta especie son útiles para aumentar la diversidad de la microbiota y/o inducir la estabilidad de la microbiota. La más preferida es la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

65

Las especies de *Blautia* son bacterias no móviles, grampositivas que pueden ser cocoides u ovals y todas son anaerobios obligados que producen ácido acético como el principal producto final de la fermentación de glucosa [25]. *Blautia* puede aislarse del intestino humano, aunque *B. producta* se aisló de una muestra de septicemia.

5 *Blautia hydrogenotrophica* (previamente conocida como *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) se ha aislado del intestino de mamíferos, es estrictamente anaeróbica y metaboliza H₂/CO₂ 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 génica del ARNr 16S de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 es X95624.1 (desvelada en el presente documento como SEQ ID NO: Esta cepa de ejemplo de *Blautia*
10 *hydrogenotrophica* se describe en [25] y [26]. La cepa S5a33 y la cepa S5a36 corresponden a dos subclones de una cepa acetogénica aislada de una muestra fecal de un sujeto sano. Muestran una morfología, fisiología y metabolismo idénticos y tienen secuencias de ARNr 16S idénticas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, *Blautia hydrogenotrophica* para su uso en la invención tiene la secuencia del ARNr 16S de SEQ ID NO:5.

15 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 se denomina en el presente documento cepa BH. La cepa BH se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [Colección Alemana de Microorganismos] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania) el 10 de mayo de 2001 como "*Ruminococcus hydrogenotrophicus*" con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294. El
20 depositante fue INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, Francia. La propiedad de la bacteria depositada como DSM 10507 y DSM 14294 ha pasado por asignación a 4D Pharma Plc.

También se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa probada en los ejemplos
25 sean efectivas para aumentar la diversidad de la microbiota y/o inducir la estabilidad de la microbiota. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica*. Preferentemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene una secuencia de ARNr
30 16 s que es al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:5. Preferentemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que tiene la secuencia de SEQ ID NO:5.

También se espera que las cepas de *Blautia hydrogenotrophica* que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 sean efectivas para aumentar la diversidad de la microbiota y/o inducir la estabilidad de la microbiota. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características
35 fisiológicas y bioquímicas 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, sustancialmente todo el genoma
40 puede secuenciarse y una cepa de biotipo para su uso en la invención puede tener al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia en al menos 80 % de su genoma completo (por ejemplo, en al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, o en todo su genoma). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene al menos el 98 % de identidad de secuencia en al menos el 98 % de su genoma o al menos el 99 % de identidad de secuencia en el 99 % de su genoma. Otras secuencias adecuadas para su uso en la identificación de cepas de
45 biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)₅, o REP o [28]. Las cepas de biotipo pueden tener secuencias con al menos 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 al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de
50 identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la secuencia de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y comprende una secuencia de ARNr 16S que es al menos 99 % idéntica (por ejemplo, al menos 99,5 % o al menos 99,9 % idéntica) a la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene una secuencia con al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y tiene la secuencia ARNr 16S de SEQ ID NO: 5.

55 Como alternativa, 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 utilizando el depósito con número de acceso DSM 10507/14294 y análisis de los fragmentos de restricción y/o análisis por PCR, para ejemplo mediante el uso de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado fluorescente (FAFLP) y huella por PCR-
60 elemento repetitivo de ADN (rep) o perfilado de proteínas o secuenciación parcial de ADNr 16S o 23s. 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
65 una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 cuando se analizan mediante análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), por ejemplo cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI

(para ejemplos de métodos y orientación, véase, por ejemplo, [29]). Como alternativa, las cepas 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.

5 Otras cepas de *Blautia hydrogenotrophica* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, tales como los biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, pueden identificarse utilizando cualquier método o estrategia apropiados, incluidos 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 probar en el ensayo de distensión. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo
10 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 la microbiota a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

15 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 de ejemplo probada en los ejemplos y que se muestra efectiva para aumentar la diversidad de la microbiota y/o inducir la estabilidad de la microbiota. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa *Blautia hydrogenotrophica* depositada con
20 el número de acceso DSM 10507/14294 o un derivado de la misma, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento.

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) del original. Un derivado de una cepa de la invención puede modificarse, por
25 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 en la microbiota 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 generalmente será un biotipo de la cepa DSM
30 10507/14294.

Las referencias a células de la cepa de *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 abarca 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 dichas células están abarcadas por la
35 invención.

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

40 **Usos terapéuticos**

Las composiciones de la invención son para su uso en el aumento de la diversidad de la microbiota, como se define en las reivindicaciones. La diversidad reducida de la microbiota está asociada con numerosas enfermedades y trastornos patológicos, y los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para
45 aumentar la diversidad de la microbiota. Por consiguiente, la enfermedad o trastorno a tratar o prevenir usando una composición de la invención es, preferentemente, una enfermedad o trastorno asociado con un nivel de diversidad de la microbiota que se reduce en relación con la diversidad de la microbiota de un sujeto sano, como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno puede estar asociado con un nivel de diversidad de la microbiota que se reduce en relación con la diversidad de la microbiota de un sujeto sano y
50 también está asociado con una estabilidad reducida de la microbiota.

Las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención del SII. El tratamiento o prevención comprende aumentar la diversidad de la microbiota y/o inducir la estabilidad de la microbiota en el sujeto.

55 En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención comprenden la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y se usan para aumentar la diversidad de la microbiota en el sujeto en el tratamiento del SII.

En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en sujetos que exhiben, o se espera que exhiban, niveles reducidos de diversidad de la microbiota, por ejemplo, en comparación con un sujeto sano o una población de sujetos sanos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición es para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene menos de 101 especies bacterianas diferentes (por ejemplo, menos de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90, 85,
60 80, 75 o 70 especies bacterianas) y/o menos de 195 cepas diferentes (por ejemplo, menos de 193, 190, 187, 185, 183, 180, 175, 170, 165, 160, 150, 140 cepas bacterianas) en su microbiota. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición es para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene al menos un género bacteriano (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 géneros bacterianos) menos en su microbiota intestinal en comparación con un
65

sujeto sano o en comparación con una población de sujetos sanos. En algunas realizaciones, el tratamiento o prevención comprende una etapa de diagnosticar que un sujeto tiene un nivel reducido de diversidad de la microbiota y, a continuación, si se encuentra presente un nivel reducido de diversidad, el sujeto se trata con una composición según la invención.

5 En ciertas realizaciones, el sujeto es un bebé. En ciertas formas de realización, el sujeto es un niño. En ciertas realizaciones, el sujeto es un adulto.

10 En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto sano. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que la composición se usa para prevenir una enfermedad o trastorno, el sujeto es un sujeto sano, opcionalmente uno que se ha identificado que está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno caracterizado por una reducción en la diversidad de la microbiota.

15 En ciertas realizaciones, el sujeto ha recibido previamente, está recibiendo o recibirá tratamiento con antibióticos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el tratamiento o prevención comprende administrar la composición de la invención después, junto con o antes del tratamiento con antibióticos. La composición de la invención y el uno o más antibióticos pueden ser para administración separada, simultánea o secuencial.

20 En algunas realizaciones, la composición de la invención es para su uso en un método para aumentar la diversidad de la microbiota 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 su uso para reducir el nivel de hidrógeno en el aliento de un sujeto que exhibe o que se espera que exhiba un nivel reducido de diversidad de su microbiota. El sujeto es, preferentemente, un sujeto diagnosticado con SII. 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, preferentemente, usando una prueba de aliento de hidrógeno. La prueba de aliento de hidrógeno es bien conocida en la técnica y, por lo tanto, la persona experta sabrá cómo realizar dicha prueba. En algunas realizaciones, al sujeto se le administra lactulosa como sustrato para la prueba.

30 La prueba de aliento de hidrógeno también es una herramienta útil para monitorizar la efectividad o probable efectividad de aumentar la diversidad de la microbiota y del tratamiento o prevención usando una composición de la invención. Por ejemplo, una reducción en el nivel de hidrógeno detectado en la respiración de un sujeto después del tratamiento con una composición de la invención puede indicar que el tratamiento está teniendo un efecto creciente, estabilizador, terapéutico o preventivo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los usos de la invención comprenden además controlar el nivel de hidrógeno en la respiración de un sujeto durante y/o después del tratamiento con una composición de la invención y, de este modo, evaluar la efectividad o probable efectividad del aumento, estabilización, tratamiento o prevención. Por ejemplo, los niveles de hidrógeno pueden controlarse una o más veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4) veces, por ejemplo, incluso antes del tratamiento, al inicio del tratamiento, durante el tratamiento, al final del tratamiento y/o después del tratamiento, según se desee. En algunas realizaciones, el nivel de hidrógeno en la respiración del sujeto al final y/o después del período de dosificación (durante el cual la composición se administra al sujeto) se compara con el nivel al comienzo y/o antes del período de dosificación y una reducción en el nivel indica la efectividad o probable efectividad del aumento, estabilización, tratamiento o prevención. Por ejemplo, en realizaciones en las que el período de dosificación es de 16 días, puede ser deseable tomar mediciones el día 1 y el día 16, o por ejemplo el día 1, día 2, día 15 y día 16. En algunas realizaciones, se toman mediciones múltiples 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 en al menos 40 ppm en el nivel Cmax de hidrógeno indica que el aumento, la estabilización, el tratamiento o la prevención son efectivos o probablemente sean efectivos. En algunas realizaciones, el nivel de hidrógeno en la respiración del sujeto se mide solo una vez, por ejemplo, al final o después del tratamiento, y el hallazgo de que el nivel está en o cerca de un nivel predeterminado es indicativo de que es probable que el aumento de la estabilización, el tratamiento o la prevención hayan sido eficaces. La prueba de aliento de hidrógeno es un ensayo estándar y, por lo tanto, se conocen niveles predeterminados en la técnica.

55 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 exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el sujeto.

Las bacterias en la microbiota pueden detectarse en las heces de un sujeto, utilizando técnicas estándar, como las técnicas de cPCR utilizadas en los ejemplos.

Procedimientos de administración

60 Preferentemente, las composiciones de la invención se administrarán al tracto gastrointestinal para permitir la administración y/o la colonización parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención, como se define en las reivindicaciones. Generalmente, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero pueden administrarse por vía rectal, intranasal o por vía bucal o sublingual.

65

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

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

10 En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra al tracto gastrointestinal a través de una sonda, tal como una sonda nasogástrica, sonda orogástrica, sonda gástrica, sonda de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG), o un puerto, tal como un puerto de pared torácica que proporciona acceso al estómago, yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

15 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 deben administrarse diariamente. Los ejemplos demuestran que la administración diaria proporciona una administración con éxito y beneficios clínicos.

20 En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se administran con regularidad, tal como a diario, cada dos días o semanalmente, durante un periodo de tiempo prolongado, tal como durante al menos una semana, dos semanas, un mes, dos meses, seis meses o un año. Los ejemplos demuestran que la administración de *B. hydrogenotrophica* puede no resultar en una colonización permanente de los intestinos, por lo que la administración regular durante periodos prolongados puede proporcionar mayores beneficios terapéuticos y/o profilácticos.

25 En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento de acuerdo con la invención se acompaña de una evaluación de la microbiota intestinal del sujeto. El tratamiento puede repetirse si no se logra la administración y/o la colonización parcial o total con la cepa de la invención de manera que no se observa eficacia, o el tratamiento puede cesar si la administración y/o la colonización parcial o total es exitosa y se observa eficacia .

30 En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal preñado, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano, para evitar niveles reducidos de diversidad en la microbiota y/o una estabilidad reducida de la microbiota que se desarrolla en su hijo en el útero y/o después de que nazca

35 Las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto que ha sido diagnosticado con diversidad reducida de la microbiota en relación con un sujeto sano y/o estabilidad reducida de la microbiota o una enfermedad o trastorno asociado con diversidad reducida de la microbiota en relación con un sujeto sano y/o estabilidad reducida de la microbiota, o que se ha identificado que está en riesgo de una diversidad reducida de la microbiota en relación con un sujeto sano y/o una estabilidad reducida de la microbiota. Las composiciones también pueden administrarse como una medida profiláctica para evitar el desarrollo de una diversidad reducida de la microbiota en relación con un sujeto sano y/o una estabilidad reducida de la microbiota en un sujeto sano.

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

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

50 Generalmente, las composiciones de la invención son para el tratamiento de seres humanos, aunque pueden usarse para tratar animales, incluidos mamíferos monogástricos, tales 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 una sonda oral.

Composiciones

55 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 liofilizada. 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.

60 Preferentemente, 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 [30-32]. Los ejemplos demuestran que las composiciones de liofilizado son particularmente efectivas.

65 Como alternativa, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano vivo y activo.

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 ha sido eliminada, por ejemplo, no ha sido eliminada 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 ha sido eliminada, inactivada y/o atenuada. 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 han sido destruidas.

En realizaciones preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir la administración de la cepa bacteriana en el intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la administración en la ubicación objetivo a través, por ejemplo, de la ruptura con estímulos químicos o físicos, tales como la presión, la actividad enzimática o la desintegración física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Se puede usar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación de ejemplo incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en superficies de soporte sólidas, autoagregación 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 [33] y [34].

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

La composición puede formularse como un probiótico.

Una composición de la invención incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana de la invención, como se define en las reivindicaciones. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso sobre un sujeto. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar como resultado la administración y/o la colonización parcial o total del intestino del sujeto.

Una dosis diaria adecuada de la bacteria, por ejemplo para un ser 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 1×10^7 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 otro ejemplo de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} UFC.

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

Normalmente, un probiótico, tal como la composición de la invención, se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico suele ser 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, tales como inulina y transgalacto-oligosacáridos.

En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 % en peso, con respecto a la composición en peso total (por ejemplo, de 5 a 20 % en peso). Los carbohidratos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: fructooligosacáridos (o FOS), fructooligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalt-oligosacáridos, pectinas, xilooligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS), beta -glucanos, goma de almendra modificada y almidones resistentes, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena y fibras cítricas. En un aspecto, los prebióticos son los fructooligosacáridos de cadena corta (por simplicidad mostrados a continuación como FOSs-

c.c); dicho FOSs-c.c. no son carbohidratos digeribles, generalmente obtenidos por la conversión del azúcar de remolacha e incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales excipientes adecuados se pueden encontrar en la referencia [35]. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [36]. Los ejemplos de vehículos 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 transportador, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar con independencia de la vía de administración prevista y de la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tal como goma arábica, 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. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen benzoato de sodio, ácido ascórbico, cisteína y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. Otro ejemplo de un vehículo adecuado es sacarosa. Otro ejemplo de un conservante es 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 el consumo al ser más similar a un producto alimenticio común, que 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 tiene un contenido variable de grasa. 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 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, tales como las bebidas de suero, leches fermentadas, leches condensadas, leches infantiles o para bebés; leches aromatizadas, helados; alimentos que contienen leche, tales como dulces.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen una sola cepa o especie bacteriana y no contienen ninguna otra cepa o especie bacteriana. Dichas composiciones pueden comprender solo cantidades mínimas biológicamente irrelevantes de otras cepas o especies bacterianas. Dichas composiciones pueden ser un cultivo o liofilizado que está sustancialmente libre de otras especies de organismos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una o más cepas bacterianas del género *Blautia* 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 una sola especie de *Blautia hydrogenotrophica* y no contienen ninguna otra especie bacteriana, o que comprenden solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra especie. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una sola cepa de *Blautia hydrogenotrophica* y no contienen ninguna otra cepa o especie bacteriana, o que 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 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 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 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 una cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica* como parte de un consorcio microbiano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana de *Blautia* está presente en combinación con una o más (por ejemplo, al 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 hydrogenotrophica* 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 ser 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 al menos dos organismos diferentes. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son de la misma especie, por ejemplo, dos seres humanos diferentes. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son un ser humano infantil y un ser humano adulto. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son un mamífero humano y un mamífero 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 cepa de *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 todas de las de más de una na 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 antes de su uso.
- En algunas realizaciones, la cepa bacteriana para su uso en la invención se obtiene de heces adultas humanas. 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 adultas humanas o, si están presentes otras cepas bacterianas, están presentes solo en cantidades mínimas. En algunas realizaciones, la bacteria puede haber sido cultivada después de ser obtenida de las heces adultas humanas y ser utilizada en una composición de la invención.
- En algunas realizaciones, las una o más cepas bacterianas de *Blautia* es/son los únicos agentes terapéuticamente activos en una composición de la invención. En algunas realizaciones, la cepa o cepas bacterianas en la composición es/son el único o los únicos agentes terapéuticamente activos en una composición de la invención.
- Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden o no requerir autorización 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 el presente documento.
- Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana como se usa en la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para aumentar la diversidad de la microbiota en un sujeto y/o inducir la estabilidad de la microbiota y/o tratar un trastorno asociado con una diversidad reducida de la microbiota y/o una estabilidad reducida de la microbiota cuando se administra a un sujeto en necesidad de la misma, la diversidad de la microbiota, por ejemplo, una enfermedad o trastorno tal como SII, EII, obesidad, diabetes de tipo 2, una o más enfermedades infecciosas, una o más enfermedades alérgicas, una o más enfermedades autoinmunes o una o más enfermedades/trastornos metabólicos .

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que 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 al peso de la composición.

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

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

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

20 En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorante de maíz, goma arábica, 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.

25 En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizador.

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

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

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

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

45 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 ("cápsula de gel").

50 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran por vía oral. La administración oral puede implicar deglución, de modo que el compuesto entra en el tracto gastrointestinal, y/o la administración bucal, lingual o sublingual por la cual el compuesto entra al torrente sanguíneo directamente desde la boca.

55 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen tapones sólidos, micropartículas sólidas, semisólidas y líquidas (incluidas múltiples fases o sistemas dispersos) tales como tabletas; cápsulas blandas o duras que contienen múltiples o nanopartículas, líquidos (por ejemplo, soluciones acuosas), emulsiones o polvos; pastillas (incluso rellenas de líquido); mastica geles formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; aerosoles; y parches bucales/mucoadhesivos.

60 En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación entérica, es decir, una formulación gastrorresistente (por ejemplo, resistente al pH gástrico) que es adecuada para la administración 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.

65 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 similares. 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, gastrorresistente sin la necesidad de un recubrimiento entérico. Por lo 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 termogelificante. En algunas realizaciones, el material termogelificante es un material celulósico, tal como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En algunas realizaciones, la cápsula comprende una cubierta que no contiene ningún polímero formador de película. En algunas realizaciones, la cápsula comprende una cubierta y la cubierta comprende hidroxipropilmetilcelulosa y no comprende ningún polímero formador de película (por ejemplo, véase [37]). 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, tales como, por ejemplo, glicerol, sorbitol, maltitol y polietilenglicoles, presentes en la cubierta de la cápsula, tienen cierta elasticidad y suavidad. Las cápsulas blandas se pueden producir, por ejemplo, a base de gelatina o almidón. Las cápsulas blandas a base de gelatina están disponibles comercialmente en varios proveedores. Dependiendo del método de administración, tal como, por ejemplo, por vía oral o rectal, las cápsulas blandas pueden tener varias formas, pueden ser, por ejemplo, redondas, ovales, oblongas o en forma de torpedo. Las cápsulas blandas se pueden producir mediante procesos convencionales, como, por ejemplo, mediante el proceso de Scherer, el proceso de Accogel o el proceso de goteo o soplado.

Procedimientos de cultivo

Las cepas bacterianas para su uso en la presente invención pueden cultivarse usando técnicas de microbiología estándar como se detalla en, por ejemplo, las referencias [38-40].

El medio sólido o líquido utilizado para el cultivo puede ser 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), NaHCO₃ (0,4 g), cisteína (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄ · 7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0.009 g), 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).

Cepas bacterianas para su uso en composiciones de vacunas

Los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la invención son útiles para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con un nivel de diversidad de la microbiota que se reduce en relación con la diversidad de la microbiota de un sujeto sano (o en relación con la diversidad de la microbiota de una población de sujetos sanos) y/o enfermedades o trastornos que están asociados con una estabilidad reducida de la microbiota en comparación con un sujeto sano (o en comparación con una población de sujetos sanos). Es probable que esto sea el resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen sobre el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones de la invención también pueden ser útiles para prevenir tales enfermedades o trastornos cuando se administran como composiciones de vacuna. En ciertas realizaciones de este tipo, las cepas bacterianas de la invención son viables. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención son capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino. En otras ciertas realizaciones de este tipo, las cepas bacterianas de la invención se pueden matar, inactivar o atenuar. En ciertas de tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración por inyección, tal como por inyección subcutánea.

Aspectos generales

La 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 la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, las referencias [41] y [42-48], etc.

La expresión "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en 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, $x \pm 10\%$.

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.

- 5 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias nucleotídicas significa que, cuando se alinean, el porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la técnica, ref. [49]. Se determina una alineación preferida mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de hueco afín con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se describe en la ref. [50]

- 15 A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende numerosas etapas puede comprender etapas adicionales al principio o al final del método, o puede comprender etapas intermedias adicionales. Además, las etapas se pueden combinar, omitir o realizar en un orden alternativo, si corresponde.

- 20 En el presente documento se describen diversas 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 el presente documento como adecuadas, típicas o preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando son mutuamente excluyentes).

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo 1 - Cambios en la microbiota del paciente después del tratamiento con *Blautia hydrogenotrophica*

25

Sumario

El efecto de *Blautia hydrogenotrophica* se evaluó la diversidad y estabilidad de la microbiota del paciente en pacientes sanos y con SII.

30

Metodología

Diseño del estudio

- 35 Se realizó un ensayo clínico de fase I en el que *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", cepa depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294) se administró a pacientes humanos con SII o pacientes humanos sanos. A los pacientes se les administró Blautix durante un período de dosificación (días 1-16) con un período de lavado de los días 19-23. Se recogieron muestras fecales de SII y sujetos sanos, tratados con placebo o tratados con Blautix, en: momento basal, día 1 (D1) antes del tratamiento; fin del tratamiento día 16 (D-16); y al final del estudio (EOS), que fue de 2 a 4 semanas (lavado) después del tratamiento.

40

Secuenciación del amplicón 16S

- 45 Se usó un kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue siguiendo las instrucciones del fabricante, para extraer ADN microbiano de 0,2 g de muestras fecales congeladas de sujetos con SII y sanos, tratados con placebo o Blautix, en: momento basal, día 1 (D1) antes del tratamiento; fin del tratamiento día 16 (D-16); y al final del estudio (EOS), que fue de 2 a 4 semanas (lavado) después del tratamiento.

50

- 50 La preparación y secuenciación de los amplicones génicos del ARNr 16S se llevó a cabo utilizando el protocolo 16S Sequencing Library Preparation Nextera desarrollado por Illumina (San Diego, California, EE. UU). Se amplificaron 50 ng de cada uno de los extractos fecales de ADN usando PCR y cebadores dirigidos a la región variable V3/V4 del gen del ARNr 16S. Los productos se purificaron y los códigos de barras directos e inversos se unieron mediante una segunda ronda de PCR de adaptador. Los productos de la PCR resultantes se purificaron, cuantificaron y luego se agruparon cantidades equimolares de cada amplicón antes de enviarlos para su secuenciación al Proveedor comercial GATC GmbH., ya sea en las plataformas MiSeq (química de 2x250 pb) o HiSeq (química de 2 x 300 pb).

55

Análisis de datos (postsecuenciación)

- 60 Los datos de la secuencia bruta se combinaron mediante la metodología flash. Esto filtra las lecturas de baja calidad. La metodología de canalización USEARCH (versión 8.1.1861_i86_linux64) se usó para identificar singletons y ocultarlos de la etapa de generación de la UTO (Unidad Taxonómica Operacional). El algoritmo UPARSE se usó para agrupar las secuencias en UTO. Las secuencias quiméricas generadas en LA ETAP de amplificación se eliminaron utilizando el algoritmo de eliminación de quimera UCHIME con la base de datos de referencia de Chimeraslayer (descargada: 9 de septiembre de 2016). El algoritmo de alineación global USEARCH se utilizó para mapear todas las lecturas, incluidos los singletons en las secuencias de UTO restantes. Los scripts internos se usaron para luego agrupar las secuencias en la UTO según lo clasificado por el algoritmo de alineación global

65

USEARCH. Las secuencias individuales se agruparon en UTO para proporcionar información de composición del microbioma (abundancia y diversidad).

Análisis de datos de alto nivel

5 La matriz de disimilitud de Bray-Curtis se generó para cada emparejamiento de muestras utilizando la biblioteca Vegan en R 3.3.1. El conjunto de datos se visualizó utilizando el análisis de coordenadas principales con la matriz de disimilitud de Bray-Curtis.

10 Se utilizó una función interna de diagrama de calor R para generar una visualización de mapa de calor con agrupamiento jerárquico basado en la disimilitud de Bray-Curtis y el enlace.

Los índices de diversidad de Shannon y Simpson se generaron utilizando la biblioteca phyloseq en R.

15 La metodología DESeq2 se utilizó para identificar variables taxonómicas que fueron significativas para las comparaciones elegidas.

El MANOVA permutacional se realizó en la matriz de disimilitud utilizando la función Adonis en R.

Resultados

20 Las muestras de todos los puntos de tiempo se agruparon para ambos grupos (71 pacientes con SII y 67 controles sanos, incluidos los grupos tratados con Blautix y placebo). El análisis se realizó utilizando una medida de distancia generada en el conjunto de datos del microbioma completo. La Figura 1 informa que la microbiota de los sujetos con SII es significativamente diferente de la de los sujetos sanos.

30 El análisis de diversidad se llevó a cabo utilizando el número observado de taxones (OTU) predicho, el índice de diversidad de Shannon y el índice de diversidad de Simpson. Ambos grupos de tratamiento mostraron un aumento en la diversidad en el punto de tiempo del día 16, que fue significativo para las UTO observadas y mostró una tendencia para el Simpson (valor P bruto: <0,1) (Figura 2). Este aumento en la diversidad no se observó con pacientes tratados con placebo. Se observó una disminución significativa en la diversidad de la microbiota en el grupo placebo de SII no tratado entre el final del estudio y el día 1.

35 La Figura 3 informa que el tratamiento con Blautix aumentó la conectividad de la red de microbiota de ciertos taxones relacionados con la salud. En pacientes sanos se observó un aumento sustancial en las conexiones entre microbios desde el día 1 hasta el día 16 (después del tratamiento con Blautix), lo que sugiere un aumento en la cooperación y la estructura de la microbiota (Figura 3A). La conectividad se correlaciona con la diversidad y la estabilidad. Después del período de lavado, la estructura de la red volvió a una red similar a la observada el día 1. El tratamiento con Blautix fue, por lo tanto, capaz de aumentar la interconectividad en pacientes sanos, pero el efecto se perdió después del lavado. En los pacientes con SII, la red se mantuvo similar en términos de conectividad entre el día 1 y el día 16, pero al final del estudio se observó un aumento en la conectividad que sugiere un aumento de la estructura de la microbiota después del período de lavado en pacientes con SII tratados con Blautix (Figura 3B). El efecto de Blautix en la conectividad del microbioma se retrasó, por lo tanto, en pacientes con SII en comparación con pacientes sanos.

45 La inestabilidad/cambio en los perfiles de microbiota fueron representados por las distancias de Bray Curtis entre puntos de tiempo del mismo sujeto. Bray-Curtis muestra diferencias entre los perfiles de abundancia de especies limitados entre 0-1 (0 = igual; 1 = no comparte ninguna especie). El tratamiento de pacientes con SII con Blautix redujo la magnitud de los cambios de la microbiota durante el tratamiento (Fig. 4A) y después del tratamiento (Figuras 4B-4C). Esto muestra que Blautix aumentó la estabilidad de la microbiota en pacientes con SII y que el cambio continúa después de la intervención. Esta mayor estabilidad no se observó cuando a los pacientes con SII se les administró el placebo (Figuras 4 A-C).

50 La Figura 5 indica que hubo un aumento significativo en la diversidad de la microbiota a nivel de género para pacientes con SII tratados con Blautix el día 16 en comparación con el día 1. El análisis de la diversidad se realizó utilizando el índice de diversidad de Shannon aplicado al nivel de género (valor p bruto: 0,04, día 1 frente al día 16).

60 La Figura 6A y la Figura 6B muestran los cambios en las redes de exclusión mutua en pacientes sanos y con SII después del tratamiento con Blautix. En individuos sanos, la red de exclusión mutua se vuelve más densa e interconectada el día 16, lo que sugiere una mayor competencia e inhibición. Sin embargo, este efecto se perdió al final del estudio cuando la estructura de la red volvió al punto de tiempo inicial durante el período de lavado (Figura 6A). En pacientes con SII, el efecto de Blautix en la conectividad de exclusión mutua fue aumentar el diámetro de la red durante el período de tratamiento y el período de lavado. Esto fue opuesto al efecto observado en los individuos sanos donde la red se vuelve más densa. Durante la fase de lavado para los pacientes con SII, se observaron múltiples interacciones independientes que no se habían visto previamente. Múltiples interacciones independientes

65

representan pares de taxones que están interactuando de una manera que es independiente del resto de la red, es decir, no tienen ninguna interacción con el resto de la red.

La visualización de la microbiota muestra que después del tratamiento con Blautix hubo una mayor conectividad de red para ciertos taxones relacionados con la salud (Figura 7). Los taxones asociados a la salud incluyen el grupo IV de Clostridium, Bifidobacterium y Prevotella. Oscillibacter también es potencialmente un género asociado a la salud. Estos taxones relacionados con la salud están implicados en la respuesta al tratamiento.

Ejemplo 2 - Efecto protector en modelos de trastornos del neurodesarrollo

El modelo de ratón BTBR

El modelo de ratón BTBR utiliza ratones endogámicos modificados genéticamente que muestran un fenotipo robusto similar al autista. Se han indicado deficiencias en los comportamientos sociales, aumento de los comportamientos repetitivos y aumento de los comportamientos relacionados con la ansiedad en esta cepa [51]. Debido a este robusto fenotipo conductual, el ratón BTBR es un modelo animal ideal para evaluar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de conductas relacionadas con el autismo. El alivio de tales síntomas por un bioterapéutico vivo también puede ser indicativo de la eficacia del bioterapéutico en el tratamiento de otras enfermedades psiquiátricas o neurológicas.

Ratones

Se criaron ratones BTBR machos de forma interna. Los animales fueron alojados en una habitación con temperatura y humedad controladas en un ciclo de 12 horas de oscuridad (luces encendidas de 7:00-19:00 horas). Todos los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con la Directiva Europea 2010/63/CEE, los requisitos de S.I. N.º 543 de 2012, y fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Colegio Universitario Cork.

Cepa

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294.

Se proporcionó el agente bioterapéutico en reserva de glicerol. Se cultivaron los agentes bioterapéuticos vivos en las instalaciones en condiciones de anaerobiosis.

Administración de agentes bioterapéuticos vivos

La dosificación con *Blautia hydrogenotrophica* comenzó cuando los ratones tenían 8 semanas de edad. Se trató a estos ratones una vez al día durante 3 semanas mediante sonda oral.

Calendario de administración

El vehículo para la administración oral es PBS. La administración oral diaria se produce por sonda oral.

Colección fecal

Se recogieron muestras fecales frescas de ratones individuales antes y después de la administración de *Blautia hydrogenotrophica*. Al menos 20 mg de heces frescas se colocaron en un tubo de microcentrifuga, se colocaron inmediatamente en hielo y después se almacenaron a -80 °C.

Resultados

El efecto del tratamiento con Blautix sobre la microbiota entre puntos de tiempo (D14, D32) se muestra en la Figura 8. Se observó una variación temporal significativa en los perfiles de microbiota (valor $p = 0,001$) entre los puntos de tiempo del estudio antes del tratamiento (D14) y después del tratamiento (D32) puntos de tiempo.

El análisis diferencial con DESeq2 dio 25 taxones significativamente abundantes (valor de p ajustado $<0,05$) diferencialmente para el tratamiento con Blautix entre los puntos de tiempo del estudio de autismo D14 y D32. Los taxones se enumeran en la **Tabla 1** más adelante.

Tabla 1. Taxones diferencialmente abundantes significativos entre los puntos de tiempo D14 y D32 en el estudio de autismo. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D32 en comparación con el D14.

	ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
5	2440650	Género	Clostridium XIVa	19,706	3,008	6.9E-10
	307526	Especie	Bacteroides acidifaciens	11,275	0,912	5.0E-33
10	39008	Especie	Bacteroides acidifaciens	10,501	1,345	1.0E-13
	277773	Especie	Alistipes finegoldii	9,954	0,906	2.8E-26
	1105465	Género	Barnesiella	9,255	0,923	2.8E-22
15	943687	Familia	Porphyromonadaceae	9,200	0,850	1.1E-25
	47662	Especie	Barnesiella intestinihominis	8,844	0,988	7,0E-18
	181003	Género	Alistipes	8,370	2,069	4.2E-04
20	1282905	Especie	Barnesiella intestinihominis	7,373	1,004	2.8E-12
	1370810	Especie	Barnesiella intestinihominis	6,633	1,986	0,006
	1203483	Especie	Bacteroides acidifaciens	6,599	1,584	2,7E-04
	74179	Especie	Alistipes massiliensis	6,318	1,899	0,006
25	1640334	Especie	Barnesiella intestinihominis	6,258	2,066	0,013
	76239	Familia	Lachnospiraceae	6,202	1,229	4.6E-06
	308030	Especie	Barnesiella intestinihominis	6,196	1,451	1,8E-04
30	1156020	Familia	Erysipelotrichaceae	5,827	1,607	0,002
	712755	Especie	Barnesiella intestinihominis	5,614	1,749	0,008
	11297	Familia	Porphyromonadaceae	5,450	1,021	1,0E-06
35	2218722	Género	Clostridium IV	3,983	1,017	0,001
	594012	Especie	Clostridium lactatifermentans	2,900	0,952	0,013
	453043	Especie	Eubacterium ventriosum	-3,675	1,260	0,018
40	451019	Especie	Barnesiella intestinihominis	-4,055	1,540	0,041
	466087	Especie	Akkermansia muciniphila	-6,727	0,876	2.5E-13
	2153421	Género	Blautia XIVa	-8,051	2,577	0,010
45	866478	Especie	Barnesiella intestinihominis	-8,961	0,846	9,3E-25

Sumario

En un modelo de autismo en ratón en el que se administró a los animales Blautix, se observó una variación significativa en el microbioma, incluyendo un incremento neto sustancial en la diversidad bacteriana.

Ejemplo 3 - Efecto en modelos de isquemia cerebral

Sumario

El efecto protector de *Blautia hydrogenotrophica* se probó en modelos de ratón de isquemia cerebral. Con este gin, se probaron tres grupos de 5-17 ratones. En el estudio solo se incluyeron animales de comportamiento normal. El primer día de dosificación fue el día -14. Un grupo recibió bacterias liofilizadas a diario desde el primer día de dosificación hasta la finalización. Los grupos de control recibieron vehículo o liotampón.

El día 1 se anestesió a todos los ratones. Se creó una incisión en la línea media en el lado ventral del cuello para exponer las arterias carótidas comunes derecha e izquierda. A continuación, se indujo un modelo de isquemia-reperusión I/R cerebral mediante oclusión de la arteria carótida común bilateral (BCCAO) usando pinzas vasculares durante 15 minutos. Al final de cada oclusión se retiraron las pinzas.

Cepa

Bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294.

Calendario de administración

N.º de animales	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Volúmenes de dosis (ml/kg o ml/animal)
12	PBS (control negativo)	n/a	10
17	Polvo liofilizado	7,8 mg en 100 µl	100 µl por animal
13	Bacterias liofilizadas	15,6 mg en 100 µl (dosis de bacterias= 2 x 10 ⁸)	100 µl por animal

Diseño del estudio

Días -14 a 14: Dosis diaria del PBS control (tampón de liof.), polvo control liofilizado (vehículo) o bacterias liofilizadas (Blautix).

Día 1: Modelo de isquemia-reperfusión I/R cerebral inducida mediante cirugía.

Día 14: Se sacrificó a la mitad de los ratones en cada grupo.

Día 14 a 28: Dosis diaria del PBS control (tampón de liof.), polvo control liofilizado (vehículo) o bacterias liofilizadas (Blautix) para el resto de los ratones en cada grupo.

Día 28: Terminación de los ratones restantes.

Se recogieron las pellas fecales a tres puntos de tiempo: Día -14, Día 14 y Día 28. Cada captación se llevó a cabo en ambiente estéril (completamente aséptico= limpio entre animales) con cada ratón extraído de la jaula y se introdujeron por separado en una nueva caja estéril para recoger las pellas individuales. Se recogieron tantas pellas como fue posible con el fin de alcanzar un mínimo de 80 mg y, preferentemente, 100 mg de material por ratón.

Resultados

No se detectaron diferencias significativas en los perfiles de microbiota entre los grupos de tratamiento con Blautix, vehículo y liotampón el D-14 (valor p= 0,177) antes de la administración de Blautix (véase la Figura 9A). No obstante, se observaron diferencias significativas en los perfiles de microbiota entre los diferentes grupos de tratamiento el día 14 (véase la figura 9B) con un valor de p de 0,011 observados. Los inventores evaluaron adicionalmente la variación temporal en la microbiota del grupo tratado con Blautix y encontraron una diferencia significativa (véase la Figura 9C) con un valor p de 0,002 observado.

El análisis diferencial con DESeq2 dio taxones significativamente abundantes (valor de p ajustado <0,05) para el tratamiento con vehículo, liotampón y Blautix entre los puntos de tiempo en el estudio de accidente cerebrovascular, como se muestra en la Tabla 2, demostrando un impacto a más largo plazo sobre la diversidad bacteriana impartida por Blautix. Los taxones para el tratamiento con Blautix se enumeran en la Tabla 3, la Tabla 4 y la Tabla 5.

Tabla 2. Taxones diferencialmente abundantes importantes entre puntos de tiempo en el estudio de accidente cerebrovascular.

	D-14->D14	D14->D28	D-14->D28
Vehículo	4	0	2
Liotampón	17	2	0
Blautix	7	14	12

Tabla 3. Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo D-14 y D14 para el tratamiento con Blautix en el estudio de accidente cerebrovascular. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D14 en comparación con el D-14.

5

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
321825	Familia	Ruminococcaceae	1,647	0,470	0,027
74771	Especie	Alistipes massiliensis	1,530	0,442	0,027
567799	Género	Alistipes	-1,215	0,308	0,008
77091	Género	Clostridium	-1,634	0,489	0,036
472737	Familia	Lachnospiraceae	-2,585	0,667	0,008
615246	Familia	Lachnospiraceae	-3,003	0,711	0,007
166882	Familia	Lachnospiraceae	-5,547	1,406	0,008

10

15

20

Tabla 4. Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo D14 y D28 para el tratamiento con Blautix en el estudio de accidente cerebrovascular. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D28 en comparación con el D14.

25

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
1101936	Orden	Clostridiales	3,275	0,709	0,001
218505	Especie	Roseburia faecis	2,568	0,630	0,002
948888	Género	Bamesiella	2,499	0,575	0,001
612631	Género	Clostridium XIVa	2,473	0,723	0,011
201398	Filo	Bacteroidetes	2,045	0,605	0,011
1370810	Especie	Bamesiella intestinihominis	1,878	0,579	0,016
770554	Especie	Alistipes putredmis	1,868	0,626	0,033
558330	Género	Prevotella	1,795	0,453	0,002
943687	Familia	Porphyromonadaceae	1,586	0,546	0,039
308030	Especie	Bamesiella intestinihominis	1,324	0,361	0,005
176124	Filo	Bacteroidetes	1,163	0,294	0,002
565518	Especie	Oscillospira guilliermondii	-1,571	0,488	0,016
544582	Especie	Flavonifractor plautii	-1,599	0,569	0,050
25678	Especie	Mucispirillum schaedleri	-2,751	0,640	0,001

30

35

40

45

50

Tabla 5. Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo D-14 y D28 para el tratamiento con Blautix en el estudio de accidente cerebrovascular. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D28 en comparación con el D-14.

55

60

65

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
688867	Género	Clostridium XIVa	8,296	1,136	3.8E-11
612631	Género	Clostridium XIVa	7,814	1,348	3.1E-07
560658	Familia	Lachnospiraceae	5,241	1,243	0,001
929749	Especie	Eubacterium ruminantium	3,190	0,829	0,003
518034	Especie	Desulfovibrio fairfieldensis	3,098	0,982	0,024
74771	Especie	Alistipes massiliensis	2,548	0,714	0,007
23310	Especie	Odoribacter laneus	1,621	0,475	0,011
117624	Orden	Clostridiales	-1,748	0,612	0,049
411272	Género	Clostridium XIVa	-2,923	1,019	0,049
39008	Especie	Bacteroides acidifaciens	-2,953	0,816	0,007
331352	Género	Clostridium XIVa	-3,969	0,626	1.6E-08
77091	Género	Clostridium	-4,247	1,426	0,039

El análisis diferencial con DESeq2 dio taxones significativamente abundantes (valor de p ajustado <0,05) diferencialmente para el tratamiento con Blautix frente al vehículo, así como el tratamiento con Blautix frente al liotampón para los puntos de tiempo del estudio de accidente cerebrovascular, como se muestra en la Tabla 6. Los taxones se enumeran en la Tabla 7, la Tabla 8 y la Tabla 9.

Tabla 6. Taxones diferencialmente abundantes importantes para el tratamiento con Blautix en el estudio de accidente cerebrovascular.

	D-14	D14	D28
Blautix frente al Vehículo	0	10	0
Blautix frente al tampón de liof.	2	13	0

Tabla 7. Taxones diferencialmente abundantes importantes para el tratamiento con Blautix frente al vehículo en D14 en el estudio de accidente cerebrovascular.

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
25678	Especie	Mucispirillum schaedleri	2,604	0,688	0,014
3119687	7 Familia	Lachnospiraceae	2,445	0,642	0,014
321825	Familia	Ruminococcaceae	2,174	0,564	0,014
627	Género	Clostridium XIVa	1,915	0,601	0,043
308030	Especie	Barnesiella intestinhominis	-1,324	0,419	0,043
137081C	Especie	Barnesiella intestinhominis	-1,540	0,425	0,019
187271	Especie	Ruminococcus flavefaciens	-3,475	1,065	0,042
277773	Especie	Alistipes finegoldii	-3,751	1,178	0,043
940566	Especie	Staphylococcus lentus	-5,228	1,519	0,026
930972	Género	Staphylococcus	-5,418	1,536	0,023

Tabla 8. Taxones diferencialmente abundantes importantes para el tratamiento con Blautix frente al tampón de liof. en D-14 en el estudio de accidente cerebrovascular

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
1161472	Familia	Lachnospiraceae	6,511	1,403	0,001
392940	Kingdom	Bacterias	-5,169	1,346	0,022

Tabla 9. Taxones diferencialmente abundantes importantes para el tratamiento con Blautix frente al tampón de liof. en D14 en el estudio de accidente cerebrovascular

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
25678	Especie	Mucispirillum schaedleri	2,704	0,753	0,012
1379349	Género	Clostridium XIVa	2,517	0,771	0,027
742656	Especie	Oscillibacter valerigenes	1,738	0,459	0,009
558330	Género	Prevotella	-1,634	0,406	0,006
1370810	Especie	Barnesiella intestinihominis	-1,780	0,390	0,001
712755	Especie	Barnesiella intestinihominis	-1,827	0,464	0,006
47662	Especie	Barnesiella intestinihominis	-2,109	0,606	0,014
1640334	Especie	Barnesiella intestinihominis	-2,260	0,693	0,027
1105465	Género	Barnesiella	-2,306	0,627	0,010
161658	Familia	Lachnospiraceae	-2,565	0,816	0,037
277773	Especie	Alistipes finegoldii	-3,619	1,034	0,014
187271	Especie	Ruminococcus flavefaciens	-3,924	1,057	0,010
459041	Especie	Lactobacillus johnsonii	-4,029	0,981	0,006

Sumario

Blautix produce un aumento significativo en la diversidad de la microbiota durante todo el período del estudio en un modelo de accidente cerebrovascular en ratones, en comparación con el tampón de liof. o el vehículo control.

Ejemplo 4 - Efecto protector en modelos de afecciones neuroinflamatorias

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo de ratón de inflamación del SNC que refleja muchos aspectos de la enfermedad humana EM y EAE es el modelo experimental más utilizado para la EM humana. La EAE también se usa más generalmente como modelo para trastornos autoinmunes específicos del SNC [52] y para otras afecciones específicas, incluida la encefalomiелitis diseminada aguda. La EAE se induce usando inmunización con péptidos y adyuvantes de mielina para provocar una respuesta inmunitaria e inflamatoria que se corresponde estrechamente con los mecanismos subyacentes a muchos trastornos autoinmunes e inflamatorios del SNC y, en particular, la EM. Muchas terapias que muestran eficacia en la EAE también han demostrado eficacia en el tratamiento de la EM en pacientes humanos [52]. Lo más importante, la EAE reproduce las características clave de la EM, incluidas inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis. Los efectos de la desmielinización se limitan principalmente a la médula espinal en la EAE, con poca alteración del tronco encefálico y el cerebelo. En la EAE, los linfocitos T CD4+ son la población celular dominante que se encuentra en el SNC.

Metodología

Se usó *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", cepa depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294) como polvo liofilizado y se reconstituyó según se requirió. Se usaron 12 ratones hembra adultos C57BL/6J.

El día 0 y el día 7, se administró a los animales una emulsión que contenía MOG35-55 y adyuvante completo de Freund (CFA) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra mediante inyecciones subcutáneas con anestesia con gas (isoflurano). El día 0, se realizaron dos inyecciones subcutáneas en los flancos; uno en cada uno

de los cuadrantes inferiores de la espalda. El día 7, se realizaron dos inyecciones subcutáneas en los flancos, una en cada uno de los cuadrantes superiores de la espalda.

5 El día 0 y el día 2, se administró a los animales la toxina pertussis (PTx) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante inyecciones intraperitoneales. El día 0, la administración de PTx se realizó después de las inyecciones de MOG.

Los tratamientos con Blautix o controles se administraron desde el día 14 según el siguiente programa:

10 Día 0: MOG/CFA, una vez, S.C.

Día 0: PTx, una vez, I.P.

15 Día 2, PTx, una vez, I.P.

Día 7: MOG/CFA, una vez, S.C.

20 Los tratamientos se administraron en los primeros 15 minutos desde su preparación. Blautix se administró a una dosis de 2×10^8 ; 100 μ l/ratón.

Desde el día 0 hasta el final del experimento, se puntuó a los animales diariamente según los signos clínicos de EAE, incluyendo paresia y parálisis de la cola y/o las extremidades.

25 El día -14, el día -1 y el día 34, se recogieron las pellas fecales de cada animal, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C.

Resultados

30 En la Figura 10 se muestra el efecto del tratamiento con Blautix sobre la microbiota entre los puntos de tiempo (D-14, D-1, D34) para el modelo de EM. Se observó una variación temporal significativa en los perfiles de la microbiota (valor $p = 0,001$) para los puntos de tiempo del estudio.

35 El análisis diferencial utilizando DESeq2 dio taxones diferencialmente abundantes importantes (valor de p ajustado $<0,05$) para el tratamiento con Blautix entre los puntos de tiempo del estudio, como se muestra en la Tabla 10. Los taxones se enumeran en la Tabla 11, la Tabla 12 y la Tabla 13.

Tabla 10. Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo en el estudio de EM.

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

45 **Tabla 11.** Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo D-14 y D-1 en el estudio de EM. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D-1 en comparación con el D-14.

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
50 1105465	Género	Barnesiella	8,076	0,702	2.2E-28
48633	Género	Clostridium XIVa	7,304	0,825	7.0E-17
490405	Especie	Turicibacter sanguinis	6,824	0,778	1.0E-16
55 491106	Especie	Flavonifractor plautii	5,116	0,923	4.3E-07
43241	Género	Clostridium XIVa	5,041	0,739	2.2E-10
948888	Género	Barnesiella	4,649	0,605	4.3E-13
60 47662	Especie	Barnesiella intestinihominis	4,276	0,501	5.1E-16
1288839	Familia	Lachnospiraceae	4,117	1,170	0,003
11297	Familia	Porphyromonadaceae	4,081	0,600	2.2E-10
65 198591	Familia	Lachnospiraceae	3,757	0,788	2.3E-05

(Continuado)

	ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
5	49543	Familia	Lachnospiraceae	3,275	0,897	0,002
	1009304	Especie	Oscillospira guilliermondii	3,140	1,043	0,015
	930464	Especie	Insolitospirillum peregrinum	2,804	1,033	0,029
10	1793164	Género	Parasutterella	2,720	0,576	2.6E-05
	1260915	Kingdom	Bacterias	2,678	0,804	0,006
	36112	Especie	Clostridium leptum	2,584	0,887	0,018
15	181003	Género	Alistipes	2,581	0,555	3.3E-05
	149837	Familia	Lachnospiraceae	2,434	0,678	0,002
	1056232	Género	Clostridium XIVa	2,308	0,856	0,030
20	770554	Especie	Alistipes putredinis	2,223	0,556	0,001
	1176501	Familia	Lachnospiraceae	2,079	0,758	0,028
	33530	Especie	Acetatifactor muris	1,965	0,569	0,004
25	43033	Género	Alistipes	1,788	0,379	2.6E-05
	576748	Familia	Ruminococcaceae	1,740	0,603	0,019
	50759	Especie	Oscillospira guilliermondii	1,570	0,409	0,001
	592877	Especie	Pseudoflavonifractor capillosus	1,512	0,418	0,002
30	712755	Especie	Barnesiella intestinihominis	1,509	0,502	0,015
	375558	Especie	Barnesiella intestinihominis	1,505	0,554	0,029
	307526	Especie	Bacteroides acidifaciens	1,499	0,492	0,014
35	74641	Especie	Bacteroides acidifaciens	1,418	0,532	0,032
	943687	Familia	Porphyromonadaceae	1,162	0,397	0,018
	791734	Género	Clostridium XIVa	-1,064	0,377	0,023
40	19031	Especie	Anaerotruncus colihominis	-1,391	0,516	0,030
	74179	Especie	Alistipes massiliensis	-1,810	0,305	4.7E-08
	211238	Especie	Anaeroplasma abactoclasticum	-2,662	0,859	0,012
45	76239	Familia	Lachnospiraceae	-2,721	0,668	4.2E-04
	743544	Género	Clostridium XIVa	-3,014	0,672	7.0E-05
	993522	Género	Clostridium XIVa	-3,394	0,708	2.2E-05
50	76325	Género	Lactobacillus	-3,621	0,575	5.2E-09

Tabla 12. Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo D-1 y D34 en el estudio de EM. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D34 en comparación con el D-1.

60

65

ES 2 745 135 T3

ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado	
5	1370810	Especie	Barnesiella intestinihominis	4,794	1,196	0,001
	1684470	Especie	Parasutterella excrementihominis	4,434	1,167	0,002
	1070245	Especie	Eubacterium plexicaudatum	3,870	0,961	0,001
10	518034	Especie	Desulfovibrio fairfieldensis	3,867	0,962	0,001
	1482481	Especie	Clostridium disporicum	3,228	1,112	0,029
	567799	Género	Alistipes	3,218	0,864	0,002
15	1404432	Especie	Bacteroides acidifaciens	2,978	0,835	0,004
	1067514	Género	Barnesiella	2,967	0,921	0,011
	76325	Género	Lactobacillus	2,893	0,683	0,001
20	307526	Especie	Bacteroides acidifaciens	2,218	0,351	1.8E-08
	1288839	Familia	Lachnospiraceae	2,084	0,746	0,035
	866478	Especie	Barnesiella intestinihominis	1,936	0,647	0,022
25	23133	Familia	Ruminococcaceae	1,840	0,544	0,007
	472737	Familia	Lachnospiraceae	1,697	0,524	0,011
	842401	Orden	Clostridiales	1,601	0,535	0,022
30	39008	Especie	Bacteroides acidifaciens	1,494	0,390	0,002
	74179	Especie	Alistipes massiliensis	1,426	0,328	3.9E-04
	277773	Especie	Alistipes finegoldii	1,323	0,461	0,029
35	76234	Familia	Lachnospiraceae	-1,183	0,333	0,004
	948888	Género	Barnesiella	-1,453	0,520	0,035
	150155	Familia	Lachnospiraceae	-1,609	0,421	0,002
40	783115	Familia	Desulfovibrionaceae	-2,262	0,608	0,002
	773427	Especie	Anaerotruncus colihominis	-2,443	0,661	0,003
	201157	Familia	Lachnospiraceae	-2,587	0,754	0,006
	596894	Género	Clostridium XIVa	-2,616	0,909	0,029
45	43033	Género	Alistipes	-3,236	0,718	2.2E-04
	1793164	Género	Parasutterella	-3,758	0,632	1.4E-07
	49543	Familia	Lachnospiraceae	-4,849	0,920	5.5E-06
50	490405	Especie	Turicibacter sanguinis	-5,152	0,704	2.5E-11
	48282	Familia	Lachnospiraceae	-5,460	0,666	4.7E-14

55 **Tabla 13.** Taxones diferencialmente abundantes importantes entre los puntos de tiempo D-14 y D34 en el estudio de EM. Un cambio positivo se interpreta con un incremento el D34 en comparación con el D-14.

60

65

ES 2 745 135 T3

	ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
5	1105465	Género	Barnesiella	7,221	0,754	2.1E-19
	48633	Género	Clostridium XIVa	6,734	0,959	8.7E-11
	1288839	Familia	Lachnospiraceae	5,820	0,811	3.5E-11
	518034	Especie	Desulfovibrio fairfieldensis	5,459	0,999	8.3E-07
10	1684470	Especie	Parasutterella excrementihominis	5,289	1,408	0,001
	1482481	Especie	Clostridium disporicum	4,947	1,295	0,001
15	1370810	Especie	Barnesiella intestinihominis	4,734	1,263	0,001
	1070245	Especie	Eubacterium plexicaudatum	4,620	0,794	1.3E-07
	1067514	Género	Barnesiella	4,544	1,103	2.8E-04
20	1575843	Especie	Clostridium ruminantium	4,393	1,743	0,040
	43241	Género	Clostridium XIVa	4,284	0,817	2.4E-06
	47662	Especie	Barnesiella intestinihominis	4,273	0,478	3.8E-17
25	1728285	Género	Lachnospiraceae incertae sedis	4,204	1,221	0,003
	11297	Familia	Porphyromonadaceae	3,921	0,577	3.4E-10
	307526	Especie	Bacteroides acidifaciens	3,539	0,534	9.9E-10
30	198591	Familia	Lachnospiraceae	3,273	0,762	1.4E-04
	236126	Especie	Oscillospira guilliermondii	3,175	1,086	0,015
	930464	Especie	Insolitispirillum peregrinum	3,152	0,848	0,001
35	948888	Género	Barnesiella	3,040	0,629	1.6E-05
	491106	Especie	Flavonifractor plautii	3,039	1,170	0,034
	563211	Familia	Lachnospiraceae	2,564	0,965	0,030
	149837	Familia	Lachnospiraceae	2,562	0,890	0,016
40	770554	Especie	Alistipes putredinis	2,520	0,455	6.2E-07
	1260915	Kingdom	Bacterias	2,505	0,677	0,001
	36112	Especie	Clostridium leptum	2,483	0,916	0,026
45	1056232	Género	Clostridium XIVa	2,319	0,664	0,002
	39008	Especie	Bacteroides acidifaciens	2,107	0,274	9.9E-13
	23133	Familia	Ruminococcaceae	2,049	0,614	0,004
50	74641	Especie	Bacteroides acidifaciens	2,002	0,457	1.0E-04
	712755	Especie	Barnesiella intestinihominis	1,977	0,470	2.0E-04
	277773	Especie	Alistipes finegoldii	1,881	0,388	1.6E-05
55	1404432	Especie	Bacteroides acidifaciens	1,805	0,563	0,006
	1176501	Familia	Lachnospiraceae	1,654	0,630	0,032
	544582	Especie	Flavonifractor plautii	1,418	0,540	0,032
60	76234	Familia	Lachnospiraceae	-0,991	0,389	0,038
	80190	Familia	Lachnospiraceae	-1,113	0,348	0,006
	182471	Orden	Clostridiales	-1,315	0,472	0,021
	494032	Especie	Clostridium oroticum	-1,502	0,580	0,034
65	2367602	Orden	Clostridiales	-1,518	0,472	0,006

(Continuado)

	ID UTO	Nivel más bajo	Clasificación	log2 del cambio	Error estándar	valor de p ajustado
5	74771	Especie	Alistipes massiliensis	-1,617	0,408	0,001
	172154	Género	Clostridium XIVA	-1,628	0,442	0,001
10	993522	Género	Clostridium XIVA	-1,799	0,594	0,011
	791734	Género	Clostridium XIVA	-1,842	0,387	2.2E-05
	150155	Familia	Lachnospiraceae	-1,859	0,532	0,002
15	743544	Género	Clostridium XIVA	-2,196	0,558	0,001
	567799	Género	Alistipes	-2,378	0,513	3.9E-05
	96345	Género	Clostridium XIVA	-2,528	0,667	0,001
20	19031	Especie	Anaerotruncus colihominis	-2,575	0,610	1.9E-04
	201157	Familia	Lachnospiraceae	-2,615	0,866	0,011
	578360	Familia	Lachnospiraceae	-2,870	0,586	1.4E-05
25	76239	Familia	Lachnospiraceae	-3,325	0,631	2.3E-06
	1165458	Familia	Lachnospiraceae	-3,346	0,754	8.1E-05
	773427	Especie	Anaerotruncus colihominis	-3,475	0,776	7.0E-05
30	209309	Familia	Lachnospiraceae	-3,639	1,042	0,002
	320120	Género	Clostridium XIVA	-3,670	0,811	5.9E-05
	1628488	Especie	Vallitalea guaymasensis	-4,144	1,538	0,027
35	48282	Familia	Lachnospiraceae	-4,653	1,012	4.5E-05
	77091	Género	Clostridium	-7,493	1,192	7.9E-09

40 **Sumario**

Blautix produce un aumento significativo en la diversidad de la microbiota y da como resultado una variación temporal significativa durante el tratamiento en un modelo animal para esclerosis múltiple.

45 **Secuencias**

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

50 1 tgcaagtcga gccaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
 61 gcggacgggt gagtaacgcy tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaac
 55 121 ggctgctaata accgcataag cgcacggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccgggtg

60

65

ES 2 745 135 T3

181 tatgagatgg acccgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggcccac caaggcgacg
 241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
 5 301 ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc
 361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcaggaaga aaatgacggt
 421 acctgactaa gaagccccg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagggggca
 10 481 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
 15 721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaagc
 781 tcttcgggtc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
 841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag
 20 901 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaacctt
 961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgctcgc agctcgtgc gtgagatggt
 1021 gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc
 25 1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
 1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc
 1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
 1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg
 30 1321 ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagttagta acgcccgaag tc

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

35 1 caagtcgaac ggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 40 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
 181 aagatggacc cgcgttgat tagcttgttg gtgggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc
 241 catagccggc ctgagagggg gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 45 301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccg
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca ggaagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gccccgcta actacgtgcc agcagcccg gtaatacgt gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 50 541 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgcat acttgagtgc cggaggggta
 601 agcggaaatt ctagttagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
 661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aacaggatt
 55 721 agataccctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
 60 901 acgcgaagaa ccttaccag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggatctttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctcgtgctgt gagatgttg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcaat
 65 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaaggaag cgagattgtg

ES 2 745 135 T3

1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cggatgaatac gttccccgggt
5 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtctg aacaaggt

SEQ ID NO:3 (secuencia consenso del ARNr 16S sequence para la cepa 830 de *Blautia stercoris*)

10

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
CGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATAACAGGGGATAACA
15 GTTGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
20 CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG
TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
25 AAATGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
30 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGAGCAAACGCAA
TAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTGTAATGGAACCTT
35 TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
AAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACAGTGTACAATGGCGTAAACAAAGGG
40 AAGCGAGCCCGGAGGGGAGCAAATCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCGTCAC
45 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
GGGTGAAGTCTAGGGGT

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

55

60

65

ES 2 745 135 T3

5
10
15
20
25
30
35
40

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGGGTAACCTGCCTTAT
ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
CGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTAAAGGCATGGGCTCAACCT
GTGGACTGCATTGGAACTGTCATACTTGTAGTGCCGGAGGGTAAGCGGAATCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTCNNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
CCGTCGCAAACGCAGTAAGTATCCACCTGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCCCTGACCGA
TCCTTAACCGGATCTTTCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTAAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
GGGATAACCTGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGTAAACAAAGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

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

45
50
55
60
65

ES 2 745 135 T3

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
5 61 tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcgacgggt gagtaacgag tgggtaacct
121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt
181 cgcatagaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcttg gattagctag
241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggctgagag ggtgaacggc
10 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtgagg gaatattgca
361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggatgtaa
421 acttctatca gcagggaaga aagtgcggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
15 481 gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtga
20 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt
721 tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaa
781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtc cgcagcaaac gcaataagta
25 841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca
901 caagcgttg agcatgtgtg ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac
961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca
30 1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
1141 gaggaagtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
35 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctg agcaaatctc aaaaataacg
1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctctgta cacaccgccc gtcacaccat
40 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtg
1441 gactgataac tggggtga

45 REFERENCIAS

- [1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
[2] Tap et al. (2009), *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84
50 [3] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
[4] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
55 [5] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
[6] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
[7] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
60 [8] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
[9] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
65 [10] documento WO 2013/050792

- [11] documento WO 03/046580
- [12] documento WO 2013/008039
- 5 [13] documento WO 2014/167338
- [14] Lee y Lee (2014) *World J Gastroenterol.* 20(27): 8886-8897.
- [15] Xie et al. (2016) *Journal Dairy Sci.* 99:6913-6921
- 10 [16] documento WO 01/85187
- [17] documento WO2016/086161
- 15 [18] YQ et al. (2016), *J. Dig. Dis.*, "Therapeutic Modulation of the Gut Microbiota in IBD - More Questions to Be Answered", Oct 15, 1751-2980, 12422, publicación electrónica previa a la impresión.
- [19] Lozupone (2012). *Nature.* 2012 September 13; 489 (7415): 220-230
- 20 [20] Claesson, et al. (2012) *Nature*, 488, 178-184.
- [21] Hansen, et al., (2010), *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 26(6): 564-571.
- [22] Turnbaugh et al. *Nature*, 457(7228): 480-484.
- 25 [23] Wang et al. (2009) *ISME J.* 3(8): 944-954.
- [24] Faith et al. (2013), *Science*, 341(6141): 1237439
- 30 [25] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [26] Bernalier et al. (1996) *Arch. Microbiol.* 166 (3), 176-183.
- [28] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- 35 [29] Srůtková et al. (2011) *J Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [30] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- 40 [31] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. por Day y McLellan, Humana Press.
- [32] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [33] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- 45 [34] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [35] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller
- 50 [36] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [37] documento US 2016/0067188
- [38] *Handbook of Microbiological Media*, Cuarta edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- 55 [39] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [40] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- 60 [41] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [42] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [43] *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 65

[44] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

5 [45] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[46] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)

10 [47] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).

[48] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[49] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col. eds., 1987) Supplement 30,

15 [50] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

[51] Meyza y Blanchard (2017) Neurosci Biobehav Rev.;76(Pt A):99-110

20 [52] Constantinescu et al. (2011) Br J Pharmacol. 164(4):1079-1106

Listado de secuencias

<110> 4D Pharma PLC

25 <120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS

<130> P069516WO

30 <141> 12/12/2017

<150> GB1621123.7

<151> 12/12/2016

35 <160> 5

<170> SeqWin2010, versión 1.0

40 <210> 1

<211> 1372

<212> ADN

45 <213> Blautia stercoris

<400> 1

50

55

60

65

ES 2 745 135 T3

5 tgcaagt cga gcaagcgcct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg 60
 gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac 120
 ggtgctaat accgcataag cgcacgggat cgcatgatac agtgtgaaaa actccggtgg 180
 tatgagatgg acccgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggcccac caaggcgacg 240
 10 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc 300
 ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc 360
 gcgtgaagga agaagtatct cggatgtaa acttctatca gcagggaaga aatgacggt 420
 15 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca 480
 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg 540
 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag 600
 20 gtaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc 660
 gaagcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg 720
 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaagc 780
 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg 840
 25 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag 900
 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt 960
 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcgtgtc gtgagatggt 1020
 30 ggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc 1080
 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aatcatcat 1140
 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc 1200
 35 gcgaggggga gcaaatcca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac 1260
 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccg 1320
 ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc 1372

40
 <210> 2
 <211> 1438
 45 <212> ADN
 <213> *Blautia wexlerae*
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 19
 55 <223> "n" es a, c, g o t
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> 19
 <223> "n" es a, c, g o t
 65 <400> 2

ES 2 745 135 T3

5 caagtcgaac ggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg 60
 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc 120
 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat 180
 aagatggacc cgcgttggat tagcttggtg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc 240
 10 catagccggc ctgagagggg gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta 300
 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccg 360
 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca ggaagatag tgacggtacc 420
 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagcccg gtaatacgt gggggcaagc 480
 15 gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggg gtggcaagtc tgatgtgaaa 540
 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta 600
 agcgggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa 660
 20 ggcggccttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aacaggatt 720
 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca 780
 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa 840
 25 actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca 900
 acgcgaagaa ccttaccag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatctttcc 960
 ttcgggacag gcgagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatggtgg 1020
 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggact 1080
 30 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc 1140
 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggag cgagattgtg 1200
 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac 1260
 35 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cgggtaatac gttcccgggt 1320
 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac 1380
 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt 1438

40

<210> 3

<211> 1481

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> consenso 16s para *Blautia stercoris*

55

<400> 3

60

65

ES 2 745 135 T3

5 tttkgtctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgagcgaagc 60
 gcttacgaca gaaccttcgg ggaagatgt aagggactga gcggcggacg ggtgagtaac 120
 gCGTGGGtaa cctgcctcat acagggggat aacagttgga aacggctgct aataccgcat 180
 aagcgcacag tatcgcataa tacagtgtga aaaactccgg tggatgaga tggacccgCG 240
 10 tctgattagc tagttggagg ggtaacggcc caccaaggcg acgatcagta gccggcctga 300
 gagggtgaac ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt 360
 ggggaatatt gcacaatggg gaaaccctg atgcagcgac gccgcgtgaa ggaagaagta 420
 tctcggatag taaacttcta tcagcagga agaaaatgac ggtacctgac taagaagccc 480
 15 cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg gcaagcgtaa tccggattta 540
 ctgggtgtaa agggagcgtg gacggaagag caagtctgat gtgaaaggct ggggcttaac 600
 cccaggactg cattggaaac tgtttttctt gagtgccgga gaggtaagcg gaattcctag 660
 tgtagcggtg aatgCGtag atattaggag gaacaccagt ggcgaaggcg gcttactgga 720
 20 cgtaactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag 780
 tccacgccgt aaacgatgaa tactaggtgt tggggagcaa agctcttcgg tcccgagca 840
 aacgcaataa gtattccacc tggggagtac gttcgaaga atgaaactca aaggaattga 900
 25 cggggacccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttattcga agcaacgcga agaaccttac 960
 caagtcttga catcgatctg accggttcgt aatggaacct ttccttcggg acagagaaga 1020
 caggtggtgc atggttgcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacCG 1080
 agcgaaccc ctatcgtcag tagccagcag gtaaagctgg gcactctgag gagactgcca 1140
 30 gggataacct ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcctc atgcccctta tgatttgggc 1200
 tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgcgc cgcgcagggg gagcaaatcc 1260
 caaaaataac gtcccagttc ggactgcagt ctgcaactcg actgcacgaa gctggaatcg 1320
 35 ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcgggtg aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc 1380
 cgtcacacca tgggagtcag taacgcccga agtcagtgac ccaaccttag ggagggagct 1440
 gccgaaggcg ggattgataa ctgggggtgaa gtctaggggg t 1481

40 <210> 4
 <211> 1384
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> consenso 16s para Blautia wexlerae
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> 749
 <223> "n" es a, c, g o t
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 749
 65 <223> "n" es a, c, g o t

ES 2 745 135 T3

<400> 4

	ttcattgaga	cttcggtgga	tttagattct	atctctagt	gcggacgggt	gagtaacgcg	60
5	tgggtaacct	gccttataca	gggggataac	agtcagaaat	ggctgctaat	accgcataag	120
	cgcacagagc	tgcattggctc	agtgtgaaaa	actccggtgg	tataagatgg	acccgcgttg	180
	gattagcttg	ttggtgggg	aacggccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag	240
10	ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gcccagactc	ctacgggagg	cagcagtggg	300
	gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct	360
	cggatgtaa	acttctatca	gcagggaaaga	tagtgacggt	acctgactaa	gaagccccgg	420
	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatc	gtagggggca	agcgttatcc	ggatttactg	480
15	ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggtgtggcaa	gtctgatgtg	aaaggcatgg	gctcaacctg	540
	tggactgcat	tggaaactgt	catacttgag	tgccggaggg	gtaagcggaa	ttcctagtgt	600
	agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggaggaa	caccagtggc	gaaggcggct	tactggacgg	660
	taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	720
20	acgccgtaaa	cgatgaatac	taggtgtcng	gggagcatgg	ctcttcggtg	ccgtcgcaa	780
	cgcagtaagt	attccacctg	gggagtacgt	tcgcaagaat	gaaactcaa	ggaattgacg	840
	gggacccgca	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	900
25	aagtcttgac	atccgcctga	ccgatcctta	accggatctt	tccttcggga	caggcgagac	960
	aggtggtgca	tggttgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgcaacga	1020
	gcgcaacccc	tatcctcagt	agccagcatt	taagggtggc	actctgggga	gactgccagg	1080
	gataacctgg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aatcatcat	gccccttatg	atctgggcta	1140
30	cacacgtgct	acaatggcgt	aaacaaagg	aagcgagatc	gtgagatgga	gcaaaccga	1200
	aaaataacgt	cccagttcgg	actgtagtct	gcaacccgac	tacacgaagc	tggaatcgct	1260
	agtaatcgcg	gatcagaatg	ccgcggtgaa	tacgttccc	ggtctgtac	acaccgccc	1320
35	tcacaccatg	ggagttagta	acgcccgaag	tcagtgcct	aactgcaaag	aaggagctgc	1380
	cgaa						1384

<210> 5

40 <211> 1458

<212> ADN

45 <213> *Blautia hydrogenotrophica*

<220>

<221> misc_feature

50 <222> 1416

<223> "n" es a, c, g o t

<220>

55 <221> misc_feature

<222> 1416

60 <223> "n" es a, c, g o t

<400> 5

65

ES 2 745 135 T3

gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga 60
 tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcgacgggt gagtaacgcg tgggtaacct 120
 5 gccctataca gggggataac agttagaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt 180
 cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcttg gattagctag 240
 ttggtgaggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc 300
 10 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca 360

 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa 420
 acttctatca gcaggaaga aagtgacggg acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt 480
 15 gccagcagcc ggggtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg 540
 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat 600
 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa 660
 20 tgcgtagata ttagggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt 720
 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa 780
 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtc cgcagcaaac gcaataagta 840
 25 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaa ggaattgacg gggacccgca 900
 caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aatcttgac 960
 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca 1020
 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1080
 30 tattcttagt agccagcag tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg 1140
 gaggaagggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc 1200
 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg 1260
 35 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320
 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctctgta cacaccgccc gtcacaccat 1380
 gggagttagt aacggccgaa gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtgg 1440
 40 gactgataac tgggggtga 1458

 45

 50

 55

 60

 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie. *Blautia hydrogenotrophica*, para su uso en el tratamiento o prevención del síndrome del intestino irritable en el que el tratamiento o prevención comprende aumentar la diversidad de la microbiota en el sujeto.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene menos de 99 especies bacterianas diferentes y/o menos de 190 cepas bacterianas diferentes en su microbiota.
- 10 3. La composición para el uso en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el aumento en la diversidad de la microbiota es para bacterias no acetogénicas o es para bacterias acetogénicas y no acetogénicas.
4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que:
- 15 (a) el sujeto es un sujeto anciano frágil o
- (b) el sujeto es un bebé que ha nacido por cesárea.
- 20 5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la diversidad de la microbiota aumenta en el intestino y/o en el intestino distal del sujeto.
6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la cepa bacteriana es la bacteria *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294.
- 25 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que:
- (a) la composición es para administración oral; y/o
- 30 (b) la composición comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables; y/o
- (c) la cepa bacteriana se liofiliza; y/o
- 35 (d) la cepa bacteriana es viable; y/o
- (e) la cepa bacteriana es capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino.
- 40 8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una sola cepa de *Blautia hydrogenotrophica*.
9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende *Blautia hydrogenotrophica* y no comprende bacterias de ningún otro género o comprende otras bacterias solo en cantidades mínimas.
- 45 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende *Blautia hydrogenotrophica* y no comprende bacterias de ninguna otra especie o comprende tales otras bacterias solo en cantidades mínimas.
- 50 11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende *Blautia hydrogenotrophica* como parte de un consorcio microbiano.
12. Un producto alimenticio que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 55 13. Una composición de vacuna que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para el uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

60

65

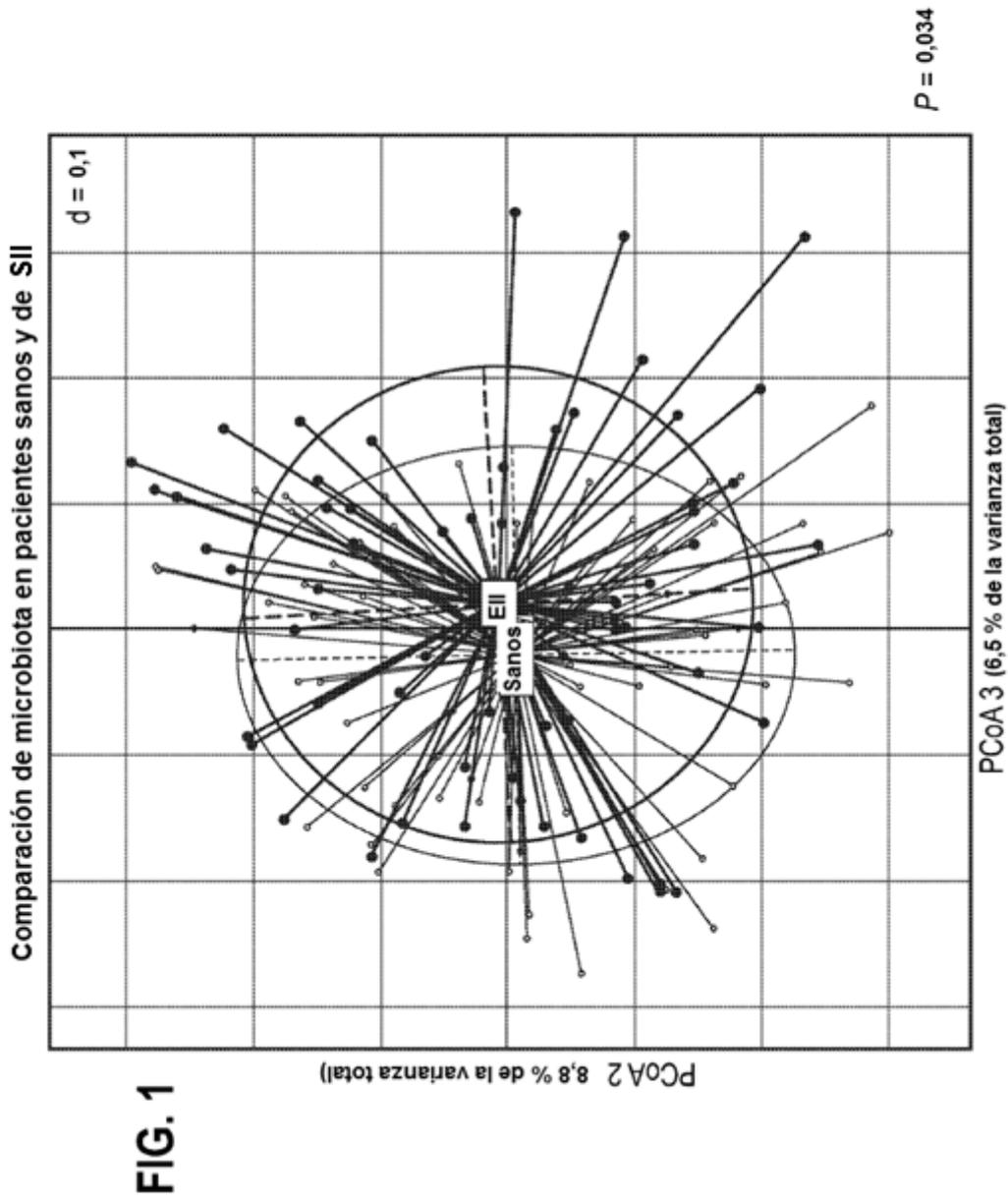


FIG. 1

FIG. 2
Diversidad de Shannon
Dia 16 frente a Dia 1

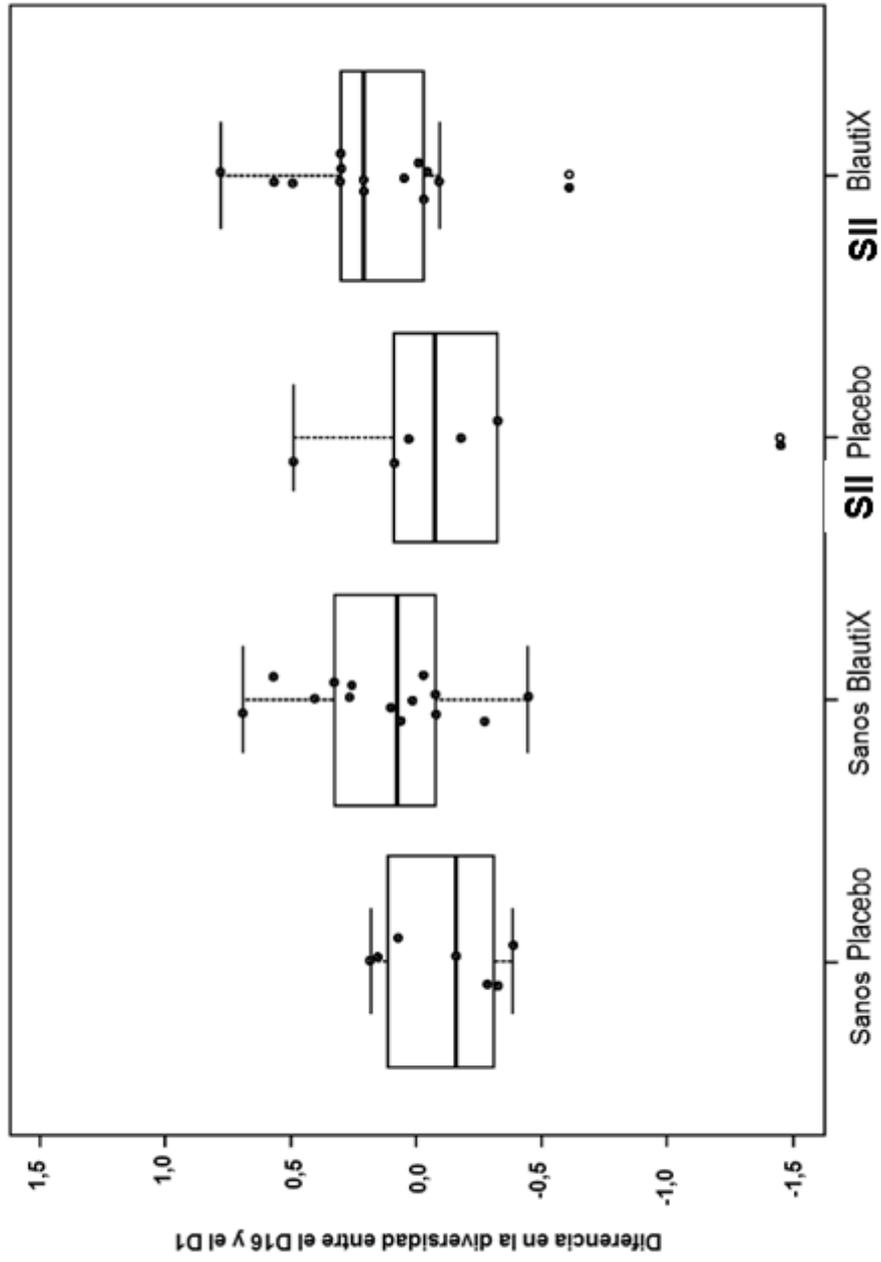
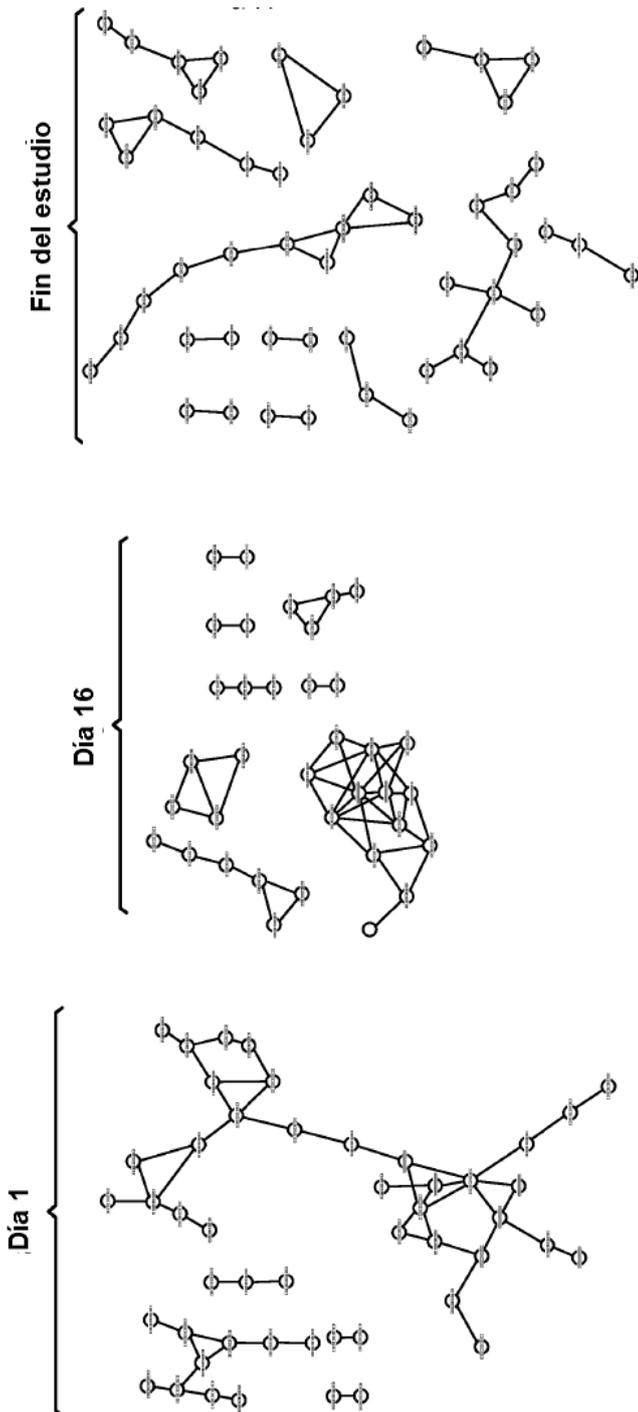
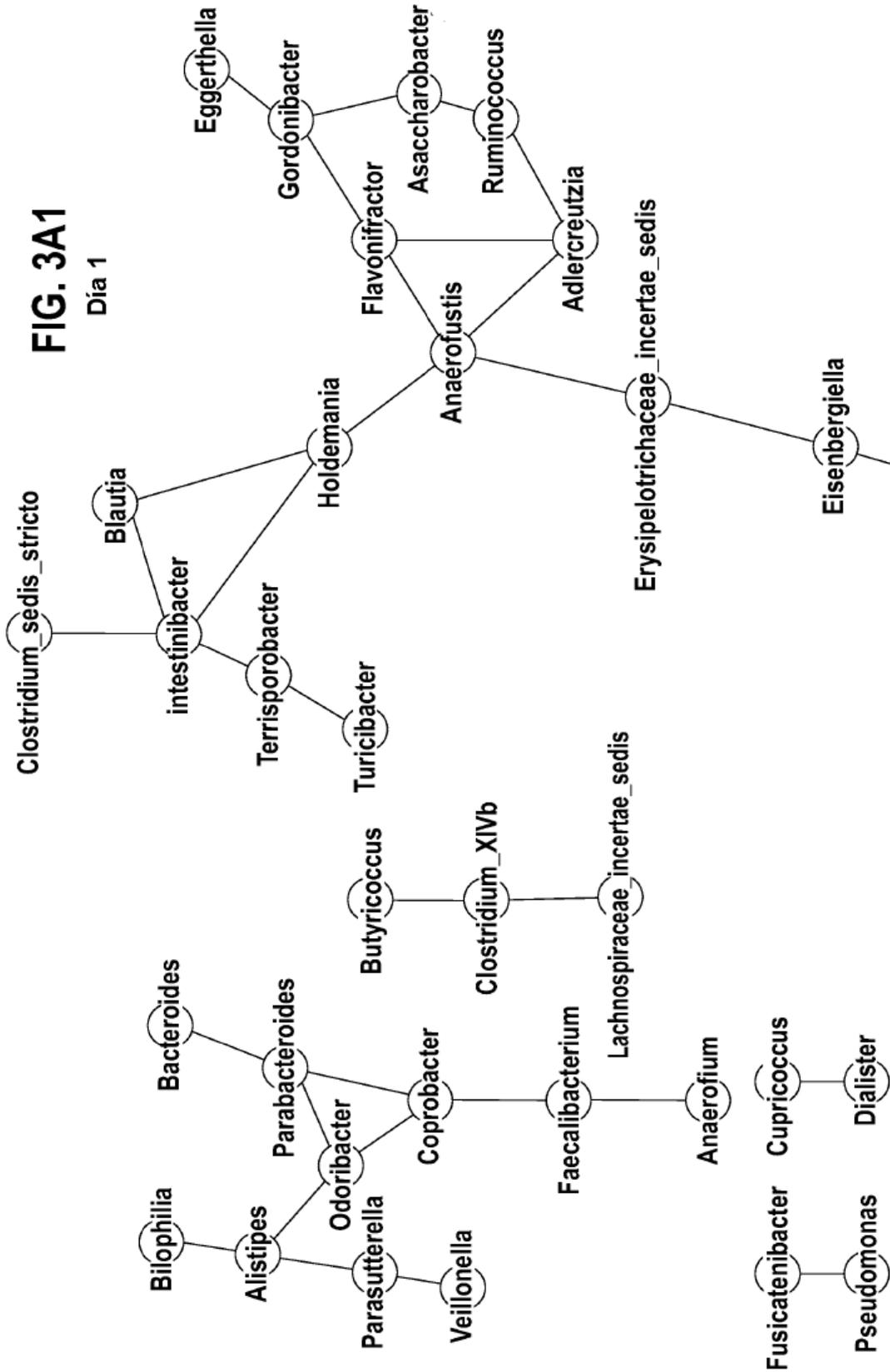


FIG. 3A
Individuos sanos





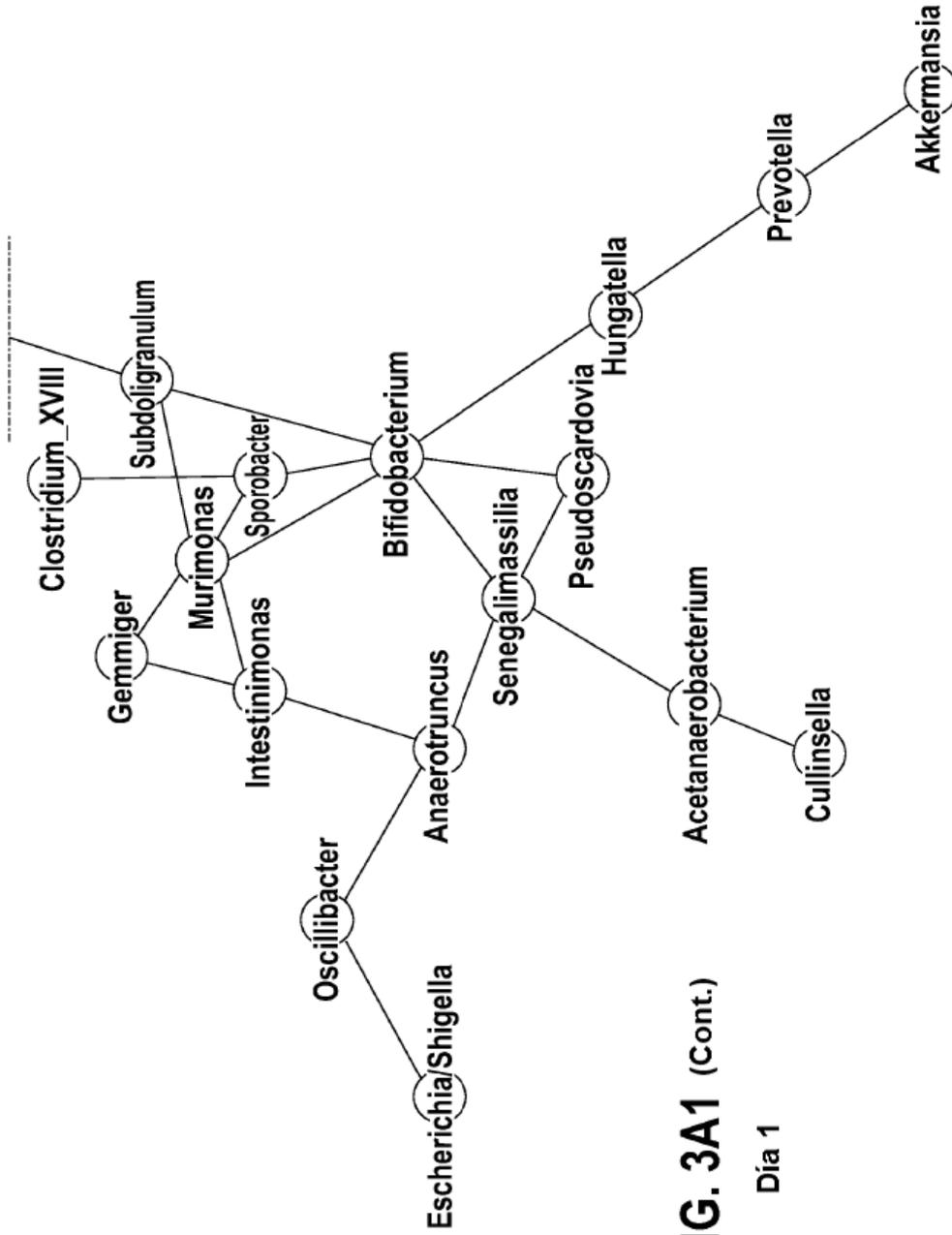
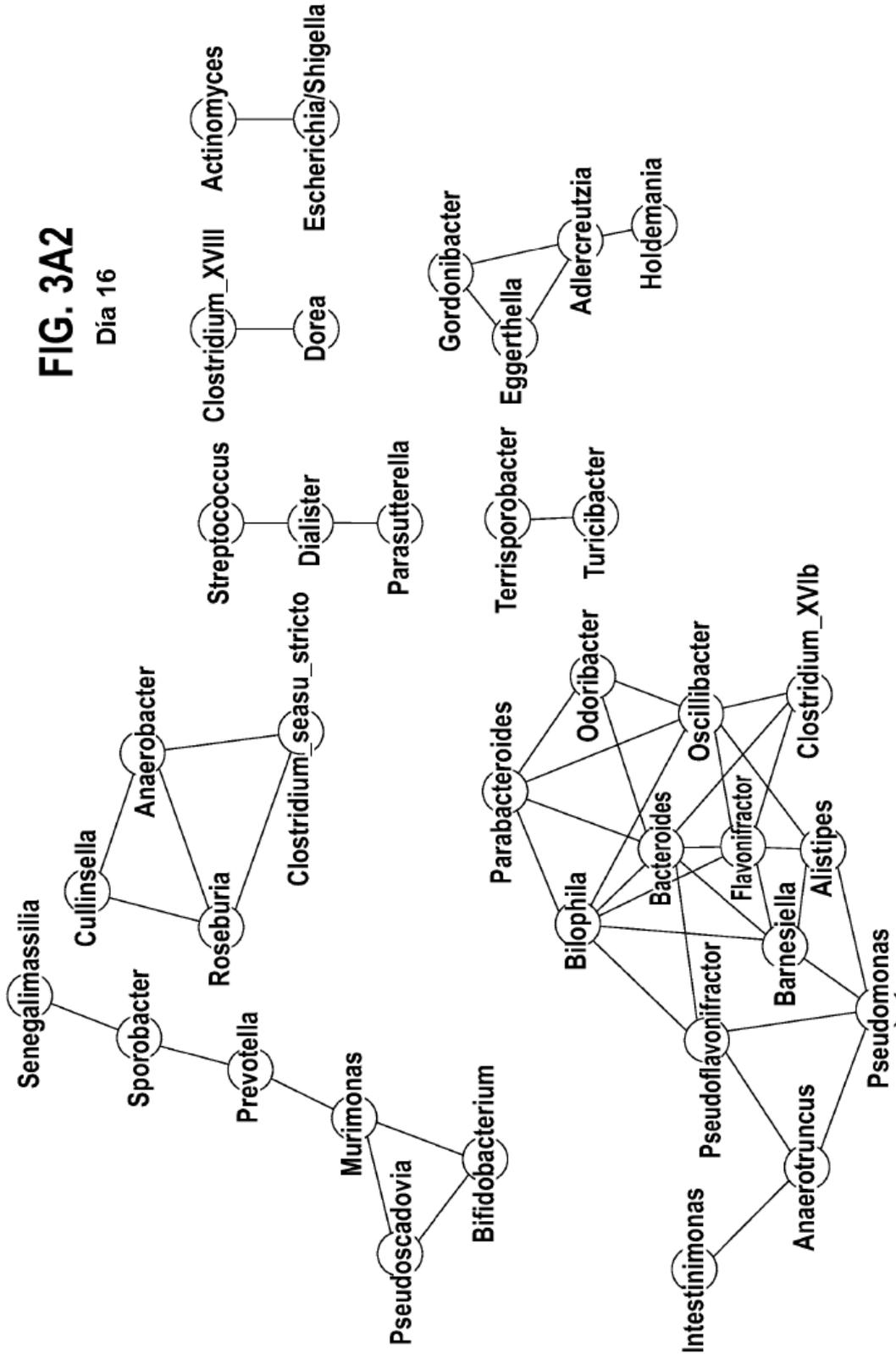


FIG. 3A1 (Cont.)

Día 1



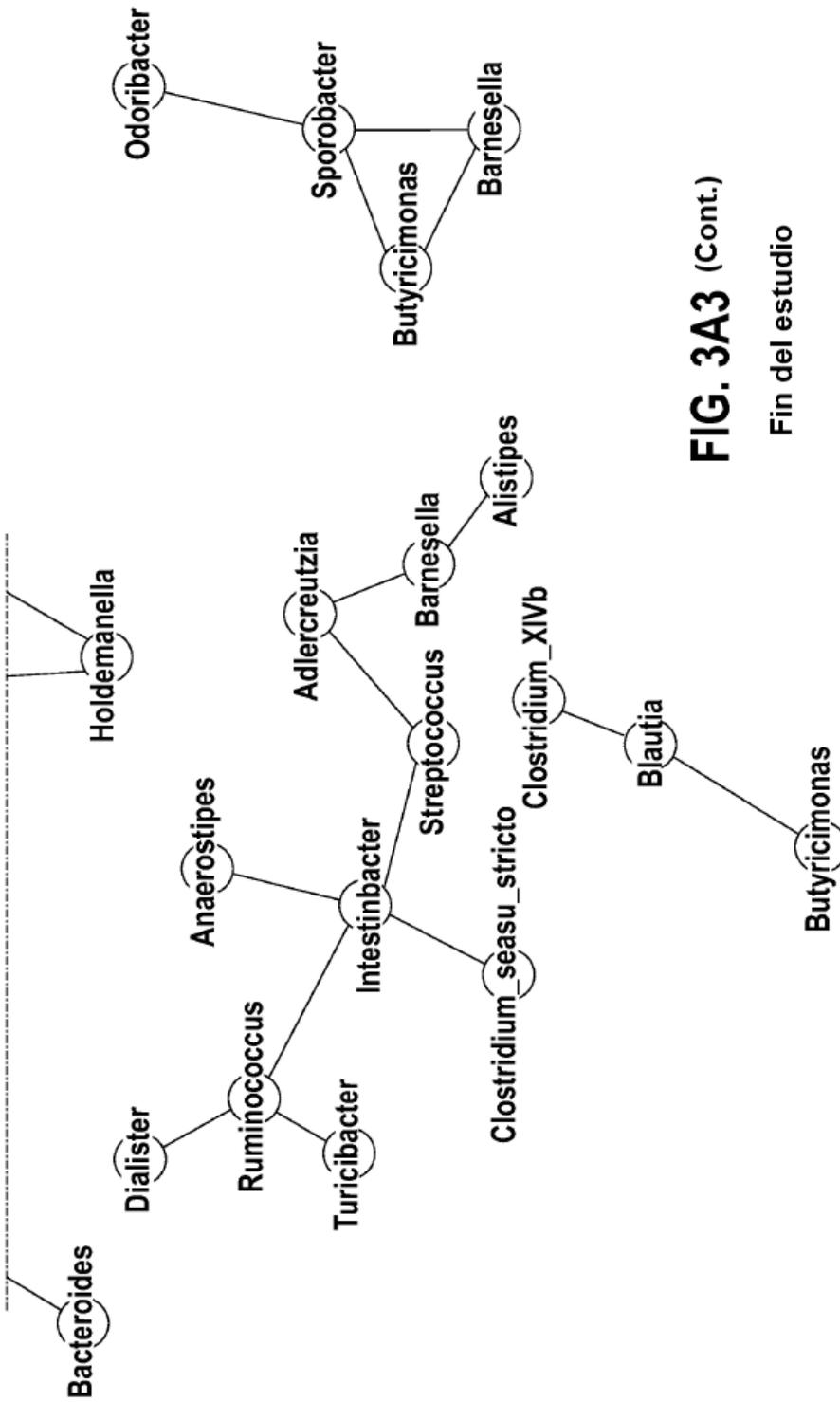


FIG. 3A3 (Cont.)

Fin del estudio

FIG. 3B

Pacientes de SII

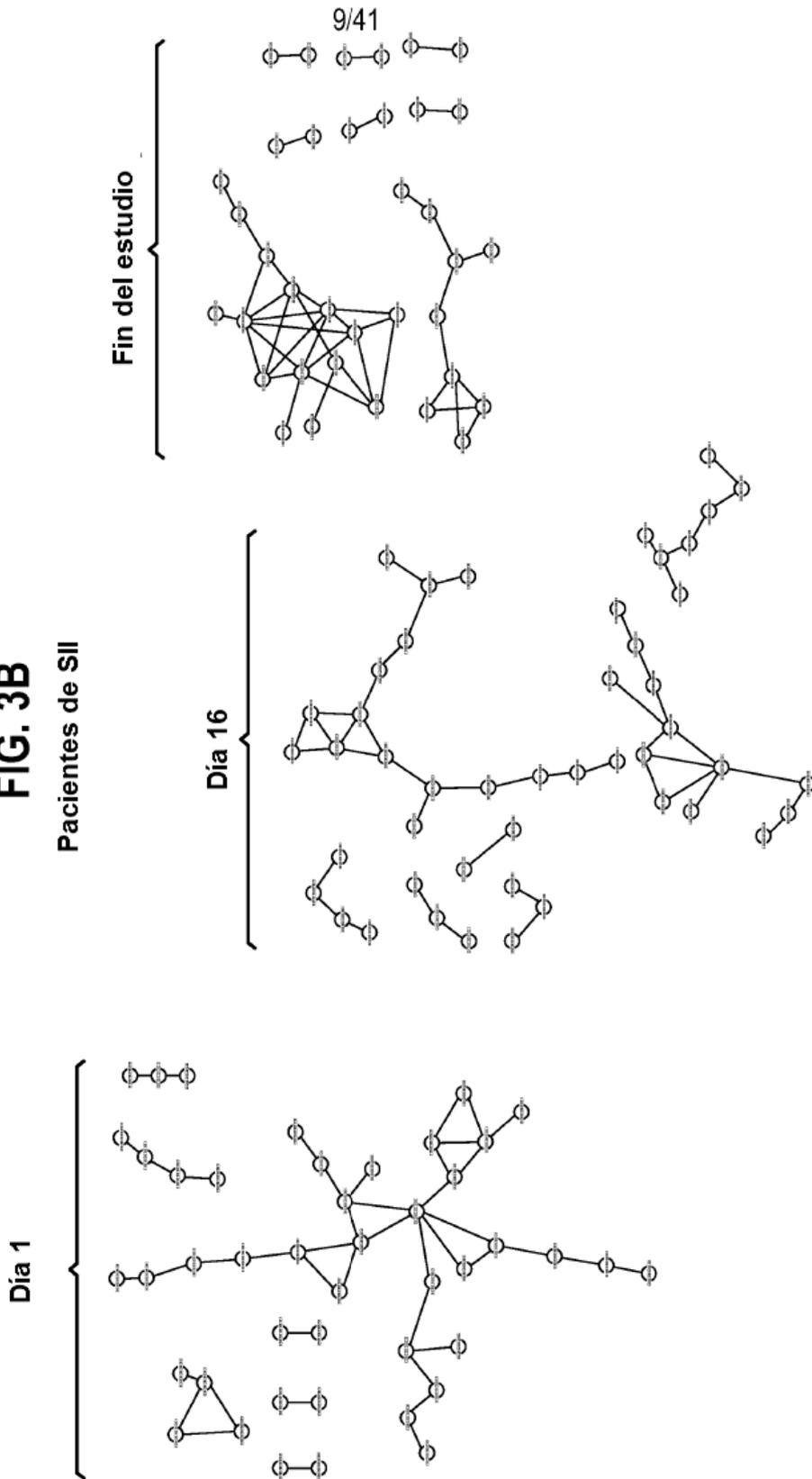


FIG. 3B1
Día 1

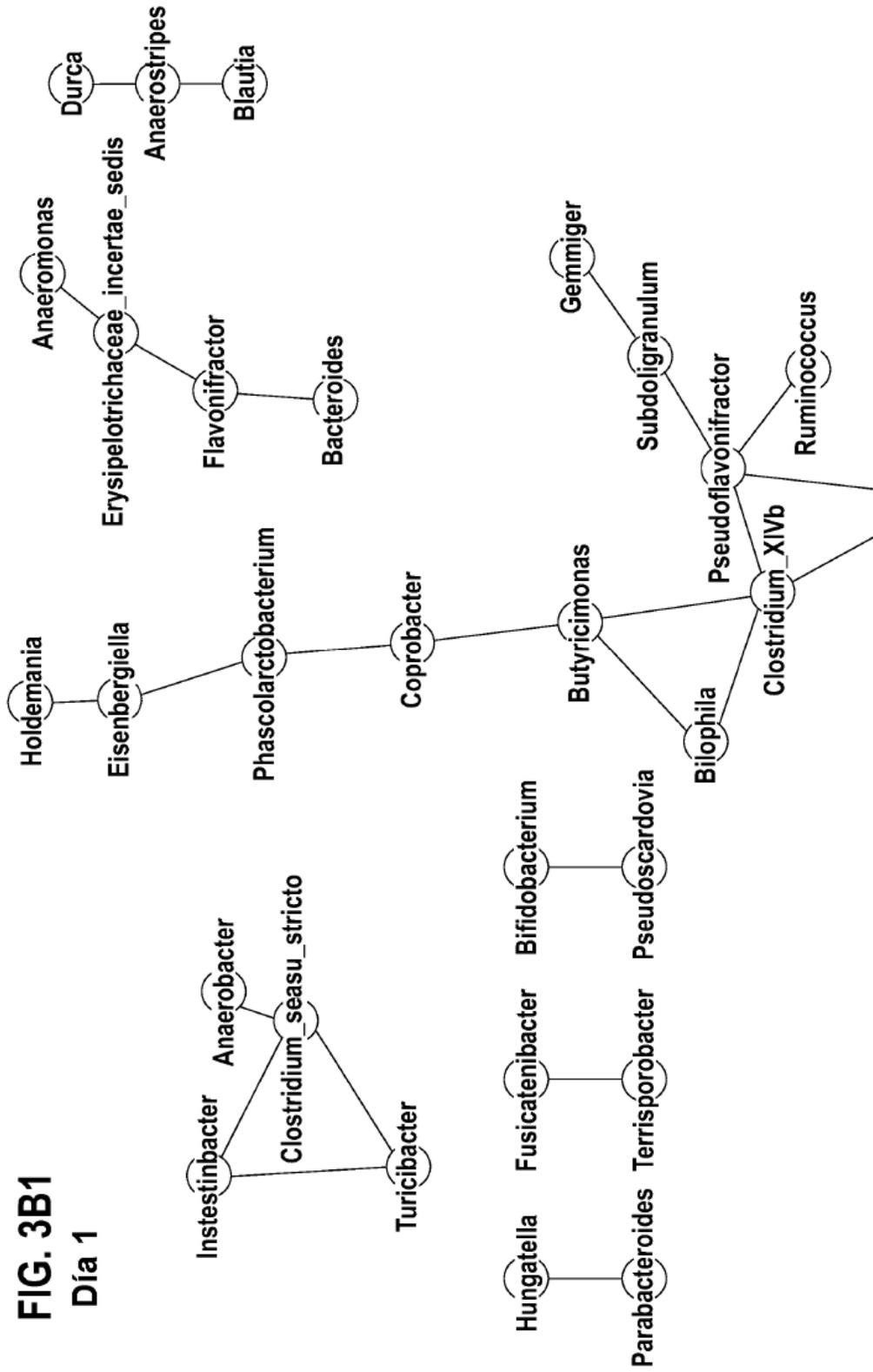


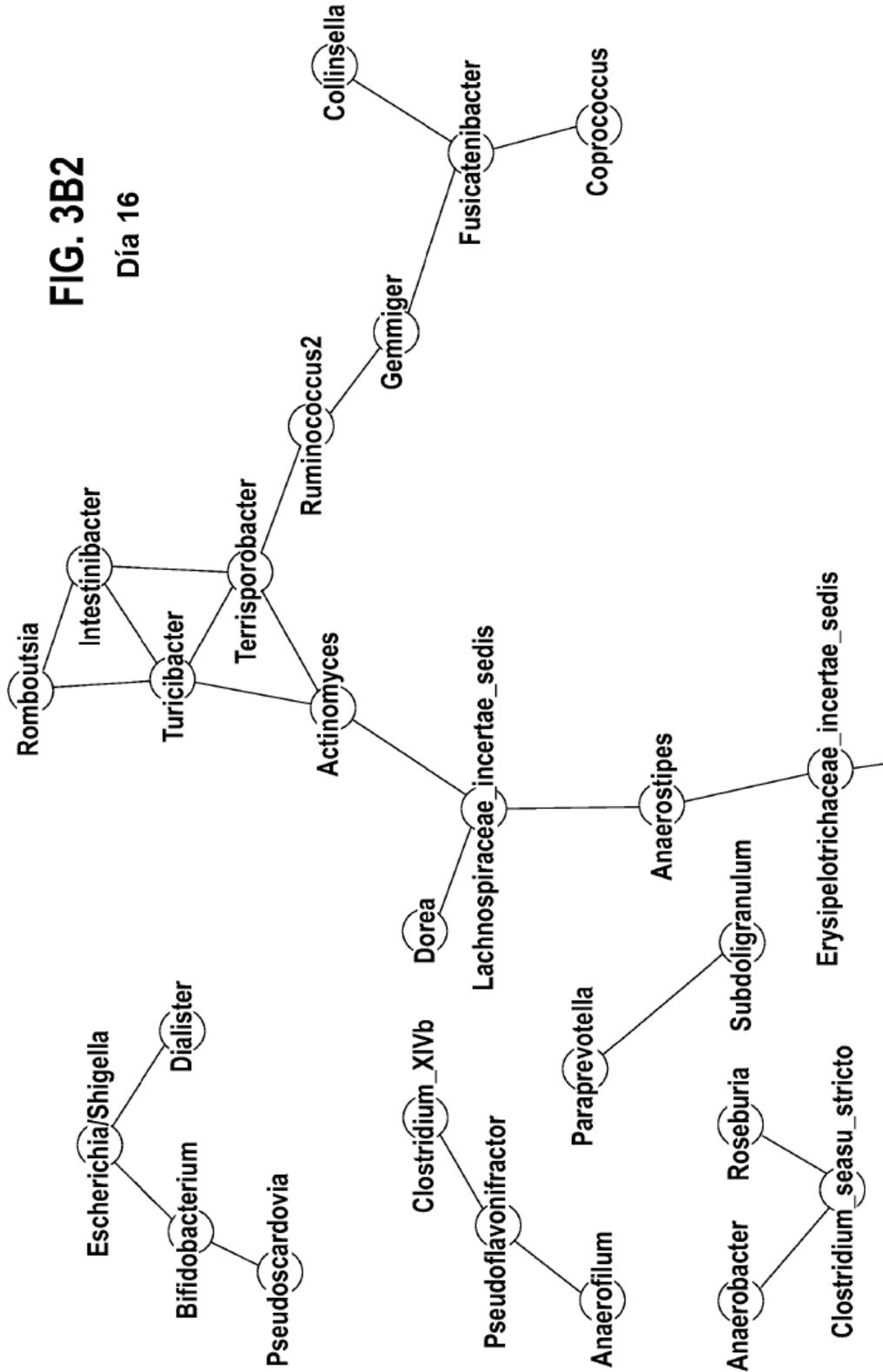


FIG. 3B1 (Cont.)

Día 1

FIG. 3B2

Día 16



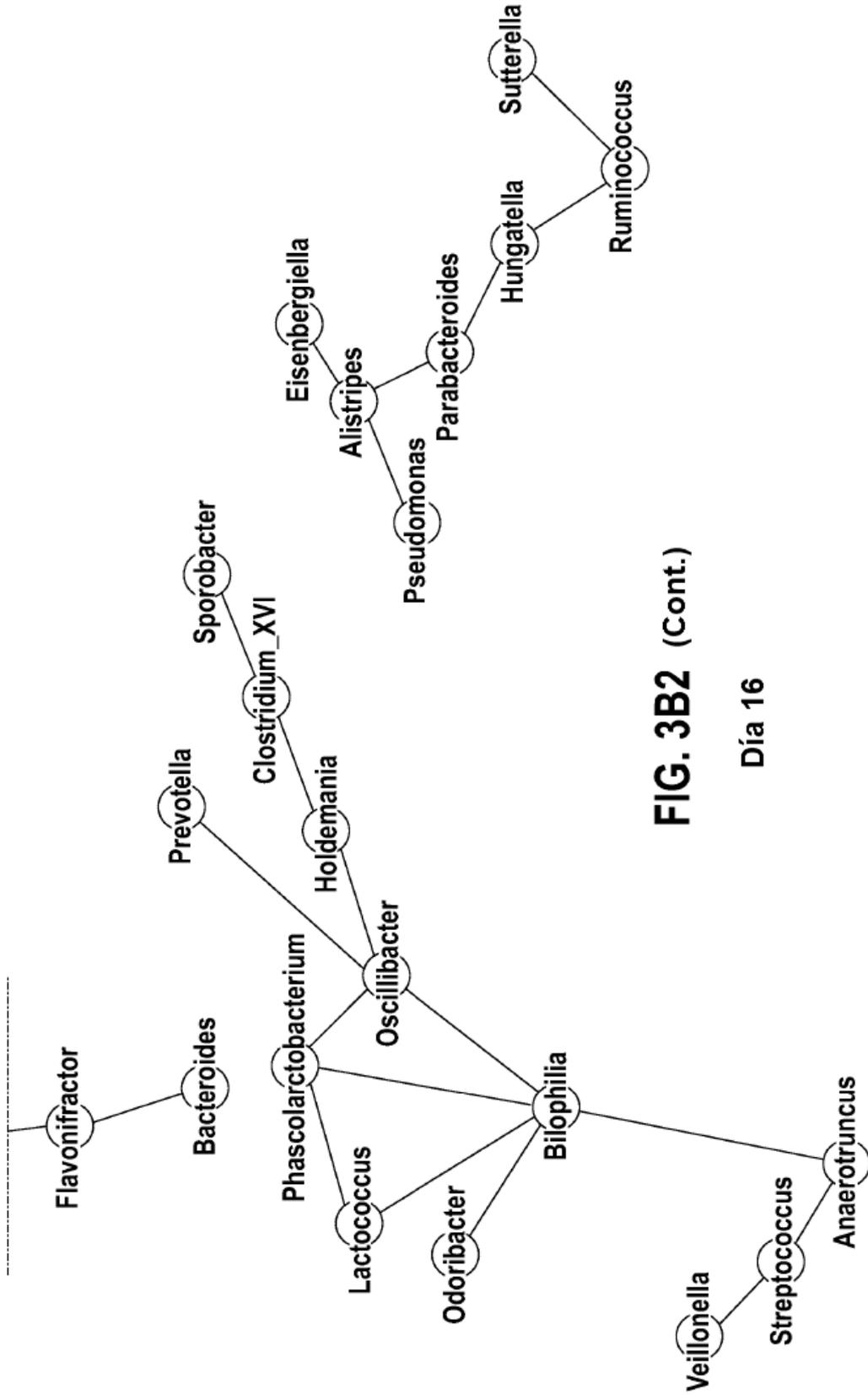


FIG. 3B2 (Cont.)

Día 16

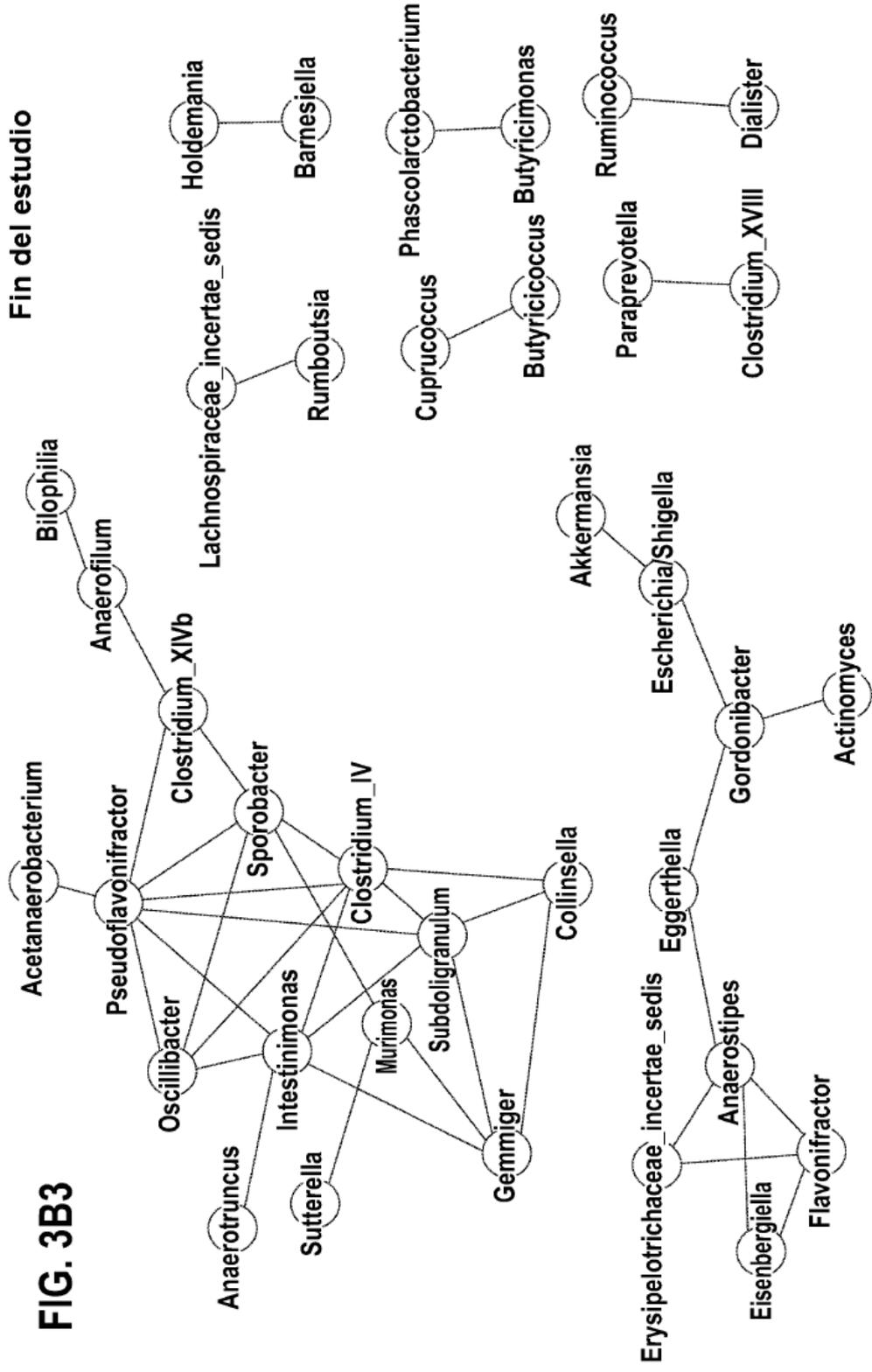


FIG. 4A
Disimilitud de Bray-Curtis entre
Día 16 frente a Día 1

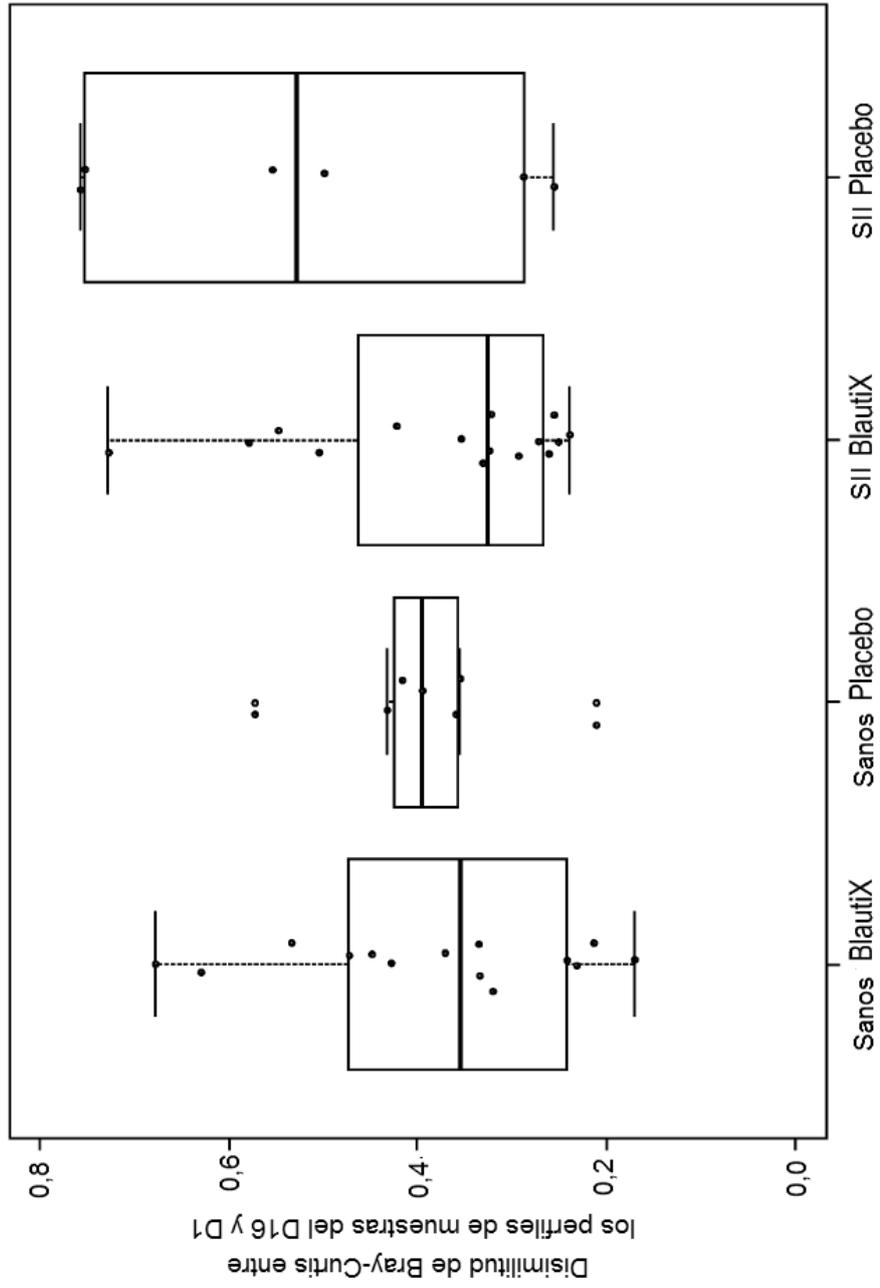


FIG. 4B

Disimilitud de Bray-Curtis
Fin del estudio frente al día 1

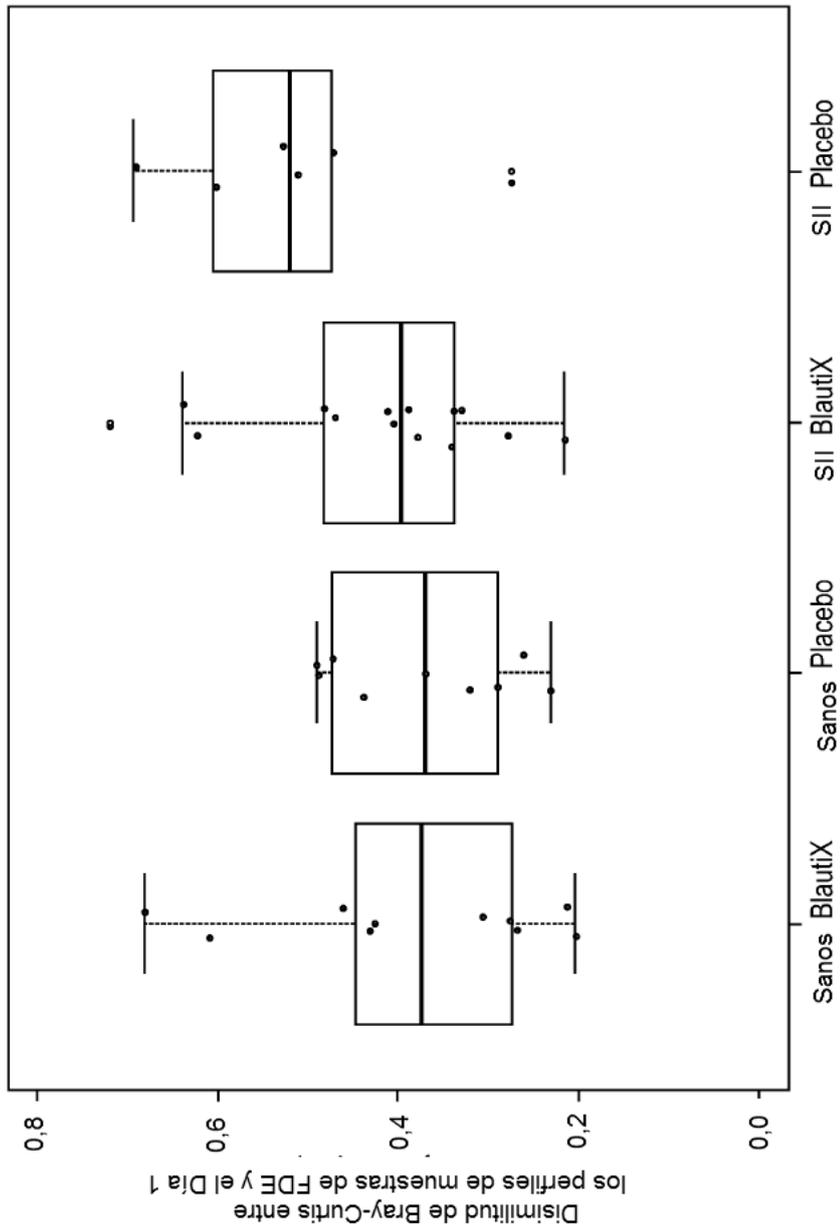
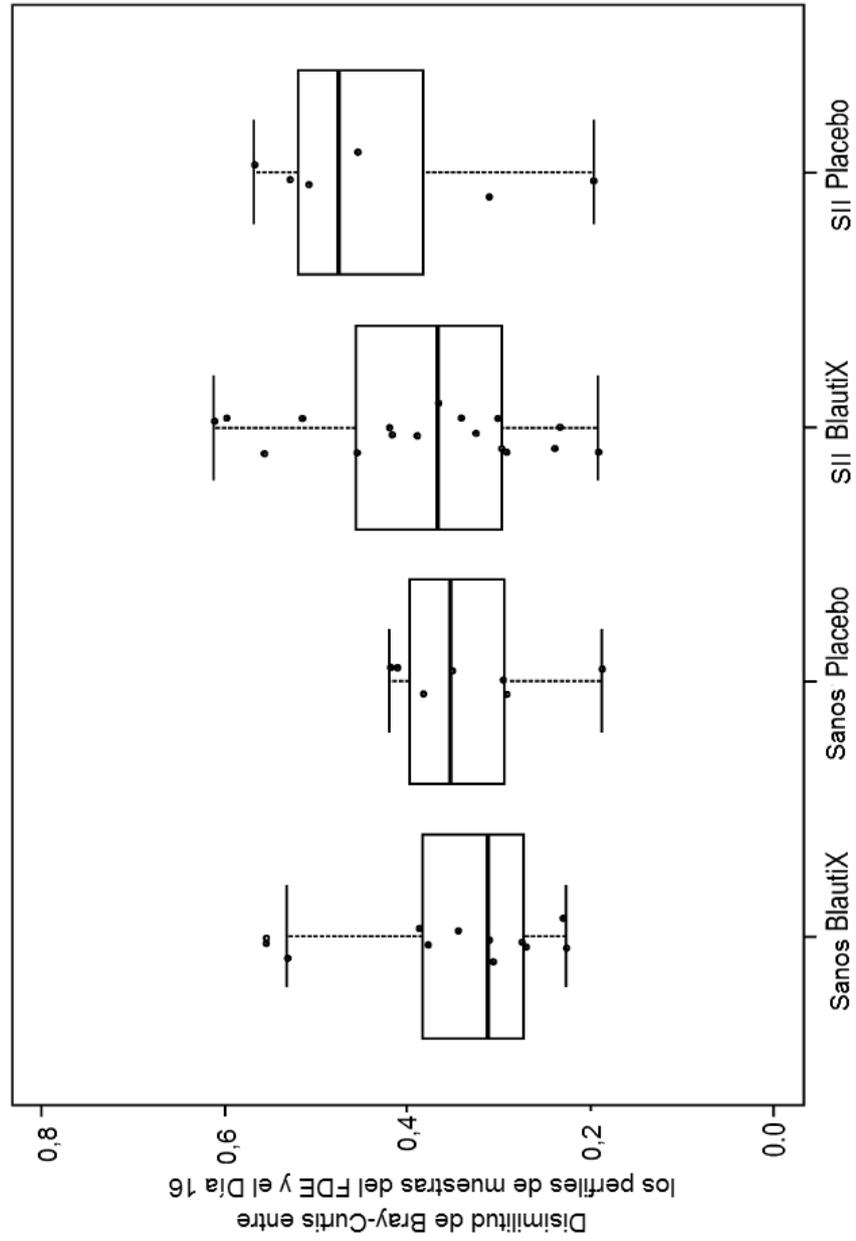


FIG. 4C
 Disimilitud de Bray-Curtis
 Día 16 frente al fin del estudio



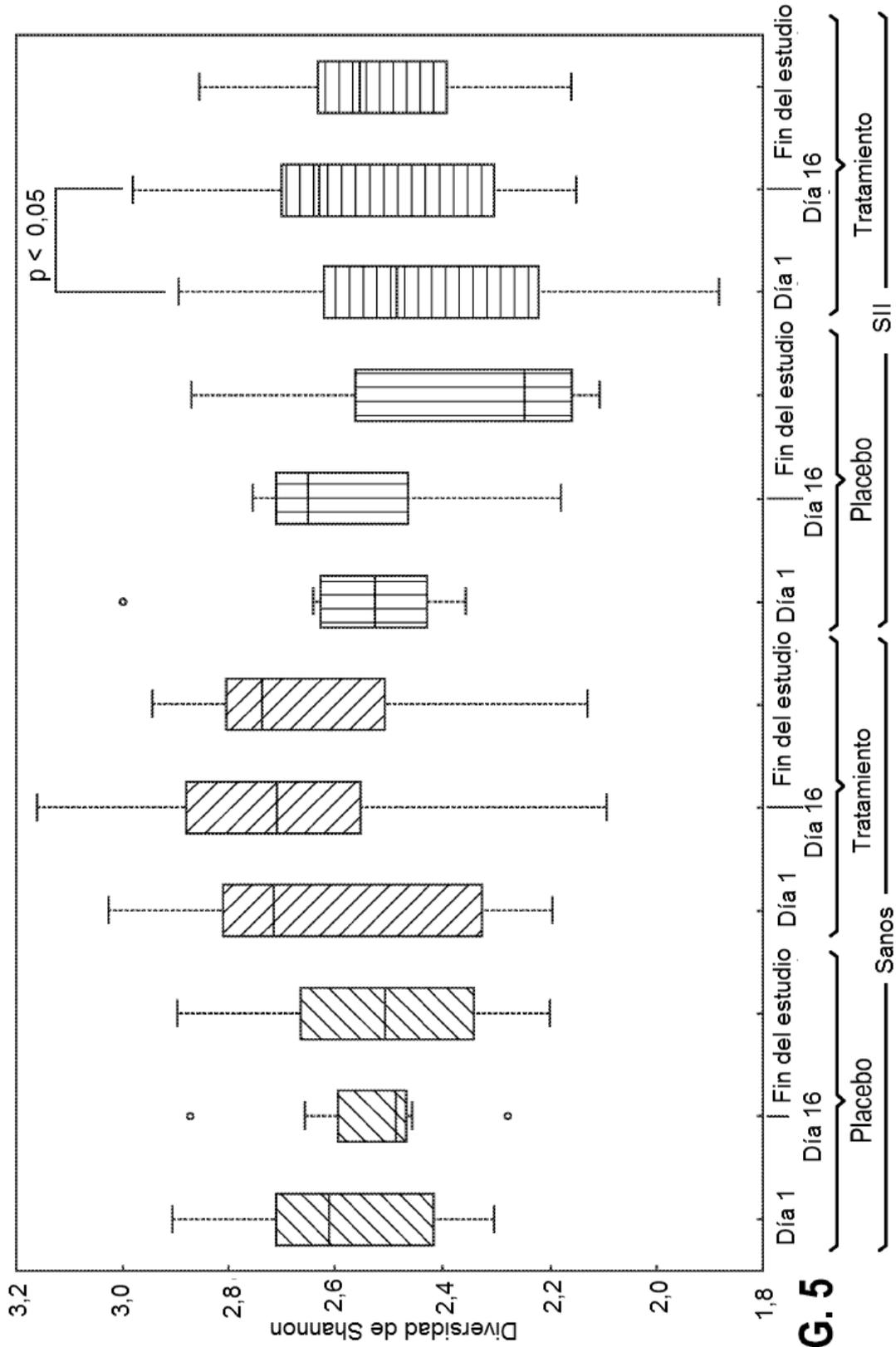


FIG. 5

FIG. 6A
Individuos sanos

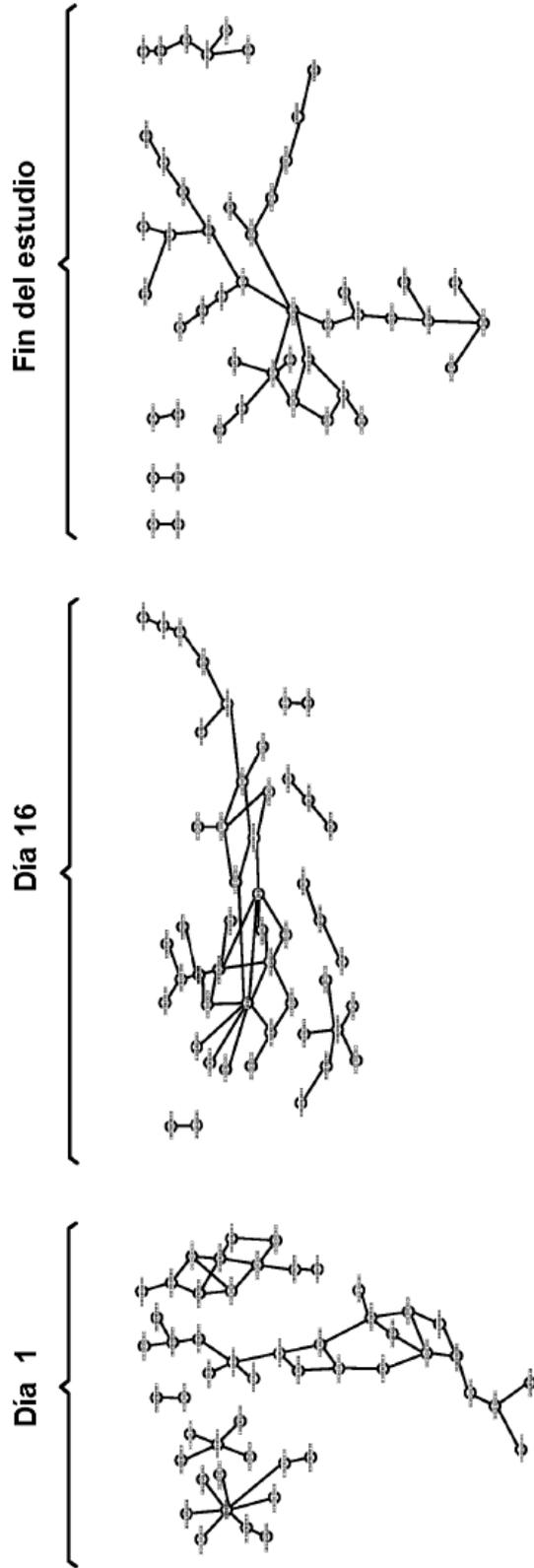
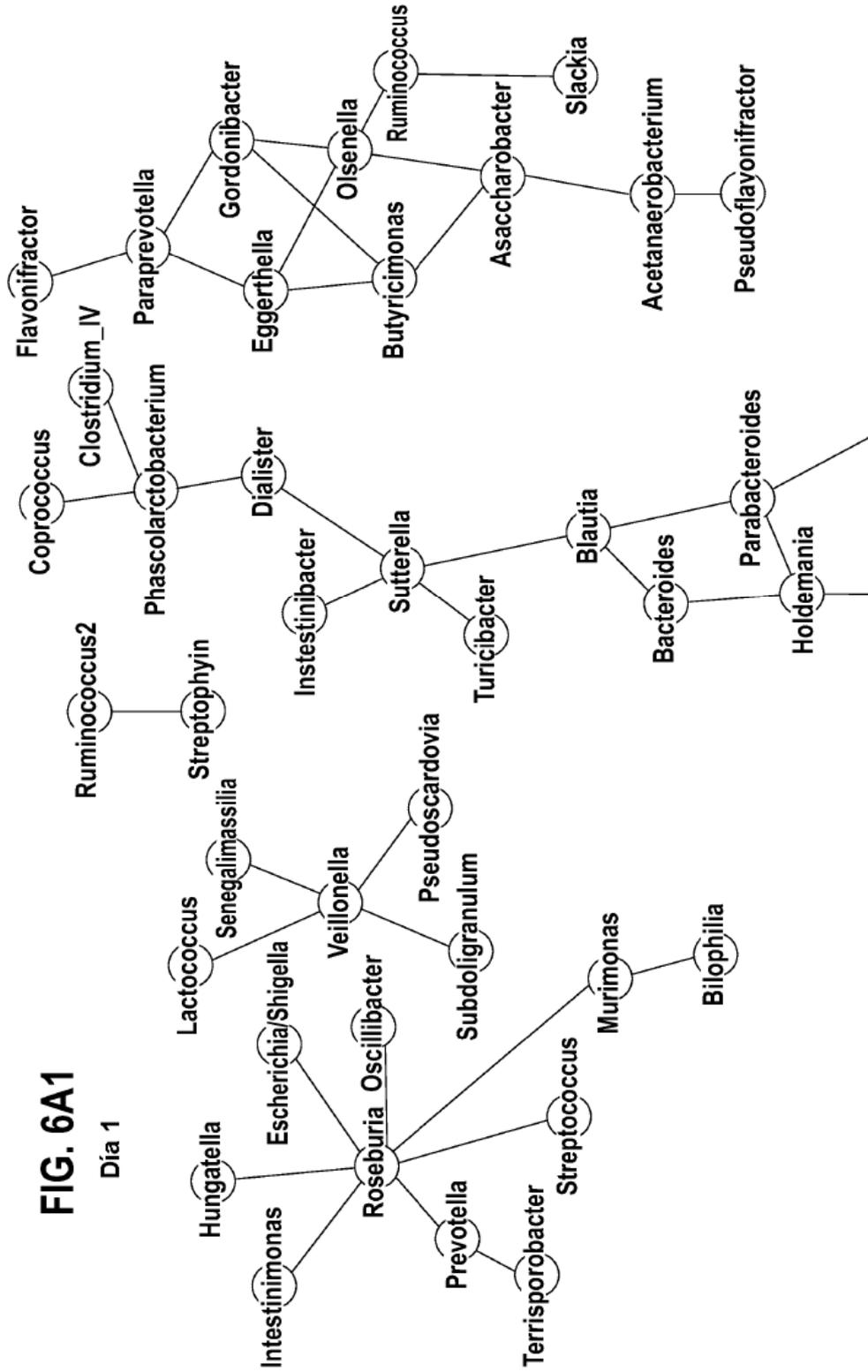
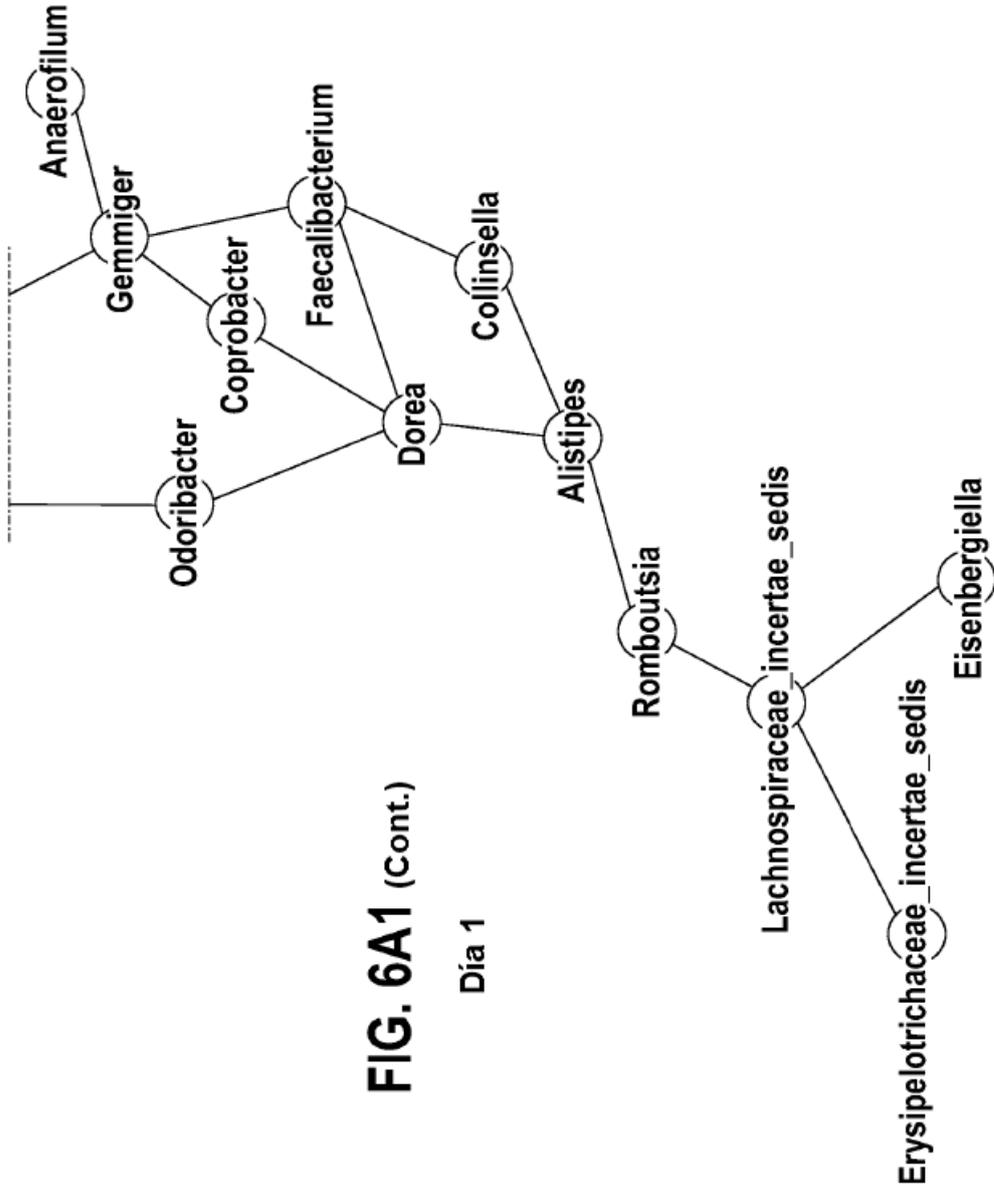


FIG. 6A1

Día 1





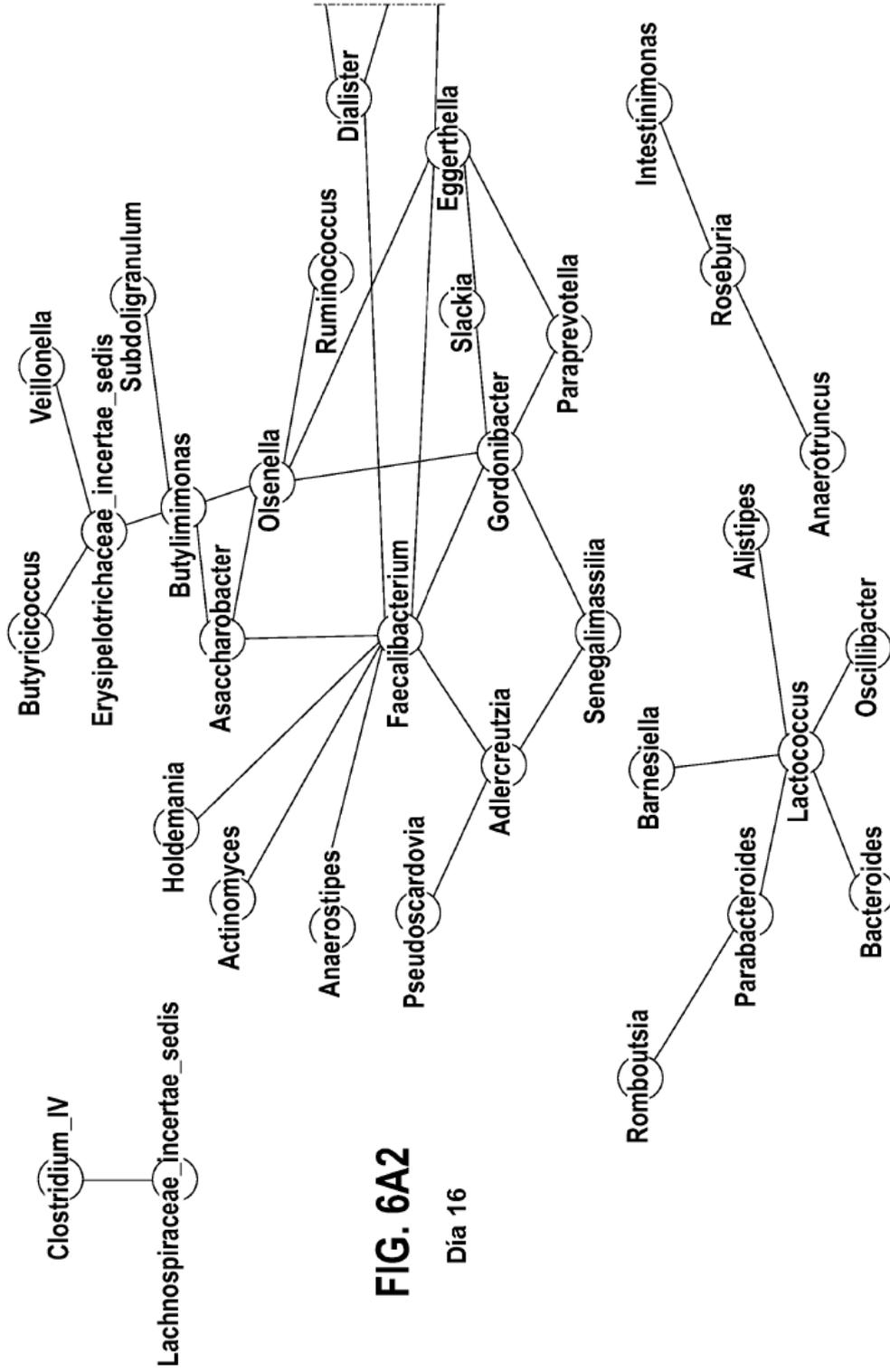


FIG. 6A2

Día 16

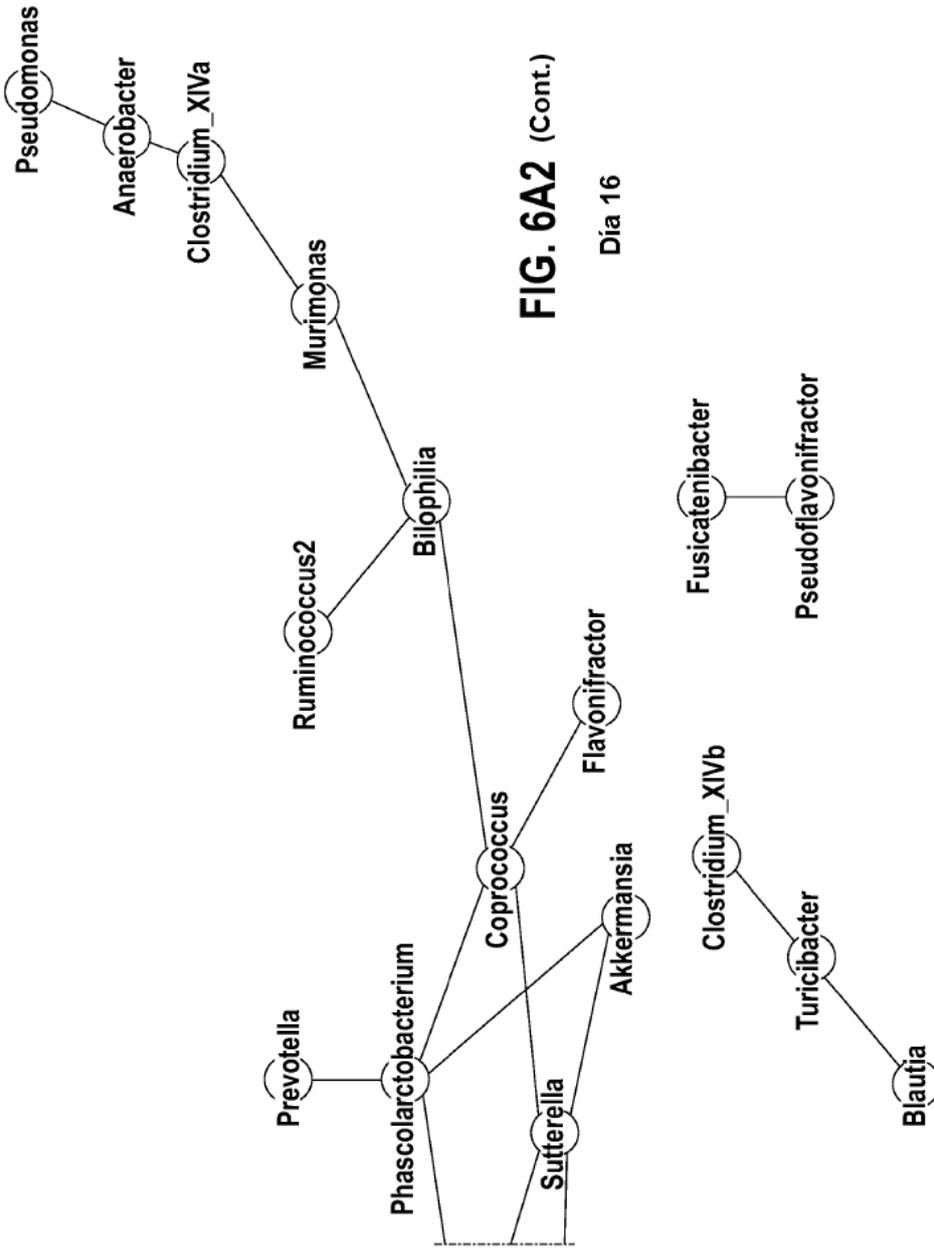


FIG. 6A2 (cont.)

Dia 16

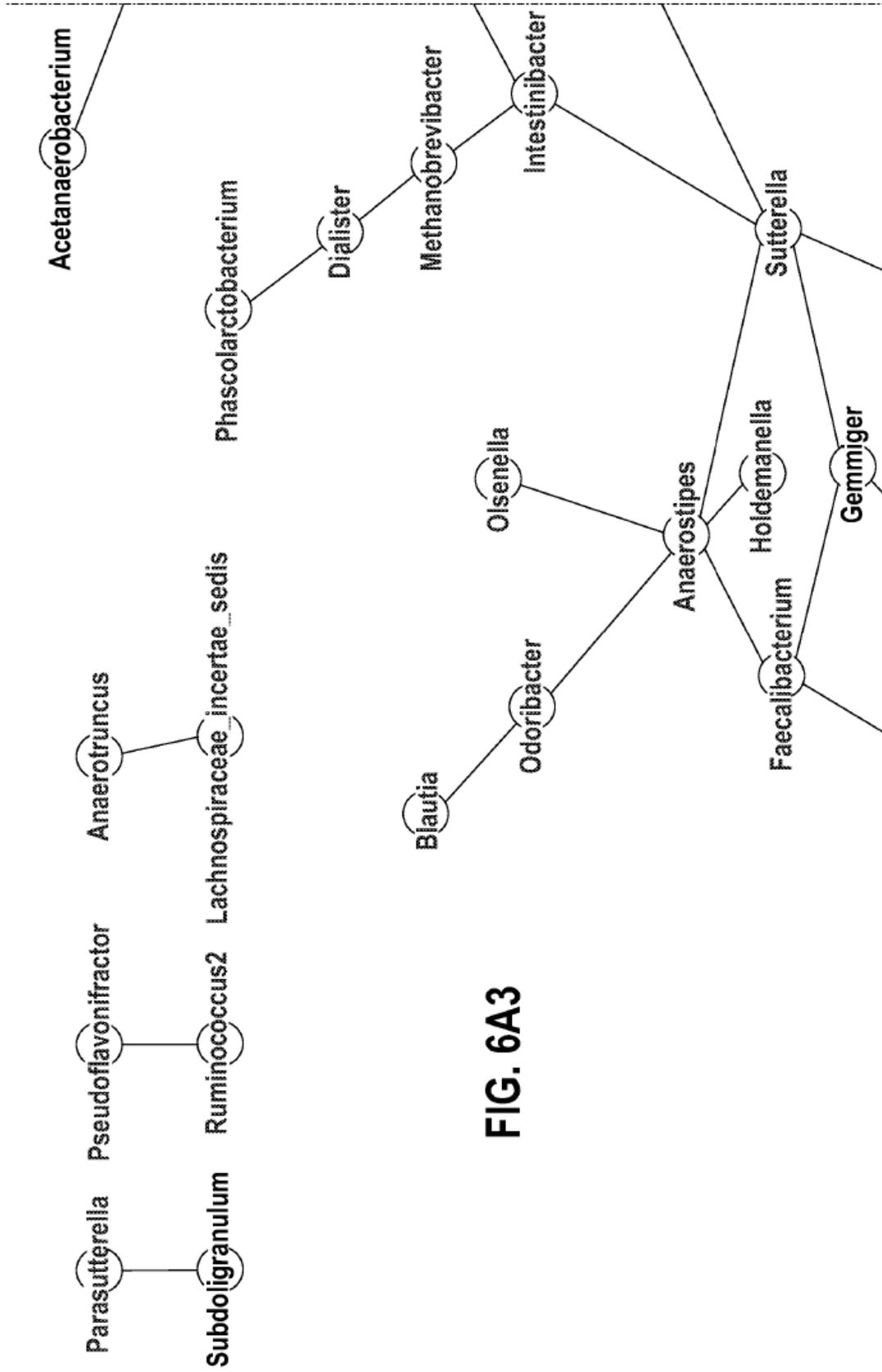


FIG. 6A3

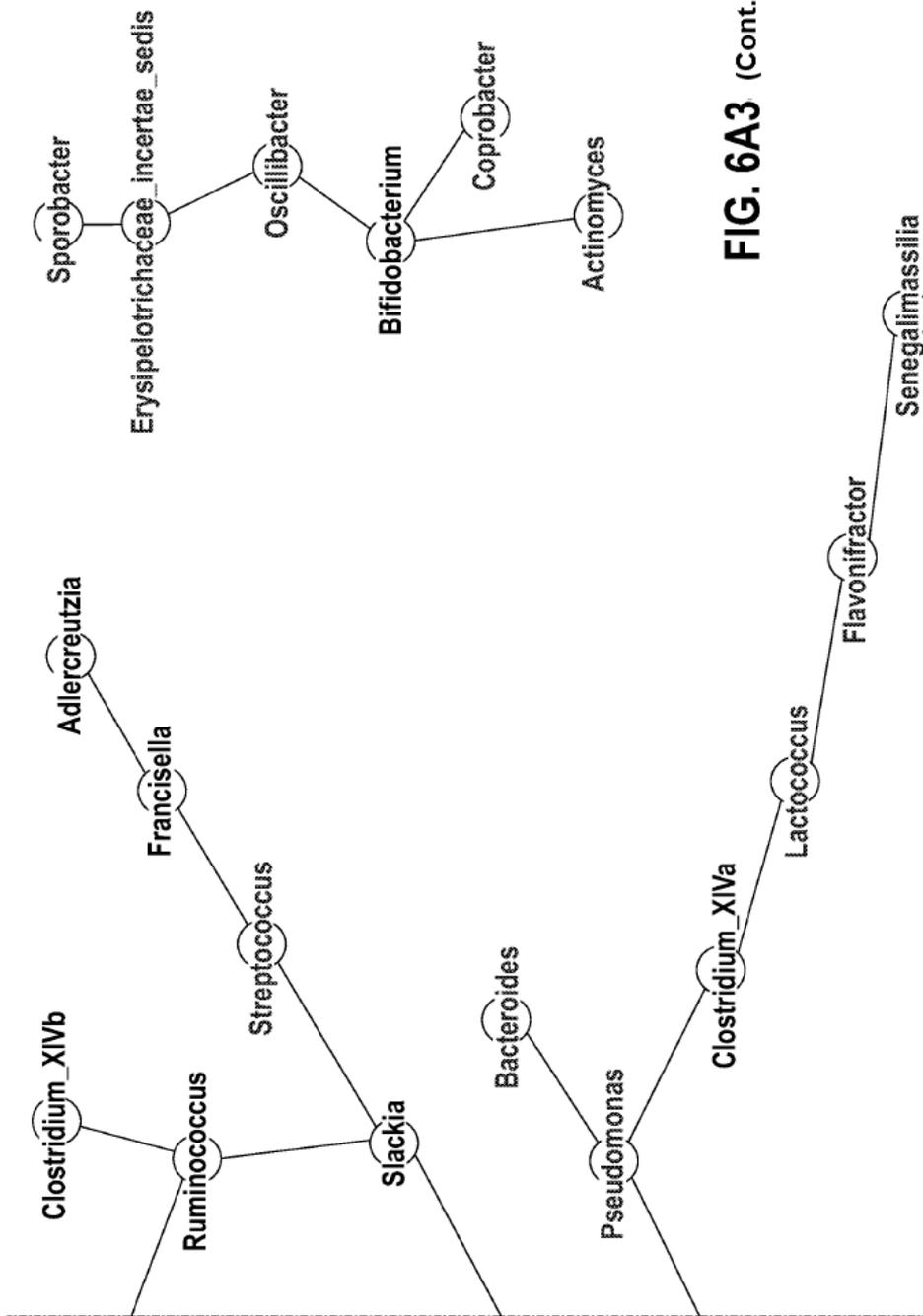


FIG. 6A3 (cont.)

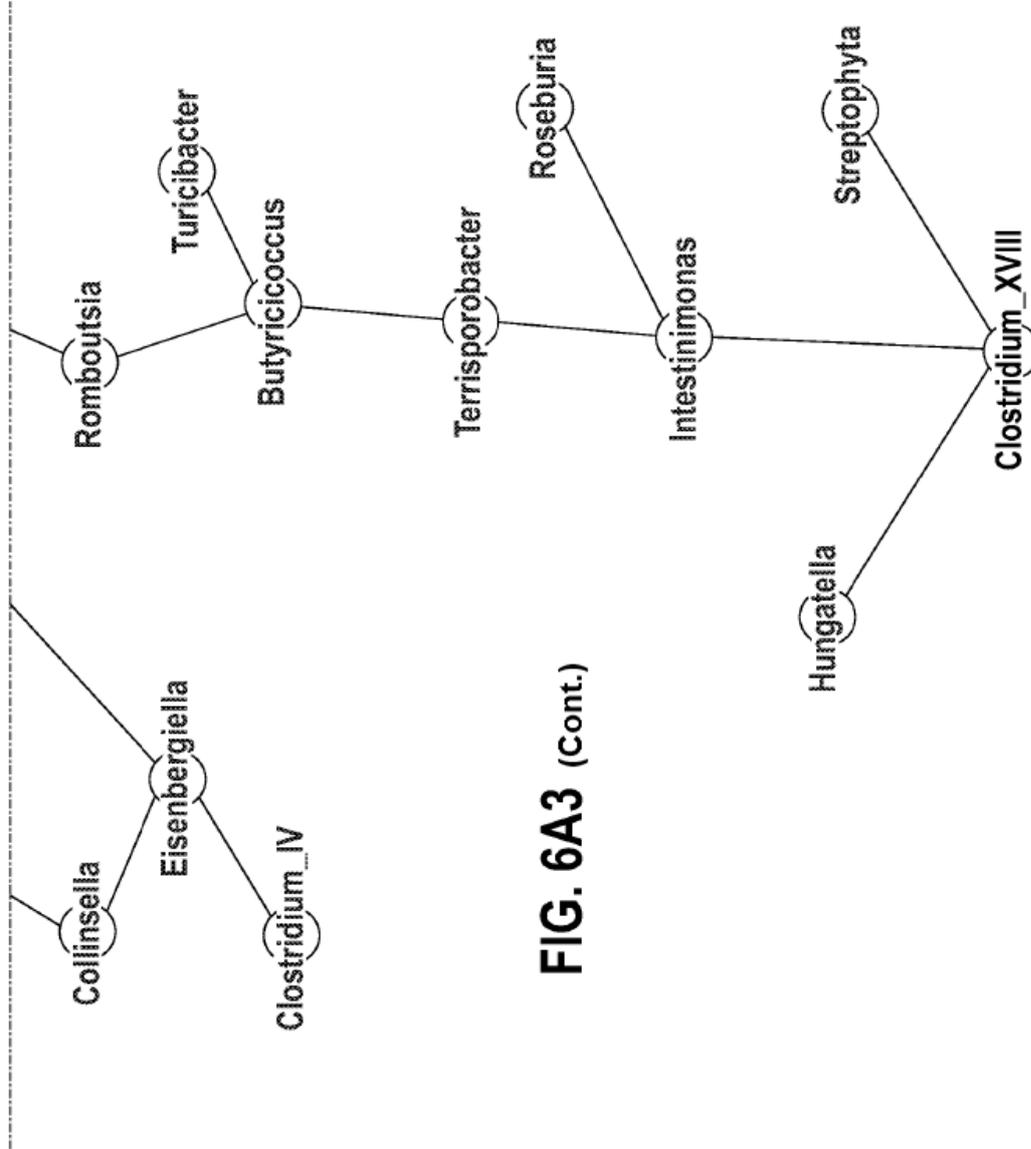
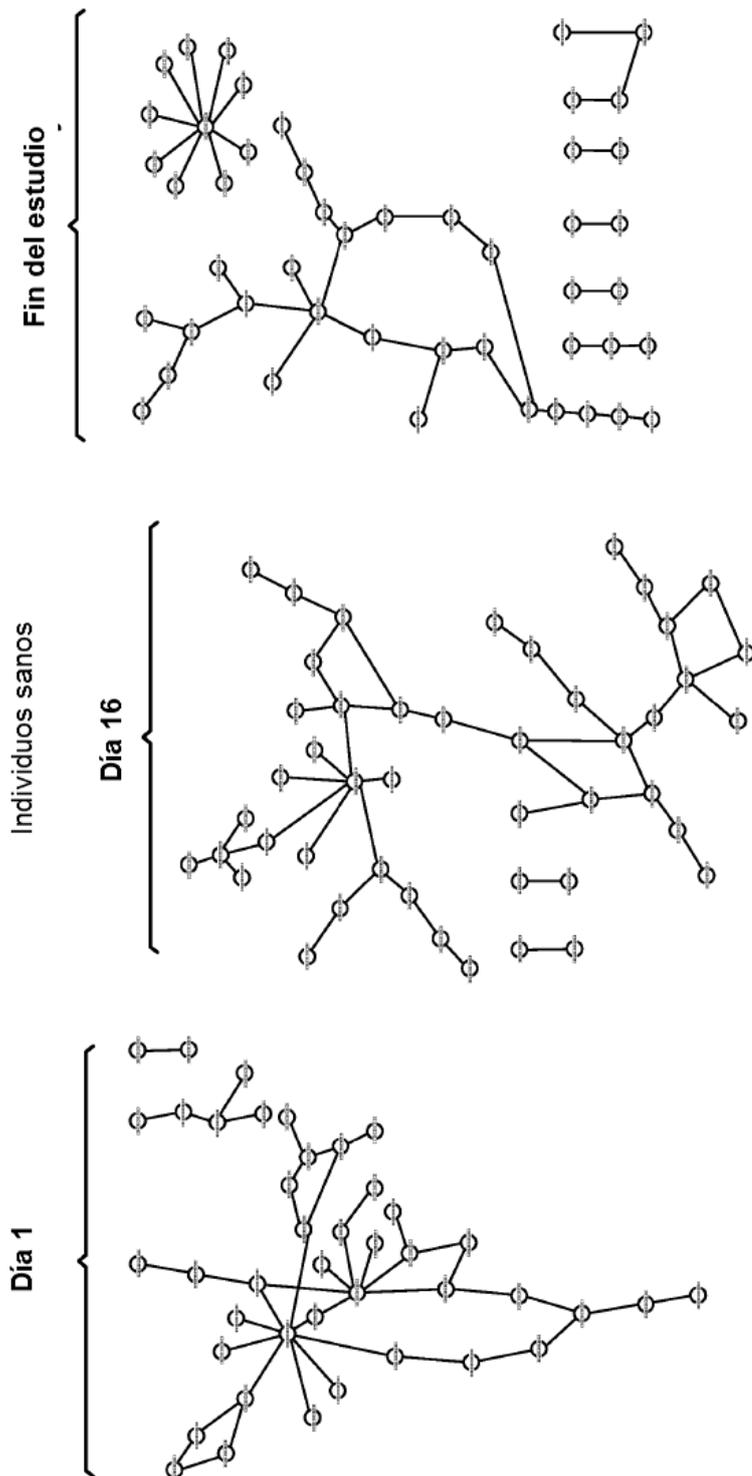
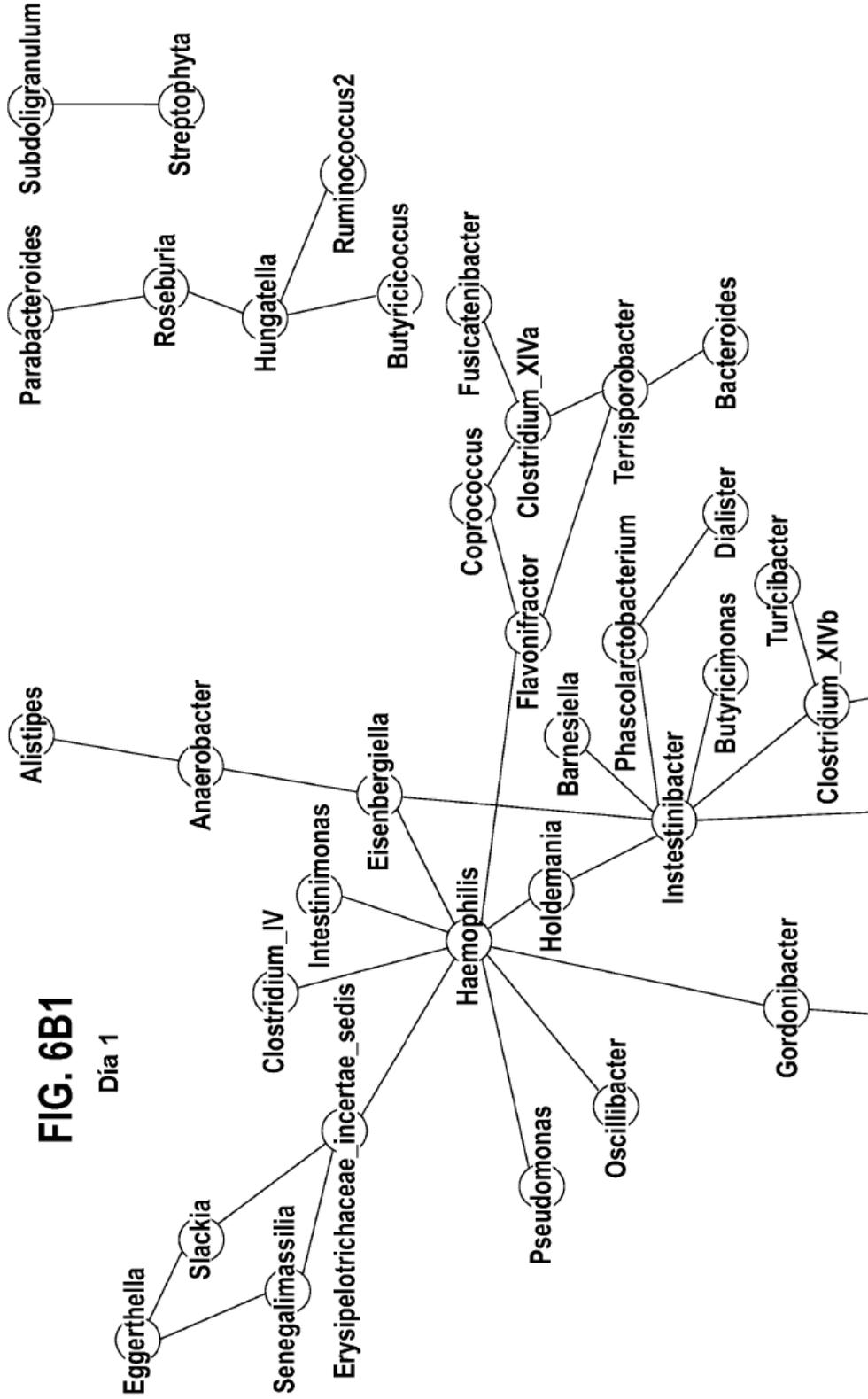
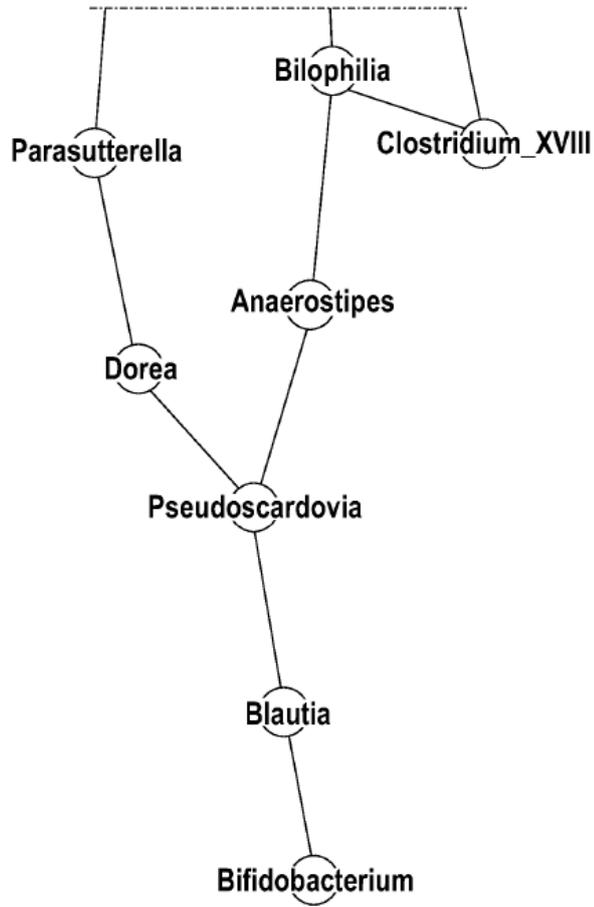


FIG. 6A3 (Cont.)

FIG. 6B

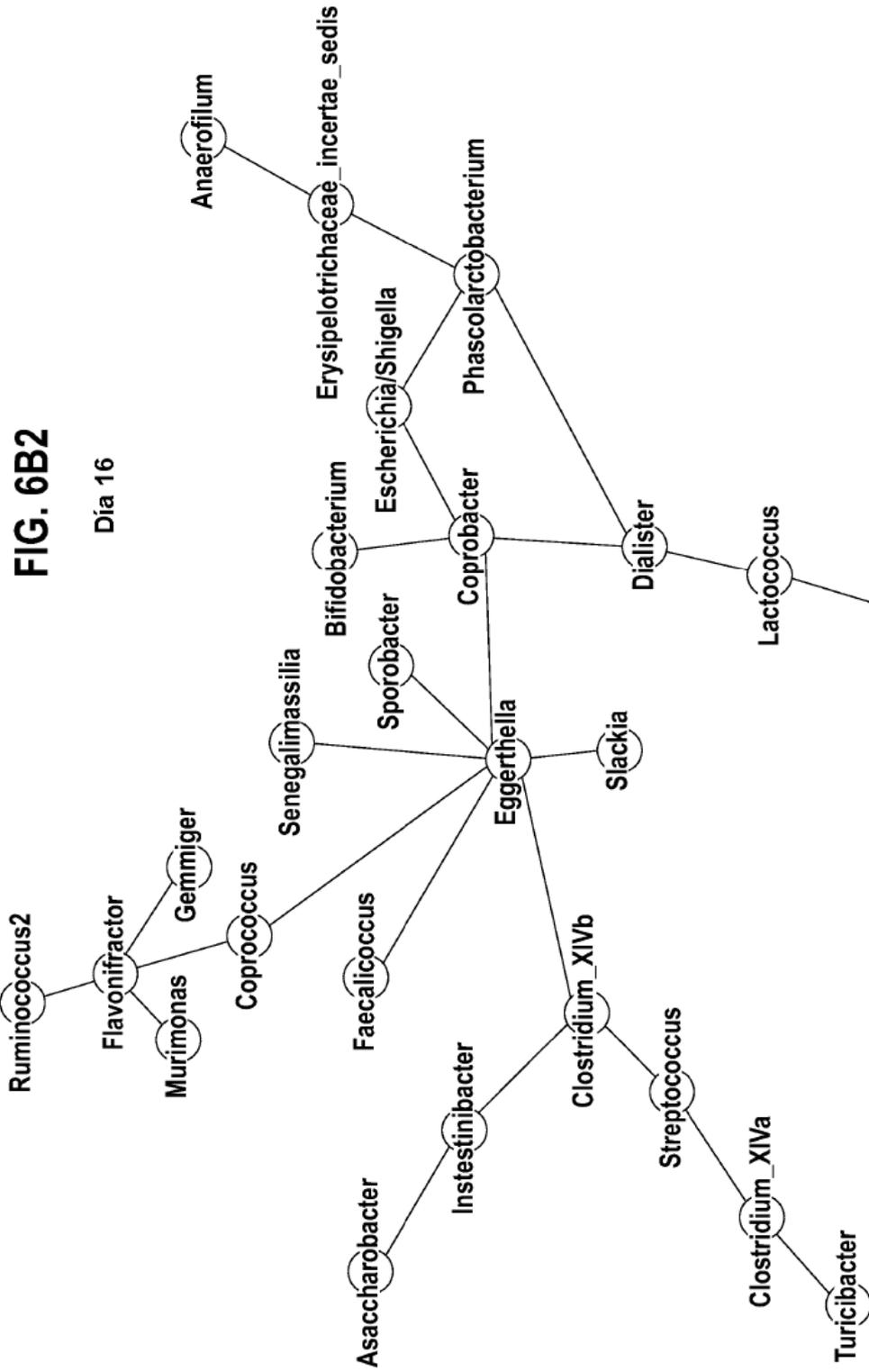






Día 1

FIG. 6B1 (Cont.)



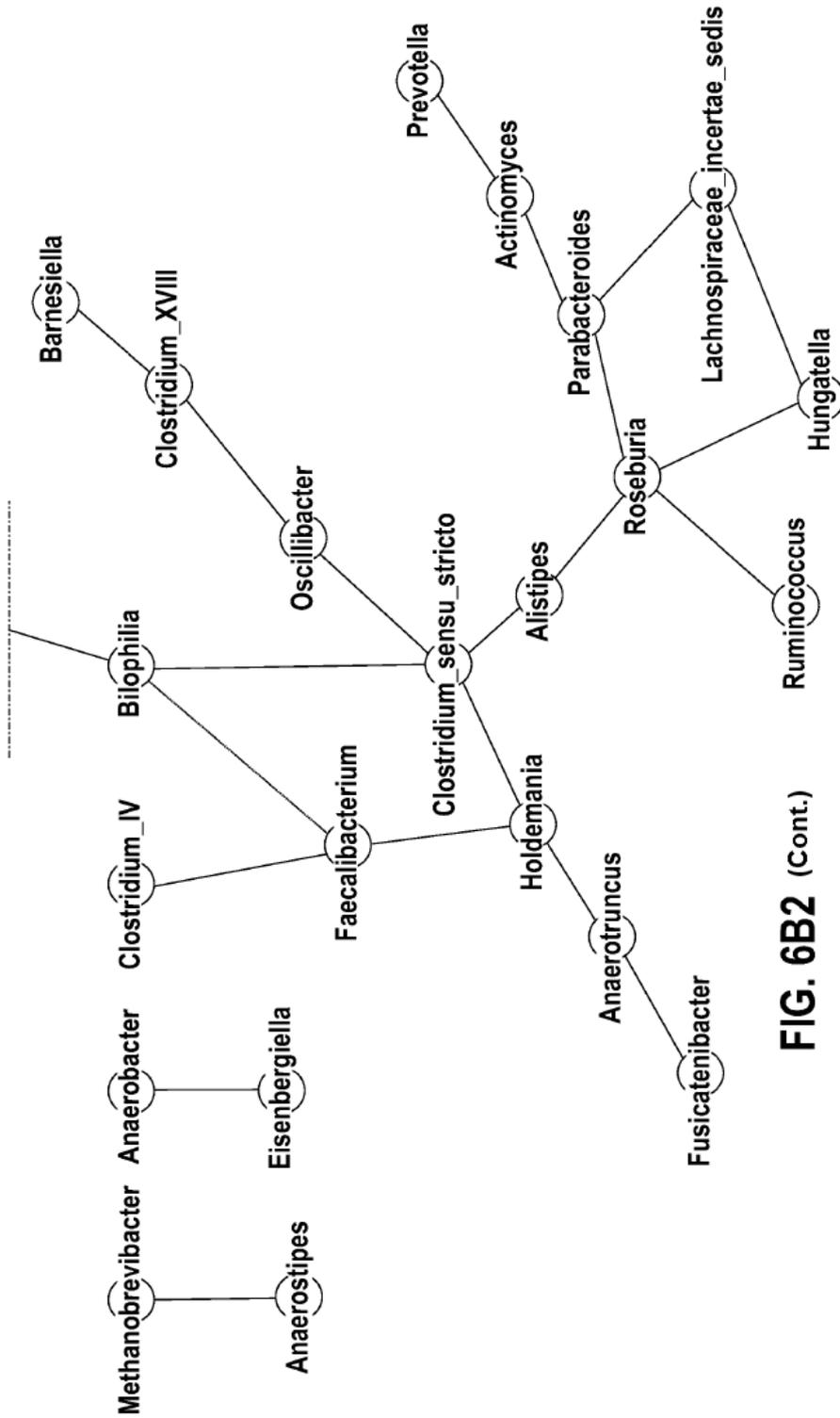


FIG. 6B2 (Cont.)

Dia 16

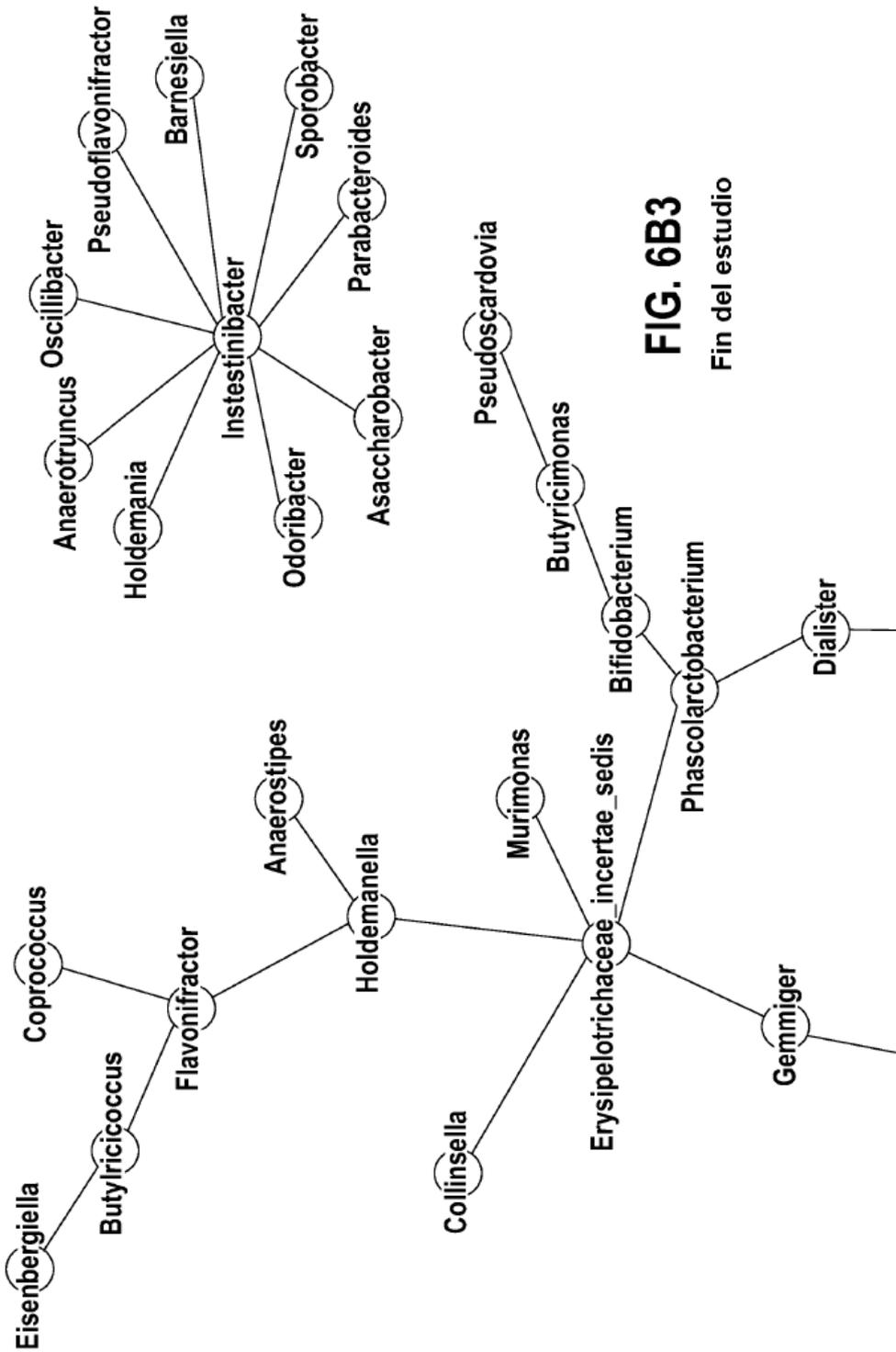


FIG. 6B3

Fin del estudio

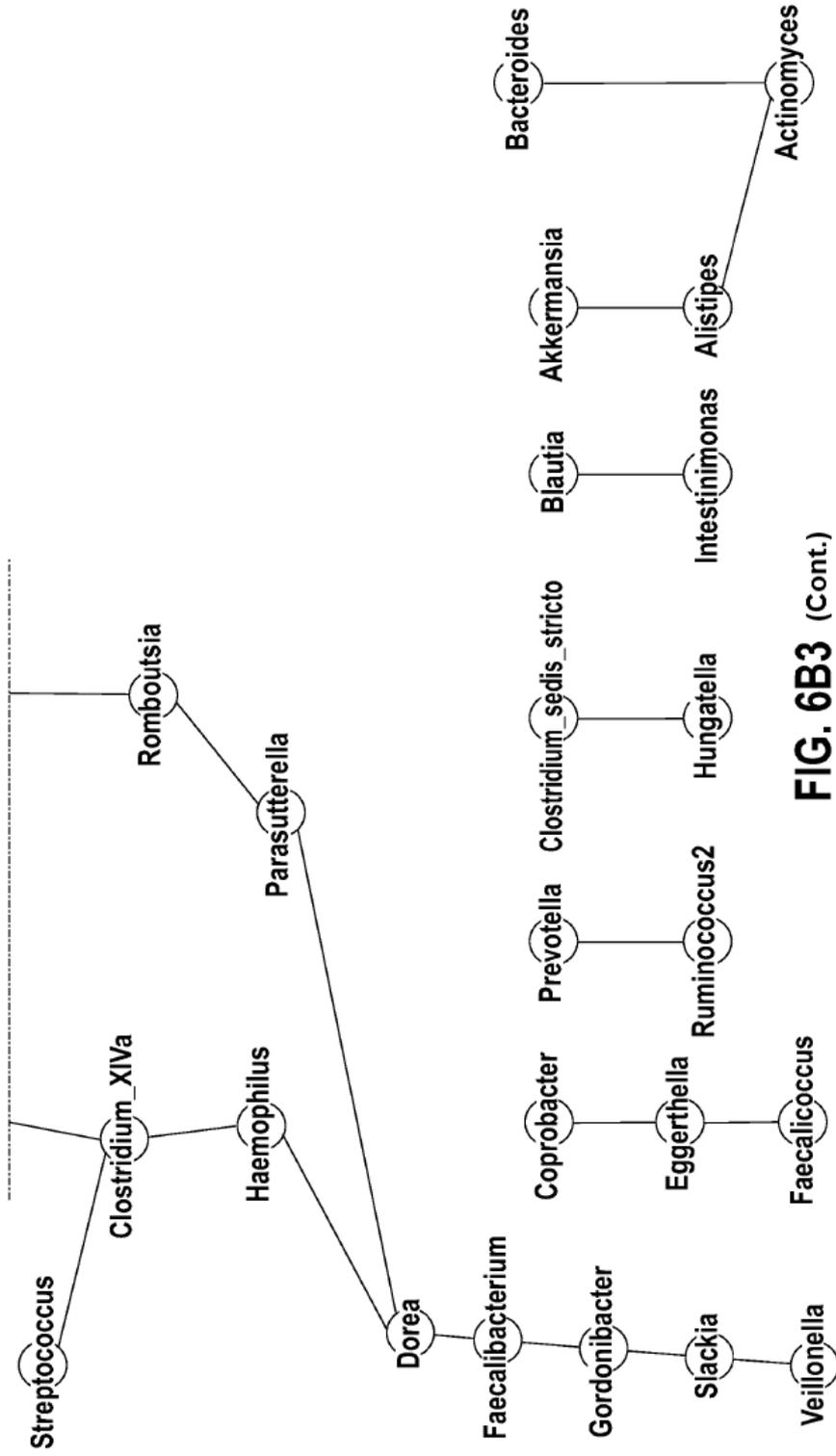
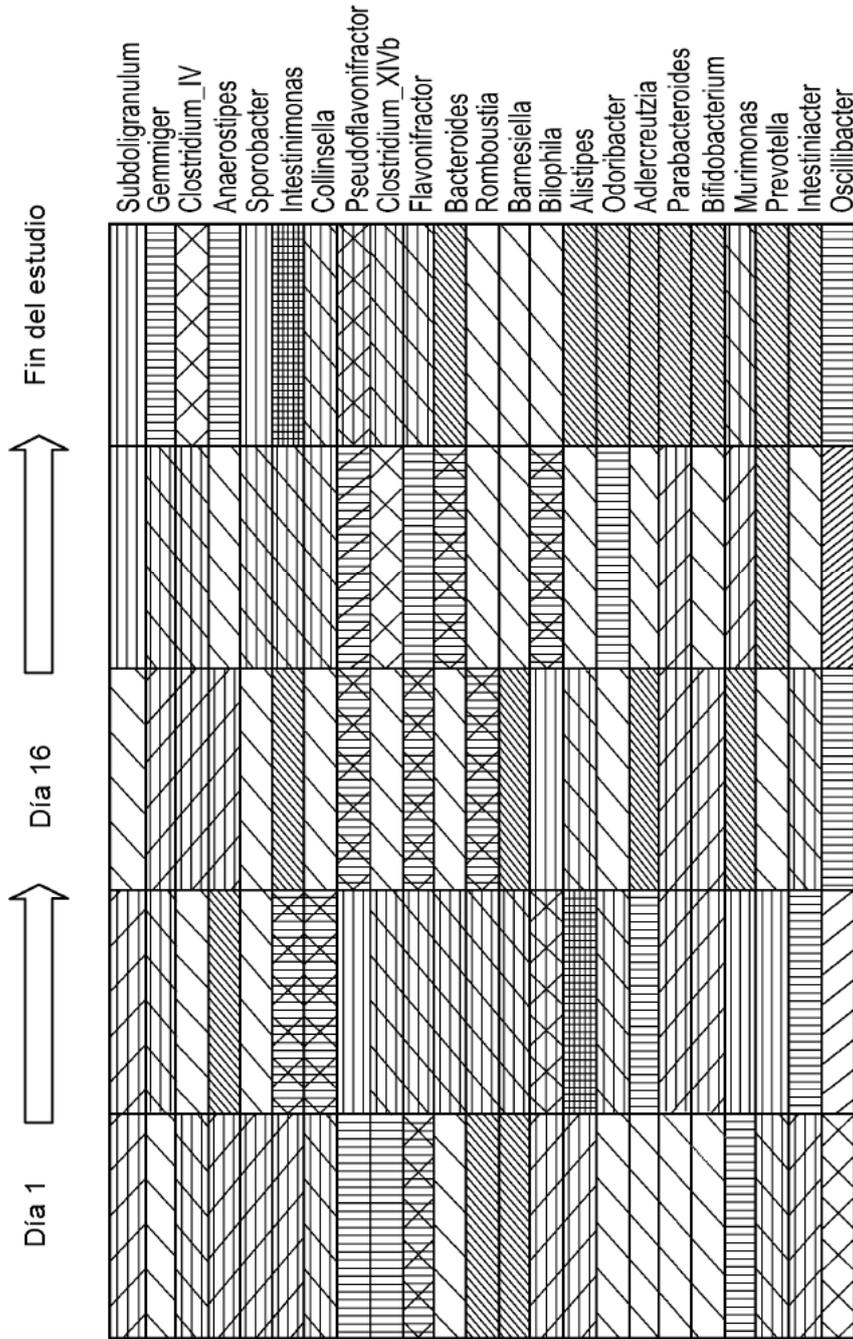


FIG. 6B3 (Cont.)

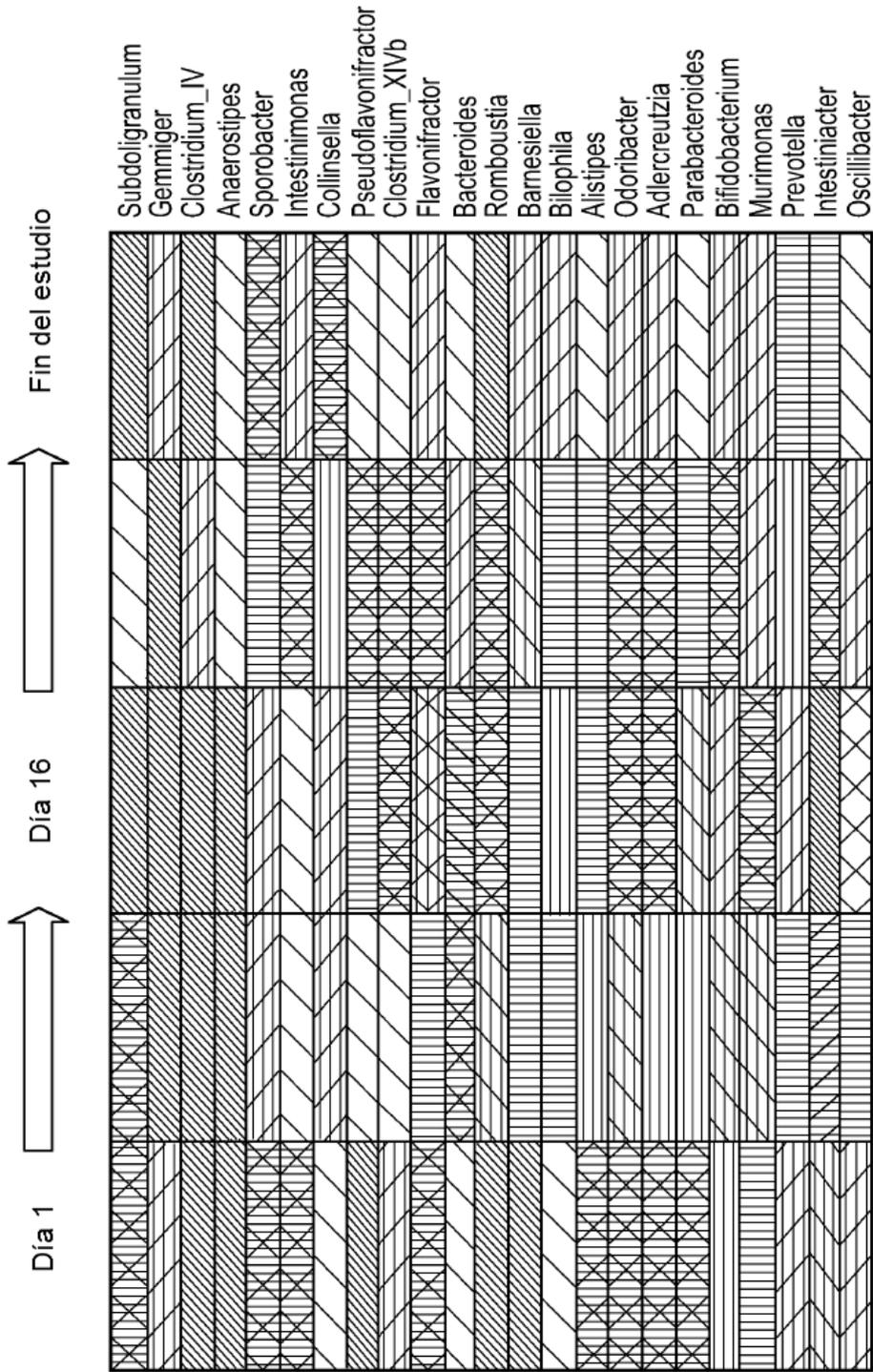
Fin del estudio

FIG. 7



SII

FIG. 7 (Cont.)



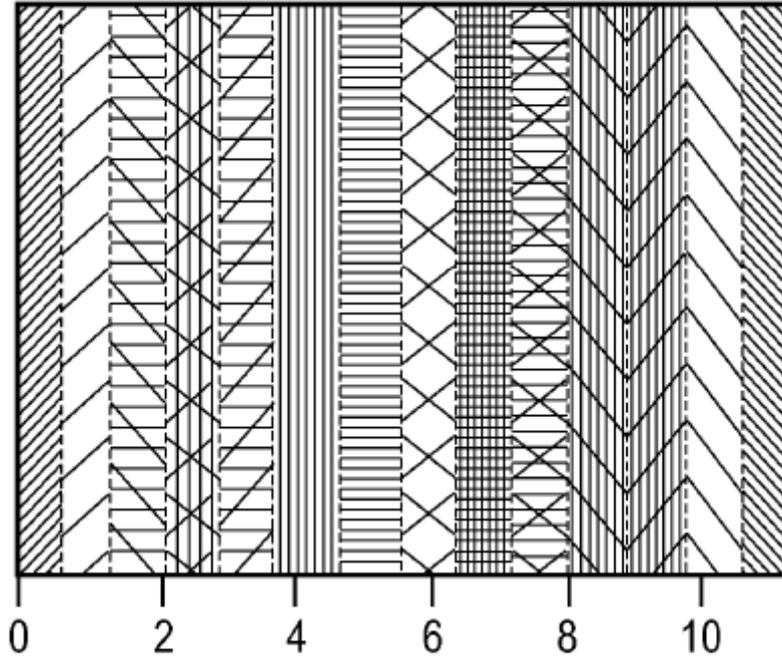


FIG. 7 (Cont.)

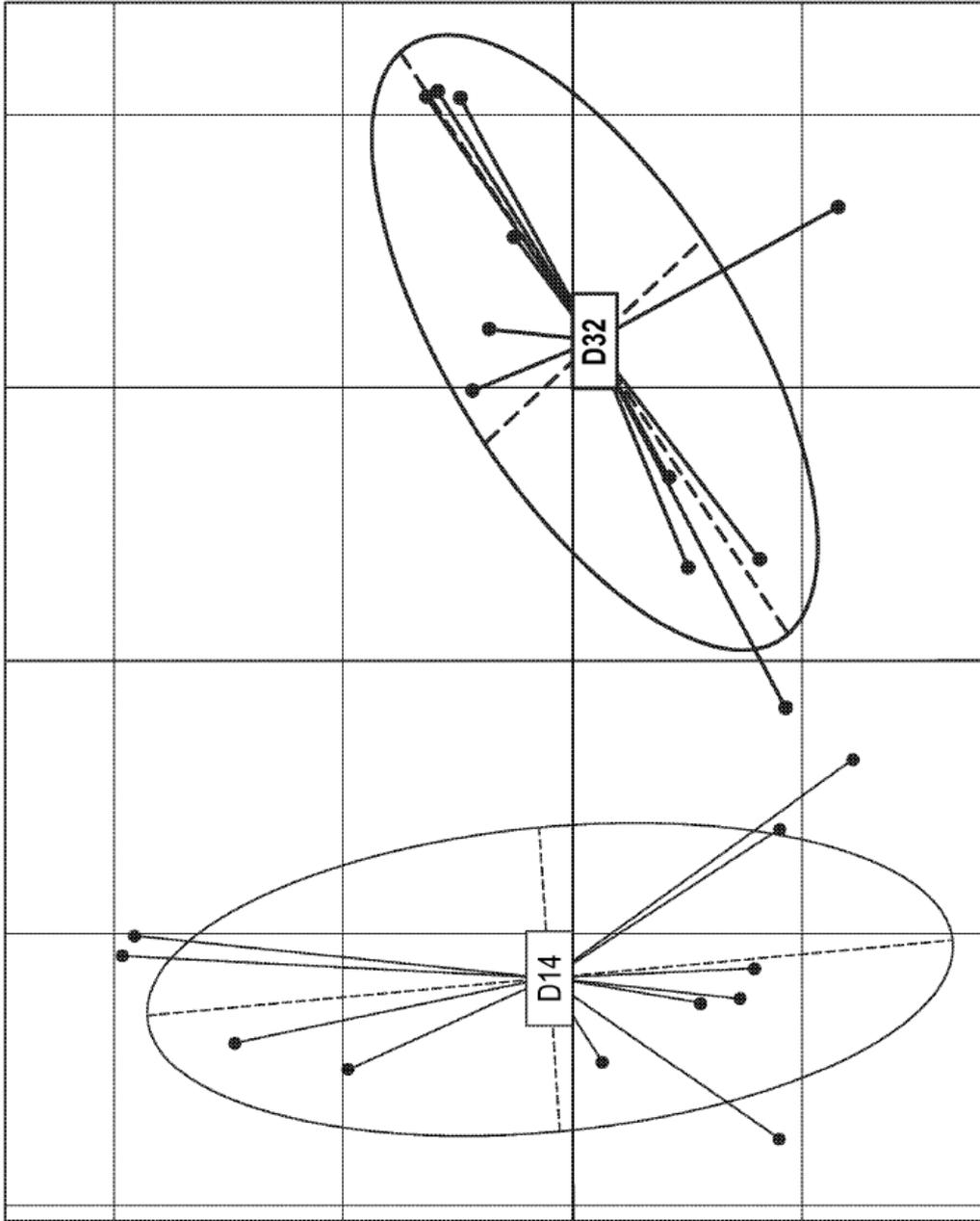


FIG. 8

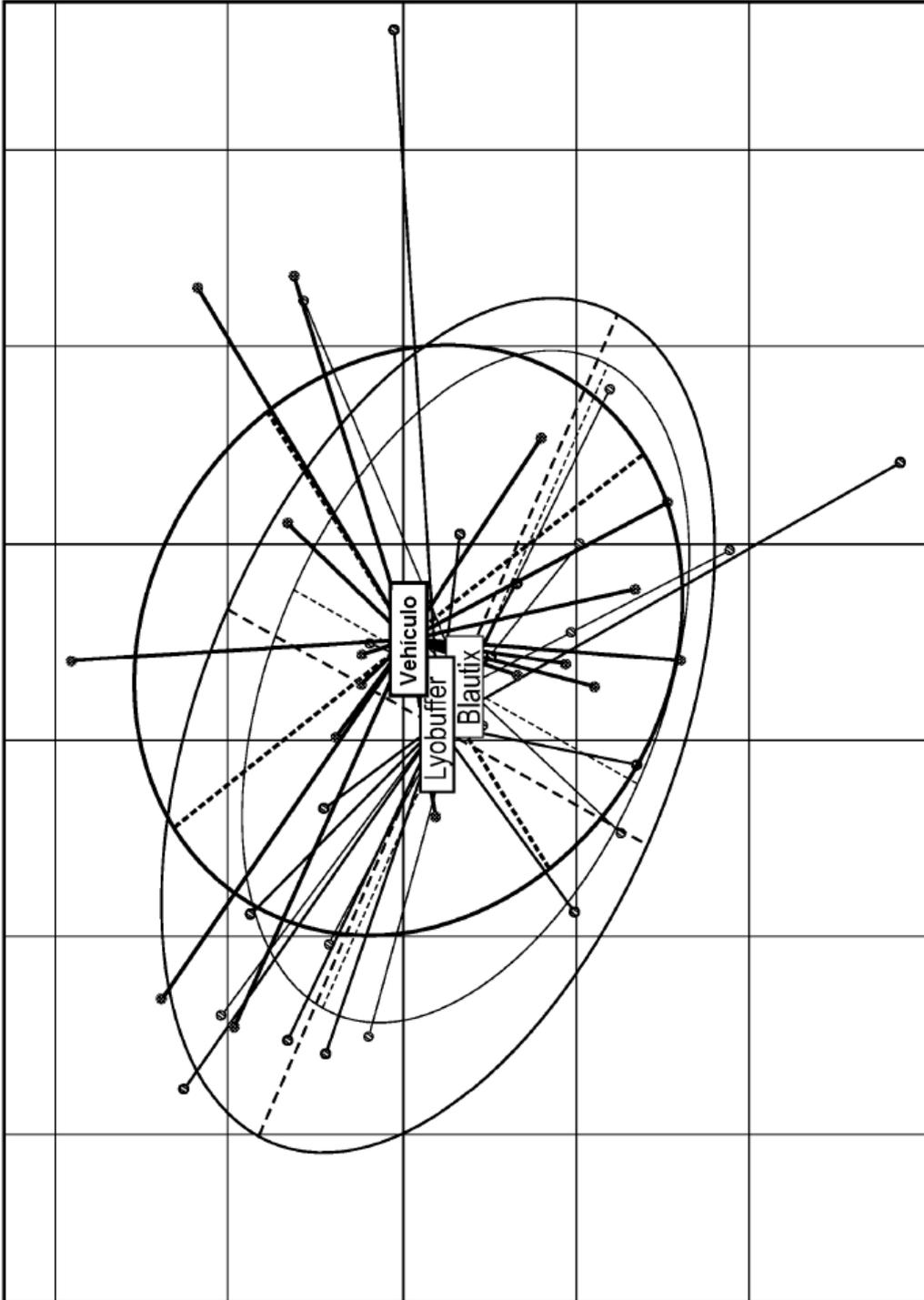


FIG. 9A

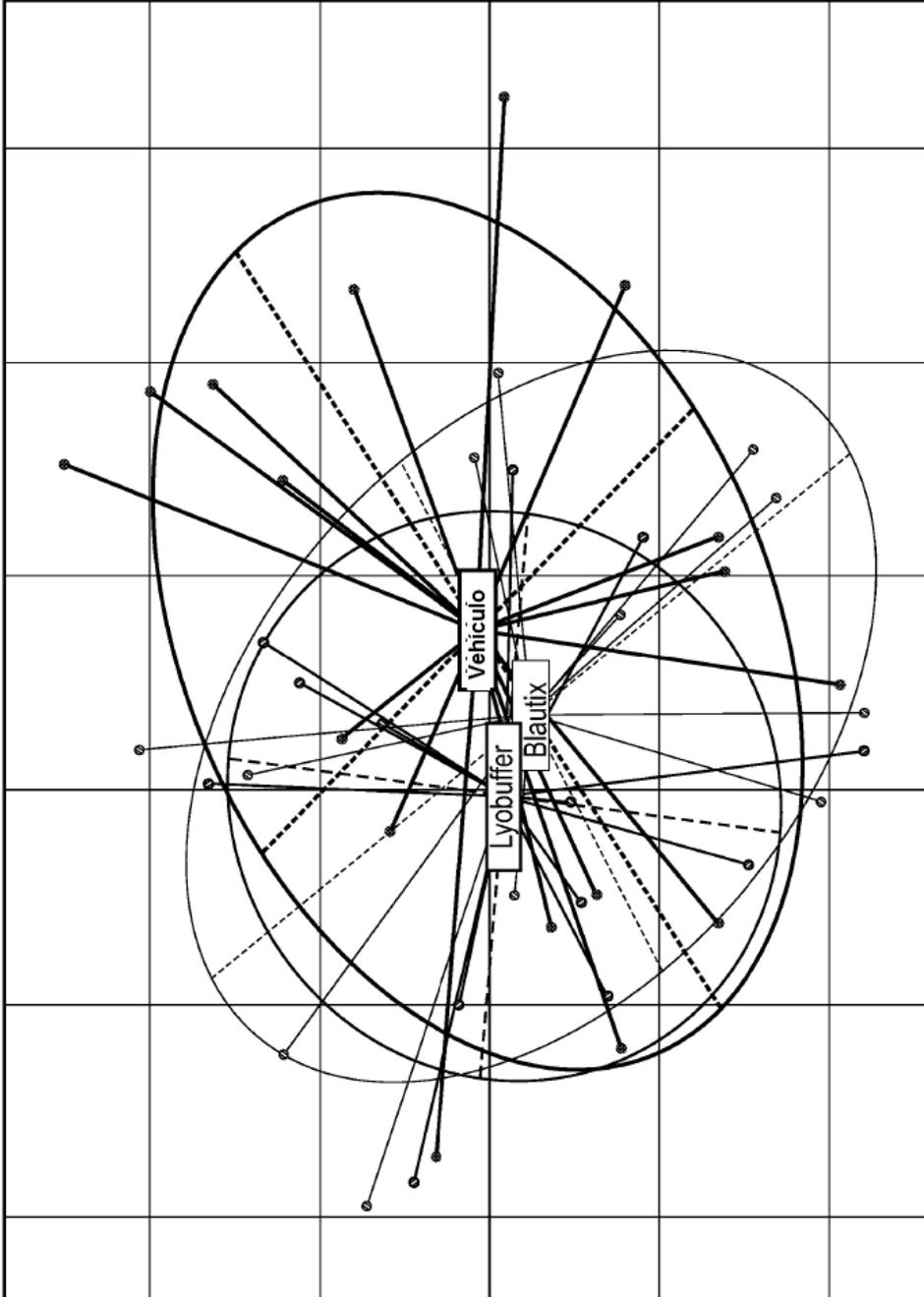


FIG. 9B

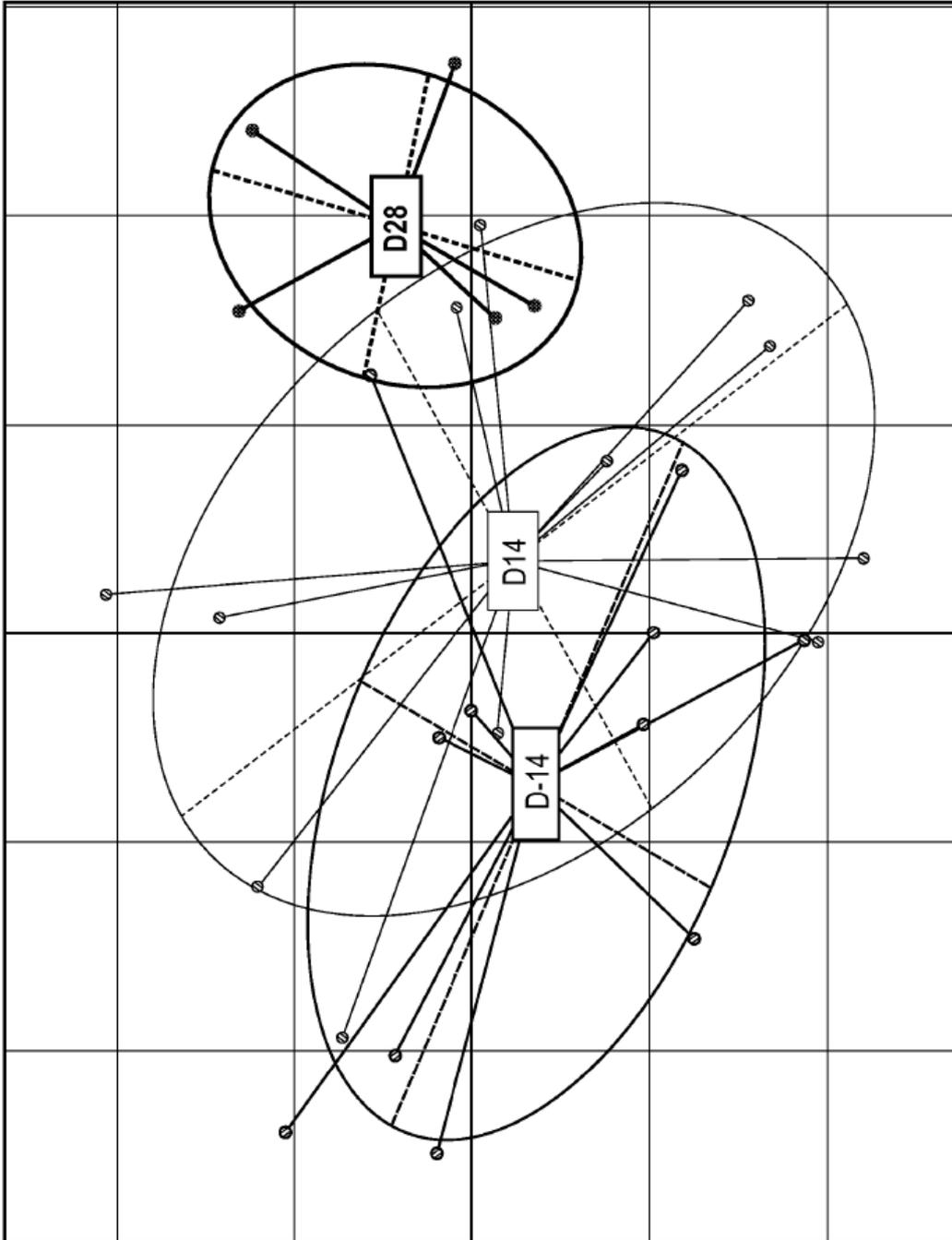


FIG. 9C

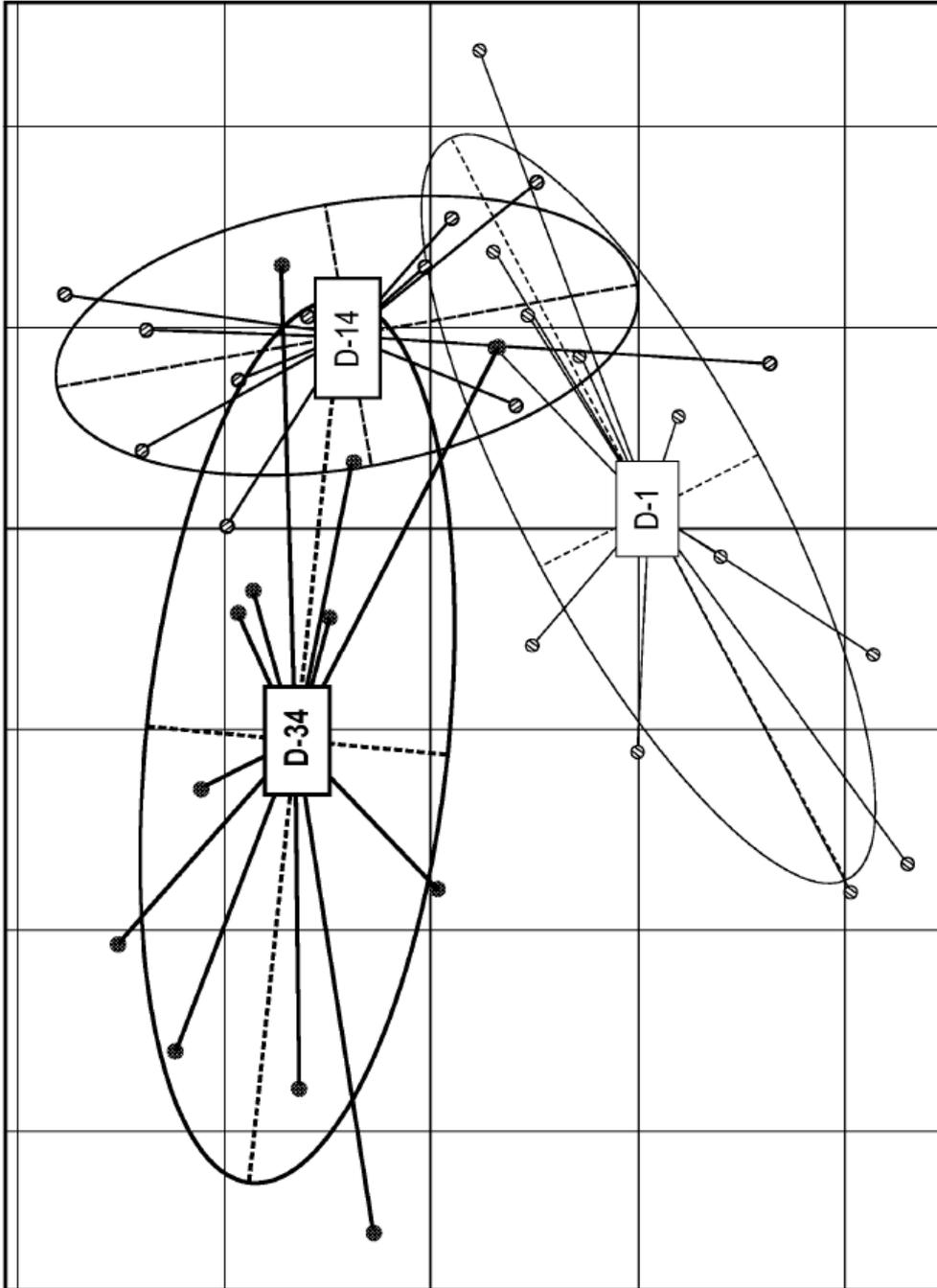


FIG. 10