

## COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS

### CAMPO TÉCNICO

La presente invención se encuentra en el campo de las composiciones que comprenden cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de mamíferos y el uso de dichas composiciones en el tratamiento de enfermedades.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se considera que el intestino humano es estéril en el útero, pero está expuesto a una gran variedad de microbios maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento. Posteriormente, se produce un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciado por factores tales como el modo de parto, el medioambiente, la dieta y el genotipo del huésped, los cuales tienen todos un impacto sobre la composición de la microbiota intestinal, en particular durante los primeros años de vida. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y pasa a ser adulta [1]. La microbiota del intestino humano contiene más de 1500 filotipos diferentes, dominados en niveles de abundancia por dos divisiones bacterianas principales (filos), Bacteroidetes y Firmicutes [2-3]. Las relaciones simbióticas exitosas que surgen de la colonización bacteriana de los intestinos humanos han producido una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales, protectoras, así como otras funciones beneficiosas. Las actividades metabólicas mejoradas del intestino colonizado aseguran que componentes de la dieta, que de otro modo no serían digeribles, se degraden con liberación de subproductos que proporcionan una importante fuente de nutrientes para el hospedador y beneficios para la salud adicionales. De manera similar, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es muy reconocida y se ejemplifica en animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunitario deficiente que se reconstituye desde el punto de vista funcional después de la introducción de bacterias comensales [4-6].

Se han documentado cambios drásticos en la composición de la microbiota en trastornos gastrointestinales tales como enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, los niveles de bacterias del grupo XIVa de *Clostridium* y el grupo XI de *Clostridium* (*F. prausnitzii*) se reducen en pacientes con IBD, mientras que los niveles de *E. coli* aumentan, lo que sugiere un cambio en el equilibrio de simbiosis y patobiontes en el intestino [7-11].

Al reconocer el potencial efecto positivo que determinadas cepas bacterianas pueden tener sobre el intestino de un animal, se han propuesto diversas cepas para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, por ejemplo, [12-15]). Una variedad de cepas, que incluyen principalmente las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ha sido propuesta para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades intestinales (véase [16] por una reseña). También se ha propuesto el uso de cepas del género *Blautia* para modular el equilibrio microbiano en el ecosistema digestivo en pacientes con IBS (WO 01/85187). Sin embargo, la relación entre diferentes cepas bacterianas y diferentes enfermedades y los efectos concretos de cepas bacterianas particulares en el intestino y a un nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades se encuentran poco caracterizados.

Hay una necesidad de caracterizar los efectos posibles de las bacterias intestinales de modo que se puedan desarrollar nuevas terapias que utilicen bacterias intestinales.

US 2010/0247489 describe el uso de nutrientes minerales para tratar trastornos digestivos. US'789 propone opcionalmente además el uso de numerosos géneros diferentes de bacteria, incluso *Enterobacteriaceae*, para prevenir y reducir la formación de gas en el colon, así que este documento sugiere que aumentar *Enterobacteriaceae spp.* en el tracto gastrointestinal puede emplearse para tratar determinadas enfermedades. US'789 no discute ningún método para reducir *Enterobacteriaceae spp.*

WO 2016/086206 sugiere que las bacterias del orden Clostridiales, incluso *Enterbacteriaceace spp.*, pueden utilizarse para tratar o prevenir la disbiosis. No hay indicación en WO'206 de que reducir el nivel *Enterobacteriaceace spp.* en el tracto gastrointestinal puede utilizarse para tratar enfermedades, ni tampoco hay indicación de cómo conseguir una reducción en el nivel *Enterbacteriaceace spp.*

WO 2012/142605 propone que puede ser posible tratar una cantidad de diferentes enfermedades con una combinación de microorganismos. WO'605 sugiere una gran cantidad de especies bacterianas que podrían emplearse, pero no hay indicación en WO'605 de cómo cualquiera de las especies bacterianas propuestas podría utilizarse para tratar ninguna de las enfermedades propuestas.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades asociadas con *Enterobacteriaceae*, en particular *E. coli*. En particular, los inventores han

identificado que cepas bacterianas del género *Blautia* pueden ser eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. Tal como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* puede reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, incluso *E. coli*, y puede

5 tratar o prevenir enfermedades asociadas con *Enterobacteriaceae* o *E. coli*. Por lo tanto, en una primera modalidad, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

En modalidades preferidas de todos los aspectos de la invención, la *Enterobacteriaceae* es *E. coli*. En modalidades preferidas de todos los aspectos de la invención, la cepa bacteriana es *Blautia hydrogenotrophica* y es preferentemente la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

10

En modalidades preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con una infección por *Enterobacteriaceae*, tal como una infección por *E. coli*. En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir la diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir una infección por *Enterobacteriaceae*, tal como una infección por *E. coli*.

15

En modalidades preferidas adicionales, las composiciones de la invención se utilizan para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, preferentemente el nivel de *E. coli*, en el tratamiento o prevención de IBS, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir la diarrea. En particular, los inventores han identificado que cepas bacterianas del género *Blautia* pueden ser eficaces para reducir la diarrea. Tal como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* puede reducir la diarrea en pacientes que tienen síndrome del intestino irritable (IBS, por sus siglas en inglés).

20

25

En modalidades preferidas de la invención la cepa bacteriana de la composición es de *Blautia hydrogenotrophica*. También se pueden utilizar cepas estrechamente relacionadas, tales como cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 101 %, 102 %, 103 %, 104 %, 105 %, 106 %, 107 %, 108 %, 109 %, 110 %, 111 %, 112 %, 113 %, 114 %, 115 %, 116 %, 117 %, 118 %, 119 %, 120 %, 121 %, 122 %, 123 %, 124 %, 125 %, 126 %, 127 %, 128 %, 129 %, 130 %, 131 %, 132 %, 133 %, 134 %, 135 %, 136 %, 137 %, 138 %, 139 %, 140 %, 141 %, 142 %, 143 %, 144 %, 145 %, 146 %, 147 %, 148 %, 149 %, 150 %, 151 %, 152 %, 153 %, 154 %, 155 %, 156 %, 157 %, 158 %, 159 %, 160 %, 161 %, 162 %, 163 %, 164 %, 165 %, 166 %, 167 %, 168 %, 169 %, 170 %, 171 %, 172 %, 173 %, 174 %, 175 %, 176 %, 177 %, 178 %, 179 %, 180 %, 181 %, 182 %, 183 %, 184 %, 185 %, 186 %, 187 %, 188 %, 189 %, 190 %, 191 %, 192 %, 193 %, 194 %, 195 %, 196 %, 197 %, 198 %, 199 %, 200 %, 201 %, 202 %, 203 %, 204 %, 205 %, 206 %, 207 %, 208 %, 209 %, 210 %, 211 %, 212 %, 213 %, 214 %, 215 %, 216 %, 217 %, 218 %, 219 %, 220 %, 221 %, 222 %, 223 %, 224 %, 225 %, 226 %, 227 %, 228 %, 229 %, 230 %, 231 %, 232 %, 233 %, 234 %, 235 %, 236 %, 237 %, 238 %, 239 %, 240 %, 241 %, 242 %, 243 %, 244 %, 245 %, 246 %, 247 %, 248 %, 249 %, 250 %, 251 %, 252 %, 253 %, 254 %, 255 %, 256 %, 257 %, 258 %, 259 %, 260 %, 261 %, 262 %, 263 %, 264 %, 265 %, 266 %, 267 %, 268 %, 269 %, 270 %, 271 %, 272 %, 273 %, 274 %, 275 %, 276 %, 277 %, 278 %, 279 %, 280 %, 281 %, 282 %, 283 %, 284 %, 285 %, 286 %, 287 %, 288 %, 289 %, 290 %, 291 %, 292 %, 293 %, 294 %, 295 %, 296 %, 297 %, 298 %, 299 %, 300 %, 301 %, 302 %, 303 %, 304 %, 305 %, 306 %, 307 %, 308 %, 309 %, 310 %, 311 %, 312 %, 313 %, 314 %, 315 %, 316 %, 317 %, 318 %, 319 %, 320 %, 321 %, 322 %, 323 %, 324 %, 325 %, 326 %, 327 %, 328 %, 329 %, 330 %, 331 %, 332 %, 333 %, 334 %, 335 %, 336 %, 337 %, 338 %, 339 %, 340 %, 341 %, 342 %, 343 %, 344 %, 345 %, 346 %, 347 %, 348 %, 349 %, 350 %, 351 %, 352 %, 353 %, 354 %, 355 %, 356 %, 357 %, 358 %, 359 %, 360 %, 361 %, 362 %, 363 %, 364 %, 365 %, 366 %, 367 %, 368 %, 369 %, 370 %, 371 %, 372 %, 373 %, 374 %, 375 %, 376 %, 377 %, 378 %, 379 %, 380 %, 381 %, 382 %, 383 %, 384 %, 385 %, 386 %, 387 %, 388 %, 389 %, 390 %, 391 %, 392 %, 393 %, 394 %, 395 %, 396 %, 397 %, 398 %, 399 %, 400 %, 401 %, 402 %, 403 %, 404 %, 405 %, 406 %, 407 %, 408 %, 409 %, 410 %, 411 %, 412 %, 413 %, 414 %, 415 %, 416 %, 417 %, 418 %, 419 %, 420 %, 421 %, 422 %, 423 %, 424 %, 425 %, 426 %, 427 %, 428 %, 429 %, 430 %, 431 %, 432 %, 433 %, 434 %, 435 %, 436 %, 437 %, 438 %, 439 %, 440 %, 441 %, 442 %, 443 %, 444 %, 445 %, 446 %, 447 %, 448 %, 449 %, 450 %, 451 %, 452 %, 453 %, 454 %, 455 %, 456 %, 457 %, 458 %, 459 %, 460 %, 461 %, 462 %, 463 %, 464 %, 465 %, 466 %, 467 %, 468 %, 469 %, 470 %, 471 %, 472 %, 473 %, 474 %, 475 %, 476 %, 477 %, 478 %, 479 %, 480 %, 481 %, 482 %, 483 %, 484 %, 485 %, 486 %, 487 %, 488 %, 489 %, 490 %, 491 %, 492 %, 493 %, 494 %, 495 %, 496 %, 497 %, 498 %, 499 %, 500 %, 501 %, 502 %, 503 %, 504 %, 505 %, 506 %, 507 %, 508 %, 509 %, 510 %, 511 %, 512 %, 513 %, 514 %, 515 %, 516 %, 517 %, 518 %, 519 %, 520 %, 521 %, 522 %, 523 %, 524 %, 525 %, 526 %, 527 %, 528 %, 529 %, 530 %, 531 %, 532 %, 533 %, 534 %, 535 %, 536 %, 537 %, 538 %, 539 %, 540 %, 541 %, 542 %, 543 %, 544 %, 545 %, 546 %, 547 %, 548 %, 549 %, 550 %, 551 %, 552 %, 553 %, 554 %, 555 %, 556 %, 557 %, 558 %, 559 %, 560 %, 561 %, 562 %, 563 %, 564 %, 565 %, 566 %, 567 %, 568 %, 569 %, 570 %, 571 %, 572 %, 573 %, 574 %, 575 %, 576 %, 577 %, 578 %, 579 %, 580 %, 581 %, 582 %, 583 %, 584 %, 585 %, 586 %, 587 %, 588 %, 589 %, 590 %, 591 %, 592 %, 593 %, 594 %, 595 %, 596 %, 597 %, 598 %, 599 %, 600 %, 601 %, 602 %, 603 %, 604 %, 605 %, 606 %, 607 %, 608 %, 609 %, 610 %, 611 %, 612 %, 613 %, 614 %, 615 %, 616 %, 617 %, 618 %, 619 %, 620 %, 621 %, 622 %, 623 %, 624 %, 625 %, 626 %, 627 %, 628 %, 629 %, 630 %, 631 %, 632 %, 633 %, 634 %, 635 %, 636 %, 637 %, 638 %, 639 %, 640 %, 641 %, 642 %, 643 %, 644 %, 645 %, 646 %, 647 %, 648 %, 649 %, 650 %, 651 %, 652 %, 653 %, 654 %, 655 %, 656 %, 657 %, 658 %, 659 %, 660 %, 661 %, 662 %, 663 %, 664 %, 665 %, 666 %, 667 %, 668 %, 669 %, 670 %, 671 %, 672 %, 673 %, 674 %, 675 %, 676 %, 677 %, 678 %, 679 %, 680 %, 681 %, 682 %, 683 %, 684 %, 685 %, 686 %, 687 %, 688 %, 689 %, 690 %, 691 %, 692 %, 693 %, 694 %, 695 %, 696 %, 697 %, 698 %, 699 %, 700 %, 701 %, 702 %, 703 %, 704 %, 705 %, 706 %, 707 %, 708 %, 709 %, 710 %, 711 %, 712 %, 713 %, 714 %, 715 %, 716 %, 717 %, 718 %, 719 %, 720 %, 721 %, 722 %, 723 %, 724 %, 725 %, 726 %, 727 %, 728 %, 729 %, 730 %, 731 %, 732 %, 733 %, 734 %, 735 %, 736 %, 737 %, 738 %, 739 %, 740 %, 741 %, 742 %, 743 %, 744 %, 745 %, 746 %, 747 %, 748 %, 749 %, 750 %, 751 %, 752 %, 753 %, 754 %, 755 %, 756 %, 757 %, 758 %, 759 %, 760 %, 761 %, 762 %, 763 %, 764 %, 765 %, 766 %, 767 %, 768 %, 769 %, 770 %, 771 %, 772 %, 773 %, 774 %, 775 %, 776 %, 777 %, 778 %, 779 %, 780 %, 781 %, 782 %, 783 %, 784 %, 785 %, 786 %, 787 %, 788 %, 789 %, 790 %, 791 %, 792 %, 793 %, 794 %, 795 %, 796 %, 797 %, 798 %, 799 %, 800 %, 801 %, 802 %, 803 %, 804 %, 805 %, 806 %, 807 %, 808 %, 809 %, 810 %, 811 %, 812 %, 813 %, 814 %, 815 %, 816 %, 817 %, 818 %, 819 %, 820 %, 821 %, 822 %, 823 %, 824 %, 825 %, 826 %, 827 %, 828 %, 829 %, 830 %, 831 %, 832 %, 833 %, 834 %, 835 %, 836 %, 837 %, 838 %, 839 %, 840 %, 841 %, 842 %, 843 %, 844 %, 845 %, 846 %, 847 %, 848 %, 849 %, 850 %, 851 %, 852 %, 853 %, 854 %, 855 %, 856 %, 857 %, 858 %, 859 %, 860 %, 861 %, 862 %, 863 %, 864 %, 865 %, 866 %, 867 %, 868 %, 869 %, 870 %, 871 %, 872 %, 873 %, 874 %, 875 %, 876 %, 877 %, 878 %, 879 %, 880 %, 881 %, 882 %, 883 %, 884 %, 885 %, 886 %, 887 %, 888 %, 889 %, 890 %, 891 %, 892 %, 893 %, 894 %, 895 %, 896 %, 897 %, 898 %, 899 %, 900 %, 901 %, 902 %, 903 %, 904 %, 905 %, 906 %, 907 %, 908 %, 909 %, 910 %, 911 %, 912 %, 913 %, 914 %, 915 %, 916 %, 917 %, 918 %, 919 %, 920 %, 921 %, 922 %, 923 %, 924 %, 925 %, 926 %, 927 %, 928 %, 929 %, 930 %, 931 %, 932 %, 933 %, 934 %, 935 %, 936 %, 937 %, 938 %, 939 %, 940 %, 941 %, 942 %, 943 %, 944 %, 945 %, 946 %, 947 %, 948 %, 949 %, 950 %, 951 %, 952 %, 953 %, 954 %, 955 %, 956 %, 957 %, 958 %, 959 %, 960 %, 961 %, 962 %, 963 %, 964 %, 965 %, 966 %, 967 %, 968 %, 969 %, 970 %, 971 %, 972 %, 973 %, 974 %, 975 %, 976 %, 977 %, 978 %, 979 %, 980 %, 981 %, 982 %, 983 %, 984 %, 985 %, 986 %, 987 %, 988 %, 989 %, 990 %, 991 %, 992 %, 993 %, 994 %, 995 %, 996 %, 997 %, 998 %, 999 %, 1000 %.

30

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 tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:5. Más preferentemente, la cepa bacteriana de la composición es la cepa *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

En modalidades adicionales de la invención la cepa bacteriana de la composición es de *Blautia stercoris*. También se pueden utilizar cepas estrechamente relacionadas, tales como cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia stercoris*. Preferentemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:1 o 3. Preferentemente la identidad de secuencia es con la SEQ ID NO:3. Preferentemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:3.

En modalidades adicionales de la invención, la cepa bacteriana de la composición es de *Blautia wexlerae*. También se pueden utilizar cepas estrechamente relacionadas, tales como cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia wexlerae*. Preferentemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:2 o 4. Preferentemente la identidad de secuencia es con la SEQ ID NO:4. Preferentemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.

En determinadas modalidades, la composición de la invención se utiliza para administración por vía oral. La administración oral de las cepas de la invención puede ser eficaz para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. Además, la administración por vía oral es conveniente para los pacientes y médicos y permite el suministro hacia el intestino y/o la colonización parcial o total de este.

En determinadas modalidades, la composición de la invención comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En determinadas modalidades, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica efectiva y conveniente para la preparación de composiciones estables que permiten el suministro de las bacterias, y se ha demostrado que proporciona composiciones eficaces en los ejemplos.

5 En determinadas modalidades, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición tal como se describió anteriormente.

En determinadas modalidades, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición tal como se describió anteriormente.

De manera adicional, la invención proporciona un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal y de este modo tratar o prevenir enfermedades relacionadas con *Enterobacteriaceae*, que comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Figura 1:** Medición de la población de BH mediante qPCR, que muestra un aumento en BH en los días 14 y 28 para ratas HMI con IBS que recibieron liofilizado de BH.

**Figura 2:** Estudio de dosificación en ratas HIM - cuantificación mediante RT-PCR de *B. hydrogenotrophica* en muestras fecales de ratas HIM sanas que recibieron diferentes concentraciones de las especies bacterianas.

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

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

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

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

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

**Figura 7b:** Cambio en los niveles de *Enterobacteria* en la microbiota de pacientes durante y después del tratamiento con Blautix.

**Figura 8:** Resultados de Cmax en prueba de hidrógeno en el aliento para el día 1, día 2, día 15 y día 16 para pacientes con IBS tratados con Blautix (**Figura 8 a**) y pacientes con IBS tratados con placebo (**Figura 8b**). La **Figura 8c** es una gráfica que compara el porcentaje de pacientes tratados con Blautix con una reducción de hidrógeno entre el promedio de los días 15 y 16 y el promedio de los días 1 y 2 con el porcentaje de los pacientes tratados con placebo con una reducción de hidrógeno entre esos momentos.

**Figura 9 a:** Datos apareados de prueba de aliento con hidrógeno sin corregir e hidrógeno corregido para el día 1 y día 15 para pacientes con IBS tratados Blautix; **Figure 9b:** gráfica que compara los resultados de prueba de aliento con hidrógeno sin corregir promedio para el día 1 y día 15 para el grupo de tratamiento con Blautix; **Figure 9c:** gráfica que compara los resultados de prueba de aliento con hidrógeno corregido promedio para el día 1 y día 15 para el grupo de tratamiento con Blautix.

**Figura 10 a:** Datos apareados de prueba de aliento con hidrógeno sin corregir e hidrógeno corregido para el día 1 y día 15 para pacientes con IBS tratados placebo; **Figure 10b:** gráfica que compara los resultados de prueba de aliento con hidrógeno sin corregir promedio para el día 1 y día 15 para el grupo con placebo; **Figure 10c:** gráfica que compara los resultados de prueba de aliento con hidrógeno corregido promedio para el día 1 y día 15 para el grupo con placebo.

**Figura 11:** Gráficas que comparan los resultados de prueba de aliento con hidrógeno promedio del día 1 y día 15 para el grupo de tratamiento con Blautix (Verum) y el grupo con placebo (**Figura 11 a:** hidrógeno sin corregir; **Figura 11b:** hidrógeno corregido).

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

**Figura 13:** Enumeración de bacterias en muestras fecales de rata HMA con IBS después de la administración de *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) en comparación con una solución de control.

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

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

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

### **Cepas bacterianas**

5 Las composiciones de la invención comprenden una cepa bacteriana del género *Blautia*. Los ejemplos demuestran que las bacterias de este género son útiles para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, en particular *E. coli*. Las cepas bacterianas preferidas son de las especies *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* y *Blautia wexlerae*. Otras cepas bacterianas preferidas para su uso en la invención son *Blautia producta*, *Blautia*  
10 *coccoides* y *Blautia hansenii*. La más preferida es *Blautia hydrogenotrophica*, en particular la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294.

Los ejemplos de cepas de *Blautia* para su uso en la invención incluyen *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. glucerasea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* y *B. wexlerae*. Las bacterias de la especie *Blautia* son bacterias  
15 grampositivas y no móviles que pueden ser cocoides u ovaladas y todas son organismos anaerobios obligados que producen ácido acético como producto final fundamental de la fermentación de glucosa [17]. *Blautia* puede aislarse del intestino humano, aunque se aisló *B. producta* de una muestra de septicemia.

Se ha aislado *Blautia hydrogenotrophica* (previamente conocida como *Ruminococcus*  
20 *hydrogenotrophicus*) del intestino de mamíferos, que es estrictamente anaerobia y metaboliza  $H_2/CO_2$  y lo convierte en acetato, que puede ser muy importante para la nutrición y 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 de ARNr 16S de la cepa S5a36 de *Blautia hydrogenotrophica* es X95624.1 (descrita en la presente como SEQ ID NO:5). Este  
25 ejemplo de cepa de *Blautia hydrogenotrophica* se describe en [17] y [18]. La cepa S5a33 y la cepa S5a36 corresponde a dos subclones de una cepa aislada de una muestra fecal de un sujeto sano. Presentan una morfología, fisiología y metabolismo idénticos y tienen secuencias de ARNr 16S idénticas. Por lo tanto, en algunas modalidades, la *Blautia hydrogenotrophica* para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16S de la SEQ ID NO:5.

30 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 hace

referencia a esta en la presente como cepa BH. La cepa BH se depositó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [Colección Alemana de Microorganismos] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania) el 26 de enero de 1996 “*Ruminococcus hydrogenotrophicus*” con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294 como “S5a33” el 14 de mayo de 2001. El depositante fue INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122, Saint Genès Champanelle, Francia. La titularidad de los depósitos se traspasó a 4D Pharma Plc mediante cesión.

El número de acceso de GenBank para la secuencia génica de ARNr 16S de la cepa GAM6-1<sup>T</sup> de *Blautia stercoris* es HM626177 (descrita en la presente como SEQ ID NO:1). Un ejemplo de cepa de *Blautia stercoris* se describe en [19]. El tipo de cepa de *Blautia wexlerae* es WAL 14507 = ATCC BAA-1564 = DSM 19850 [17]. El número de acceso de GenBank para la secuencia génica de ARNr 16S de la cepa WAL 14507 T de *Blautia wexlerae* es EF036467 (descrita en la presente como SEQ ID NO:2). Este ejemplo de la cepa de *Blautia wexlerae* se describe en [17].

Una cepa de *Blautia stercoris* preferida es la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42381, a la que también se hace referencia en la presente como cepa 830. Una secuencia de ARNr 16S para la cepa 830 se proporciona en SEQ ID NO:3. La cepa 830 se depositó ante la autoridad internacional de depósito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 12 de marzo de 2015 como “*Blautia stercoris* 830” y se le asignó el número de acceso NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. cambió posteriormente su nombre a 4D Pharma Research Limited.

Una cepa de *Blautia wexlerae* preferida es la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42486, a la que también se hace referencia en la presente como cepa MRX008. Una secuencia de ARNr 16S para la cepa MRX008 se proporciona en SEQ ID NO:4. La cepa MRX008 se depositó ante la autoridad internacional de depósito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 16 de noviembre de 2015 como “*Blaqutia/Ruminococcus MRx0008*” y se le asignó el número de acceso NCIMB 42486.



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

En determinadas modalidades, la cepa bacteriana para el uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia stercoris*. Preferentemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. Preferentemente la identidad de secuencia es con la SEQ ID NO:3.

Preferentemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:3. En determinadas modalidades, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia del ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia del ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia wexlerae*. Preferentemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Preferentemente la identidad de secuencia es con la SEQ ID NO:4. Preferentemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.

También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 o biotipos de las bacterias depositadas con los números de acceso NCIMB 42381 y NCIMB 42486 sean eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, en particular *E. coli*. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas o muy similares.

Las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 y que son adecuadas para el uso en la

invención pueden identificarse mediante la secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486. Por ejemplo, se puede secuenciar sustancialmente la totalidad del genoma y una cepa biotipo para el uso en la invención puede tener una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % en al menos el 80 % de su genoma total (por ejemplo, en al menos el 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, o en su genoma total). Por ejemplo, en algunas modalidades, una cepa biotipo tiene por lo menos 98 % de identidad de secuencia en al menos 98 % de su genoma o al menos 99 % de identidad de secuencia en 99 % de su genoma. Otras secuencias adecuadas para el uso en la identificación de cepas biotipo pueden incluir secuencias hsp60 o repetitivas tales como BOX, ERIC, (GTG)<sub>5</sub>, o REP o [20]. Las cepas de biotipo pueden tener secuencias con al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486. En algunas modalidades 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 *Blautia hydrogenotrophica* depositada como 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 SEQ ID NO:5. En algunas modalidades, 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 *Blautia hydrogenotrophica* depositada como DSM 10507/14294 y tiene la secuencia de ARNr 16S de SEQ ID NO:5.

De manera alternativa, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse mediante el uso del depósito con número de acceso DSM 10507/14294, el depósito con número de acceso NCIMB 42381, o depósito con número de acceso NCIMB 42486, y análisis de fragmento de restricción y/o análisis de PCR, por ejemplo mediante el uso de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados fluorescentes (FAFLP, por sus siglas en inglés) y obtención de huella por PCR de Elementos Repetitivos (rep) de ADN o perfil de proteína o secuenciación parcial del ARNr 16S o 23s. En modalidades preferidas, dichas técnicas se pueden utilizar para identificar otras cepas de *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

En determinadas modalidades, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 y que son adecuadas para uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 al analizarla mediante análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés), por ejemplo al usar enzima de restricción Sau3AI (por métodos de ejemplo y orientación ver, por ejemplo,[21]). De manera alternativa, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486.

Otras cepas de *Blautia* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, tales como biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486, pueden identificarse mediante el uso de cualquier método o estrategia adecuados, incluidos los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para uso en la invención pueden identificarse mediante el cultivo de bacterias y administración a ratas para evaluar en el ensayo de distensión. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo metabólico y/o antígenos de superficie similares a una bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 pueden ser útiles en la invención. Una cepa útil tendrá actividad moduladora de microbiota comparable a la de la cepa DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486. En particular, una cepa de biotipo suscitará efectos similares sobre *Enterobacteriaceae* a los efectos que se muestran en los Ejemplos, que se pueden identificar mediante el uso de los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

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

Un derivado de la cepa depositada con el número de acceso DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada)

a partir de la original. Un derivado de una cepa de la invención puede modificarse, por ejemplo, a nivel genético, sin erradicar la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la invención es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá actividad moduladora de microbiota comparable a la de la cepa DSM 10507/14294, NCIMB 42381 o NCIMB 42486 original. En particular, una cepa derivada suscitará efectos similares sobre *Enterobacteriaceae* a los efectos que se muestran en los Ejemplos, que se pueden identificar mediante el uso de los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos. Un derivado de la cepa DSM 10507/14294 será generalmente un biotipo de la cepa DSM 10507/14294. Un derivado de la cepa NCIMB 42381 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42381. Un derivado de la cepa NCIMB 42486 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42486.

Las referencias a células de la cepa *Blautia hydrogenotrophica* depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 comprenden 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 se encuentran comprendidas en la invención. Las referencias a células de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381 comprenden cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42381, y dichas células se encuentran comprendidas en la invención. Las referencias a células de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486 comprenden cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42486, y dichas células se encuentran comprendidas en la invención.

En modalidades preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y pueden colonizar parcial o completamente el intestino.

### **Usos terapéuticos**

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. Los niveles aumentados de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal se asocian con numerosas enfermedades y afecciones patológicas, y los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención son eficaces para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

En modalidades preferidas de todos los aspectos de la invención, la *Enterobacteriaceae* es *E. coli*. Por lo tanto, preferentemente las composiciones de la invención se utilizan para reducir el nivel de *E. coli* en el tracto gastrointestinal.

En determinadas modalidades, la *Enterobacteriaceae* es una cepa patógena, tal como *E. coli* O157:H7, O104:H4, O121, O26, O103, O111, O145, O104:H21 o O104:H4.

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

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir una enfermedad asociada con una infección por *Enterobacteriaceae*, tal como una infección por *E. coli*. En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir la diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. En dichas modalidades, *Enterobacteriaceae* puede ser una cepa patógena.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir una enfermedad asociada con niveles elevados de *Enterobacteriaceae*, tal como *E. coli*. En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir la diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. En dichas modalidades, *Enterobacteriaceae* puede ser una cepa comensal o no patógena.

En algunas modalidades, la patogénesis de la enfermedad o afección afecta el intestino. En algunas modalidades, la patogénesis de la enfermedad o afección no afecta el intestino. En algunas modalidades, la patogénesis de la enfermedad o afección no se localiza en el intestino. En algunas modalidades, el tratamiento o prevención se produce en un sitio diferente al intestino. En algunas modalidades, el tratamiento o prevención se produce en el intestino y, además, en un sitio diferente al intestino. En determinadas modalidades, la enfermedad o afección es sistémica.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir una infección por *Enterobacteriaceae*, tal como una infección por *E. coli*. En modalidades preferidas, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir

una infección del tracto gastrointestinal y en particular del ciego. En dichas modalidades, *Enterobacteriaceae* puede ser una cepa patógena.

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

En modalidades preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en el tratamiento de infecciones por *Enterobacteriaceae* patógenas.

En modalidades preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en el tratamiento infección por *E. coli*.

En modalidades preferidas, las composiciones de la invención se utilizan para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, preferentemente el nivel de *E. coli*, en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con niveles elevados de *Enterobacteriaceae*, tal como IBS, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal. Se conoce que *Enterobacteriaceae*, y en particular *E. coli*, pueden potencialmente activar o puede exacerbar la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa [22-24], así que el efecto que se muestra en los ejemplos para las composiciones de la invención puede ser beneficioso en el tratamiento de estas afecciones.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan para tratar o prevenir IBS, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal, mediante la reducción del nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

En modalidades preferidas, las composiciones de la invención comprenden la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y se utilizan para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal en el tracto de la enfermedad de Crohn, composiciones, dispepsia funcional o, más preferentemente, IBS. En modalidades

adicionales, las composiciones de la invención comprenden la bacteria depositada con el número de acceso DSM 10507/14294 y se utilizan para tratar o prevenir la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional o, más preferentemente, IBS, mediante la reducción del nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal.

5 En determinadas modalidades, la composición se administra en combinación con un antibiótico, tal como fluoroquinolona, azitromicina, ciprofloxacina o rifaximina. En determinadas modalidades, la composición se administra en combinación con un tratamiento de deshidratación, tal como una solución de rehidratación oral. La composición de la invención puede administrarse al mismo tiempo que el antibiótico o tratamiento de deshidratación, o en  
10 secuencia con el antibiótico o tratamiento de deshidratación.

En determinadas modalidades, las composiciones se utilizan en pacientes que presentan o se espera que presenten niveles aumentados de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, cuando se comparan con un sujeto sano o una población de sujetos sanos.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se utilizan en un método  
15 para tratar, prevenir o reducir la colonización del tracto gastrointestinal por *Enterobacteriaceae*.

En algunas modalidades, la composición de la invención se utiliza en un método para reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal en un sujeto que tiene un nivel aumentado de hidrógeno en su aliento en comparación con un sujeto sano. En algunas  
20 modalidades, la composición de la invención se utiliza para reducir el nivel de hidrógeno en el aliento de un sujeto que presenta o se espera que presente un nivel aumentado de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal. El sujeto es preferentemente un sujeto al cual se le diagnosticó que tenía IBS, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional, diarrea, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal y/o una infección  
25 causada por *Enterobacteriaceae* patógena, por ejemplo, *E. coli*. Los ejemplos muestran que el tratamiento con una composición de la invención reduce el nivel de hidrógeno detectado en las pruebas de hidrógeno en el aliento. Por consiguiente, los niveles de hidrógeno se evalúan preferentemente mediante una prueba de hidrógeno en el aliento. La prueba de hidrógeno en el aliento es conocida en la técnica y por lo tanto el experto en la técnica sabrá cómo realizar  
30 dicha prueba. En algunas modalidades, al paciente se le administra lactulosa como sustrato para la prueba.

La prueba de hidrógeno en el aliento también es una herramienta útil para monitorear la eficacia o la probabilidad de eficacia de reducir el nivel de *Enterobacteriaceae* y del tratamiento o prevención mediante el uso de una composición de la invención. Por ejemplo, una reducción del nivel de hidrógeno detectado en el aliento de un sujeto después del tratamiento con una composición de la invención puede indicar que el tratamiento tiene un efecto de reducción, terapéutico o preventivo. Por consiguiente, en algunas modalidades, los métodos y los usos de la invención comprenden, además, monitorear el nivel de hidrógeno en el aliento de un sujeto durante y/o después del tratamiento con una composición de la invención y evaluar de ese modo la eficacia o la probabilidad de eficacia de reducir, tratar o prevenir. Por ejemplo, los niveles de hidrógeno se pueden monitorear una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4) veces, por ejemplo, incluso antes del tratamiento, en el inicio del tratamiento, durante el tratamiento, al final del tratamiento y/o después del tratamiento, según se desee. En algunas modalidades, el nivel de hidrógeno en el aliento 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 inicio y/o antes del período de dosificación y una reducción del nivel indica la eficacia o la probabilidad de eficacia del reducir, tratar o prevenir. Por ejemplo, en algunas modalidades en las cuales el período de dosificación es de 16 días, es posible que sea deseable tomar mediciones en el día 1 y el día 16 o, por ejemplo, en el día 1, el día 2, el día 15 y el día 16. En algunas modalidades, se toman múltiples mediciones y se obtiene el promedio de esas mediciones (por ejemplo, el promedio del día 1 y el día 2 y el promedio del día 15 y el día 16). En algunas modalidades, una reducción de al menos 40 ppm en Cmax del nivel de hidrógeno indica que la reducción, el tratamiento o prevención es eficaz o es probable que sea eficaz. En algunas modalidades, el nivel de hidrógeno en el aliento del sujeto se mide solamente una vez, por ejemplo, al final o después del tratamiento, y el hallazgo de que el nivel está en un nivel predeterminado o cerca de este indica que la reducción, el tratamiento o prevención es probable que haya sido eficaz. La prueba de hidrógeno en el aliento es un ensayo estándar y por lo tanto se conocen niveles predeterminados en la técnica.

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



Se pueden detectar los niveles de *Enterobacteriaceae* en las heces de un paciente mediante el uso de técnicas estándar, tales como las técnicas de qPCR utilizadas en los ejemplos.

### **Modos de administración**

Preferentemente, las composiciones de la presente invención se administrarán al tracto gastrointestinal con el fin de permitir el suministro hacia el intestino y/o la colonización parcial o total de este con la cepa bacteriana de la invención. En general, las composiciones de la invención son administradas por vía oral, pero pueden ser administradas por vía rectal, intranasal o vía bucal o sublingual.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención pueden ser administradas como una espuma, como un aerosol o un gel.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo, en la forma de un aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (por ejemplo, suppocire, witepsol), glicerogelatina, polietilenglicol o composición de glicerina de jabón.

En determinadas modalidades, la composición de la invención es administrada al tracto gastrointestinal mediante un tubo, tal como un tubo nanogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía endoscópica percutánea (GEP), o un puerto, tal como un puerto de la pared torácica que proporciona acceso al estómago, al yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez o pueden administrarse de forma secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se administrarán de forma diaria. Los ejemplos demuestran que la administración diaria proporciona una colonización exitosa y beneficios clínicos.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención se administran regularmente, tal como de forma diaria, cada dos días, o de manera semanal, durante un período prolongado de tiempo, 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 BH puede no resultar en una colonización permanente de los intestinos, de modo que la administración regular durante períodos prolongados de tiempo puede proporcionar mayores beneficios terapéuticos.

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

5 En determinadas modalidades de la invención, el tratamiento de acuerdo con la invención se acompaña por la evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si el suministro de la cepa de la invención y/o la colonización parcial o total de esta no se logra, de modo que no se observa eficacia, o el tratamiento puede interrumpirse si el suministro y/o la colonización parcial o total son exitosos y se observa eficacia.

10 En determinadas modalidades, la composición de la invención se puede administrar a un animal preñado, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano, con el fin de prevenir el desarrollo de *Enterobacteriaceae* en su hijo en el útero y/o después de su nacimiento.

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

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

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

20 En general, las composiciones de la invención se utilizan para el tratamiento de seres humanos, aunque también se pueden utilizar para tratar animales, incluso mamíferos monogástricos tales como aves, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y desempeño de los animales. Si se administran a animales, se puede utilizar una sonda gástrica oral.

En algunas modalidades, el sujeto a quien se debe administrar la composición es un ser humano adulto. En algunas modalidades, el sujeto a quien se debe administrar la composición es un lactante humano.

### **Composiciones**

5 En general, la composición de la invención comprende bacterias. En modalidades 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.

10 Preferentemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento consolidado y se pueden encontrar lineamientos pertinentes disponibles, por ejemplo, en las referencias [25-27]. Los ejemplos demuestran que las composiciones liofilizadas son particularmente eficaces.

15 De manera alternativa, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano activo vivo. Los ejemplos demuestran que los cultivos de bacterias de la invención son terapéuticamente eficaces.

En algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención no ha sido inactivada, por ejemplo, no ha sido inactivada por calor. En algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención no ha sido destruida, por ejemplo, no ha sido destruida por calor. En algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención no ha sido atenuada, por ejemplo, no ha sido atenuada por calor. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención no ha sido destruida, inactivada y/o atenuada. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención está viva. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viable. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención puede colonizar de forma parcial o total el intestino. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viable y puede colonizar de forma parcial o total el intestino.

25 En algunas modalidades, la composición comprende una mezcla de cepas bacterianas vivas y cepas bacterianas que han sido destruidas.

30 En modalidades preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir el suministro de la cepa bacteriana en el intestino. La encapsulación protege la composición de

la degradación hasta el suministro en la ubicación objetivo mediante, por ejemplo, la ruptura de estímulos químicos o físicos tales como presión, actividad enzimática o desintegración física, que pueden desencadenarse por los cambios en el pH. Se puede utilizar cualquier método de encapsulación adecuado. Las técnicas de encapsulación de ejemplo incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en las superficies del portador sólido, autoagregación mediante floculación o con agentes reticulantes y contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. Los lineamientos sobre la encapsulación que pueden ser útiles para preparar las composiciones de la invención se encuentran disponibles, por ejemplo, en las referencias [28-29].

La composición puede administrarse por vía oral y puede estar en forma de un comprimido, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque *Blautia* son anaerobios. Se pueden incluir otros ingredientes (tal como la vitamina C, por ejemplo) como depuradores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar el suministro y/o la colonización parcial o total y la supervivencia *in vivo*. De manera alternativa, la composición probiótica de la invención puede administrarse oralmente como un alimento o producto nutricional, tal como leche o productos lácteos fermentados a base de suero de leche, o como un producto farmacéutico. La composición se puede formular como un probiótico.

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

Una dosis diaria adecuada de las bacterias, por ejemplo para un humano adulto, puede ser desde alrededor de  $1 \times 10^3$  hasta alrededor de  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés); por ejemplo, desde alrededor de  $1 \times 10^7$  hasta alrededor de  $1 \times 10^{10}$  CFU; en otro ejemplo, desde alrededor de  $1 \times 10^6$  hasta alrededor de  $1 \times 10^{10}$  CFU; en otro ejemplo, desde alrededor de  $1 \times 10^7$  hasta alrededor de  $1 \times 10^{11}$  CFU; en otro ejemplo, desde alrededor de  $1 \times 10^8$  a alrededor de  $1 \times 10^{10}$  CFU; en otro ejemplo, desde alrededor de  $1 \times 10^8$  a alrededor de  $1 \times 10^{11}$  CFU.

En determinadas modalidades, la dosis de las bacterias es al menos  $10^9$  células por día, tal como al menos  $10^{10}$ , al menos  $10^{11}$  o al menos  $10^{12}$  células por día.

En determinadas modalidades, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de alrededor de  $1 \times 10^6$  a alrededor de  $1 \times 10^{11}$  CFU/g, con respecto al peso de la composición; por ejemplo, de alrededor de  $1 \times 10^8$  a alrededor de  $1 \times 10^{10}$  CFU/g. La dosis puede ser, por ejemplo, 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

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

10 En determinadas modalidades, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 30 % en peso, con respecto al peso total de la composición, (por ejemplo, de alrededor de 5 a 20 % en peso). Los carbohidratos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: fructooligosacáridos (o FOS), fructooligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalto-oligosacáridos, pectinas, xilooligosacáridos (o XOS), quitooligosacáridos (o COS), betaglucanos, almidones resistentes  
15 y modificados con goma arábica, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena y fibras cítricas. En un aspecto, los prebióticos son los fructo-oligosacáridos de cadena corta (por simplicidad se muestran en adelante como FOS-c.c); dichos FOS-c.c. no son carbohidratos digeribles, generalmente se obtienen por la conversión de azúcar de remolacha e incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

20 Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de esos excipientes adecuados pueden encontrarse en la referencia [30]. Los portadores o diluyentes aceptables para su uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la  
25 referencia [31]. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. El diluyente, excipiente o portador farmacéutico se puede seleccionar conforme a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como portador, excipiente o  
30 diluyente, o además de estos, todo aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento y/o agente solubilizante. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen

almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa en flujo libre, beta-lactosa, endulzantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, tintes e incluso agentes saborizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico, cisteína y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, por ejemplo, en algunas modalidades, el conservante se selecciona de benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. Otro ejemplo de un portador 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 complemento nutricional. De manera similar, un producto alimenticio puede formularse para mejorar el sabor de la composición de la invención o para hacer la composición más atractiva para su consumo siendo más similar a un artículo alimenticio común, en lugar de a una composición farmacéutica. En determinadas modalidades, la composición de la invención se formula como un producto a base de leche. La expresión “producto a base de leche” significa cualquier líquido o producto a base de suero de leche o leche semisólida que tiene un contenido graso variable. El producto a base de leche puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche desnatada, leche entera, leche recombinada a partir de leche en polvo y suero de leche sin ningún procesamiento, o un producto procesado, tal como yogur, leche cuajada, cuajada, leche agria, leche entera agria, suero de manteca y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye bebidas lácteas, tales como bebidas de suero de leche, leches fermentadas, leches condensadas, leche para bebés o para lactantes; leches saborizadas, helado; alimentos que contienen leche, tales como dulces.

En algunas modalidades, las composiciones de la invención comprenden una o más cepas bacterianas del género *Blautia* y no contienen bacterias de ningún otro género, o comprenden únicamente cantidades biológicamente irrelevantes o mínimas de bacterias de otros géneros.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención contienen una única especie o cepa bacteriana y no contienen ninguna otra especie o cepa bacteriana. Dichas composiciones pueden comprender solamente cantidades biológicamente irrelevantes o mínimas de cepas bacterianas o especies. Dichas composiciones pueden ser un cultivo que  
 5 esté sustancialmente libre de otras especies de organismos. En algunas modalidades, dichas composiciones pueden ser un liofilizado que esté sustancialmente libre de otras especies de organismos.

En determinadas modalidades, las composiciones de la invención comprenden una o más cepas bacterianas del género *Blautia*, por ejemplo, *Blautia hydrogenotrophica*, y no contienen  
 10 ningún otro género bacteriano o comprenden solamente cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otro género. En determinadas modalidades, las composiciones de la invención comprenden una única especie de *Blautia*, por ejemplo, *Blautia hydrogenotrophica* y no contienen ninguna otra especie bacteriana o comprenden solamente cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra especie. En  
 15 determinadas modalidades, las composiciones de la invención comprenden una única cepa de *Blautia*, por ejemplo, *Blautia hydrogenotrophica*, y no contienen ninguna otra especie o cepa bacteriana, o comprenden solamente cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra especie o cepa.

En algunas modalidades, las composiciones de la invención comprenden más de una especie  
 20 o cepa bacteriana. Por ejemplo, en algunas modalidades, 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, de manera opcional, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas modalidades, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 cepas de la misma especie (por ejemplo, menos de 45, 40, 35, 30,  
 25 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 cepas) y, de manera opcional, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas modalidades, 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, de manera opcional, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas  
 30 modalidades, 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, de manera opcional, no contienen bacterias de ningún otro género. En algunas modalidades, 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, de manera opcional, no contienen bacterias de ningún otro género. En algunas modalidades, 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, de manera opcional, no contienen bacterias de ningún otro género. La invención comprende cualquier combinación de lo anterior.

En algunas modalidades, la composición comprende un consorcio microbiano. Por ejemplo, en algunas modalidades, la composición comprende la cepa bacteriana *Blautia* como parte de un consorcio bacteriano. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cepa bacteriana *Blautia* está presente en combinación con una o más (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20) de otras cepas bacterianas de otros géneros con los que puede vivir de forma simbiótica *in vivo* en el intestino. Por ejemplo, en algunas modalidades, la composición comprende una cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica* en combinación con una cepa bacteriana de un género diferente. En algunas modalidades, el consorcio microbiano comprende dos o más cepas bacterianas obtenidas de una muestra fecal de un único organismo, por ejemplo, un ser humano. En algunas modalidades, el consorcio microbiano no se encuentra junto en la naturaleza. Por ejemplo, en algunas modalidades, el consorcio microbiano comprende cepas bacterianas obtenidas de muestras fecales de al menos dos organismos diferentes. En algunas modalidades, los dos organismos diferentes son de la misma especie, por ejemplo, dos seres humanos diferentes. En algunas modalidades, los dos organismos diferentes son un infante humano y un ser humano adulto. En algunas modalidades, los dos organismos diferentes son un ser humano y un mamífero no humano.

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

En algunas modalidades en las que la composición de la invención comprende más de un género, especie o cepa bacteriana, el género, especie o cepa bacteriana pueden ser para



administración separada, simultánea o secuencial. Por ejemplo, la composición puede comprender todos los géneros, especies o cepas bacterianas, o los géneros, especies o cepas bacterianas pueden almacenarse separadamente y pueden administrarse de forma separada, simultánea o secuencial. En algunas modalidades, el o los géneros, especies o cepas bacterianas se almacenan de forma separada, pero se mezclan antes de su uso.

En algunas modalidades, la cepa bacteriana para su uso en la invención se obtiene de heces de un ser humano adulto. En algunas modalidades en las que la composición de la invención comprende más de una cepa bacteriana, todas las cepas bacterianas se obtienen de heces de un ser humano adulto o, si otras cepas bacterianas están presentes, están presentes únicamente en cantidades mínimas. Las bacterias pueden haberse cultivado posteriormente a su obtención a partir de heces de un ser humano adulto y su uso en una composición de la invención.

En algunas modalidades, la o las cepas bacterianas de *Blautia* son los únicos agentes terapéuticamente activos en una composición de la invención. En algunas modalidades, la o las cepas bacterianas en la composición son los únicos agentes terapéuticamente activos en una composición de la invención.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden requerir, o no, aprobación comercial. En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde dicha cepa bacteriana está liofilizada. En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde dicha cepa bacteriana está secada por aspersión. En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la cepa bacteriana está liofilizada o secada por aspersión y donde está viva. En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la cepa bacteriana está liofilizada o secada por aspersión y donde es viable. En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la cepa bacteriana está liofilizada o secada por aspersión y donde puede colonizar parcial o completamente el intestino. En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la cepa bacteriana está liofilizada o secada por aspersión y donde es viable y puede colonizar parcial o completamente el intestino.

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

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

En determinadas modalidades, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; donde la cepa bacteriana se encuentra en una cantidad suficiente para reducir los niveles de *Enterobacteriaceae* y/o tratar un trastorno asociado con niveles elevados de *Enterobacteriaceae* cuando se administra a un sujeto que lo necesita; y donde el trastorno se asocia con niveles elevados de *Enterobacteriaceae*, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dispepsia funcional o, más preferentemente, IBS, o diluyente, gastroenteritis, infección del tracto urinario o meningitis neonatal.

En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la cantidad de la cepa bacteriana es desde alrededor de  $1 \times 10^3$  hasta alrededor de  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias por gramo con respecto a un peso de la composición.

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

En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en administración oral, rectal, subcutánea, nasal, bucal y sublingual.

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

En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste en etanol, glicerol y agua.

En determinadas modalidades, 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, betalactosa, 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.

En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizante.

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

En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde dicha cepa bacteriana está liofilizada.

15 En determinadas modalidades, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde cuando la composición se almacena en un recipiente sellado a alrededor de 4 °C o alrededor de 25 °C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene 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 alrededor de: 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1  
20 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

En algunas modalidades, la composición de la presente invención se proporciona en un recipiente sellado que comprende una composición tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el recipiente sellado es una bolsa o botella. En algunas modalidades, la composición de la presente invención se proporciona en una jeringa que comprende una  
25 composición tal como se describe en la presente.

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

30 En algunas modalidades, las composiciones de la invención se administran de forma oral. La administración oral puede implicar ingerir el compuesto para que este ingrese en el tracto

gastrointestinal y/o una administración bucal, lingual o sublingual por medio de la cual el compuesto ingrese en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen tapones sólidos, micropartículas sólidas, semisólidas y líquidas que incluyen fases múltiples o sistemas dispersos) tales como comprimidos; cápsulas duras o blandas que contienen multi o nano partículas, líquidos (por ejemplo, soluciones acuosas), emulsiones o polvos; grageas (que incluyen las rellenas de líquido); caramelos masticables; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; pulverizadores; y parches bucales/mucoadhesivos.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica es una formulación entérica, es decir, una formulación gastrorresistente (por ejemplo, resistente al pH gástrico) que es adecuada para el suministro de la composición de la invención al intestino mediante administración oral. Las formulaciones entéricas pueden ser particularmente útiles cuando las bacterias u otro componente de la composición son sensibles al ácido, por ejemplo, vulnerables a la degradación en condiciones gástricas.

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

En algunas modalidades, la formulación entérica es intrínsecamente entérica, por ejemplo, gastrorresistente sin necesidad de un recubrimiento entérico. Por lo tanto, en algunas modalidades, la formulación es una formulación entérica que no comprende un recubrimiento entérico. En algunas modalidades, la formulación es una cápsula hecha a partir de un material termogelificante. En algunas modalidades, el material termogelificante es un material celulósico, tal como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En algunas modalidades, la cápsula comprende una cubierta que no contiene ningún polímero formador de película. En algunas modalidades, la cápsula comprende una cubierta y la cubierta comprende hidroxipropilmetilcelulosa y no comprende ningún polímero formador de

películas (por ejemplo, véase [32]). En algunas modalidades, la formulación es una cápsula intrínsecamente entérica (por ejemplo, Vcaps® de Capsugel).

En algunas modalidades, la formulación es una cápsula blanda. Las cápsulas blandas son cápsulas que, debido a las adiciones de suavizantes, tales como, por ejemplo, glicerol, sorbitol, maltitol y polietilenglicoles, presentes en la cubierta de la cápsula, pueden tener una determinada elasticidad y suavidad. Las cápsulas blandas pueden producirse, por ejemplo, sobre la base de gelatina o almidón. Las cápsulas suaves de base gelatina están comercialmente disponibles de diversos proveedores. Dependiendo del método de administración, tal como, por ejemplo, de forma oral o rectal, las cápsulas blandas pueden tener varias formas que pueden ser, por ejemplo, redonda, oval, oblonga o en forma de torpedo. Las cápsulas blandas pueden producirse por medio de procesos convencionales, tales como, por ejemplo, mediante el proceso Scherer, el proceso Accogel o el proceso de soplado o por gota a gota.

### ***Métodos de cultivo***

Las cepas bacterianas para su uso en la presente invención pueden cultivarse mediante el uso de técnicas de microbiología estándares tal como se detalla, por ejemplo, en las referencias [33-35].

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),  $\text{NaHCO}_3$  (0,4 g), cisteína (0,1 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,045 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,045 g),  $\text{NaCl}$  (0,09 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,09 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,009 g),  $\text{CaCl}_2$  (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1  $\mu\text{g}$ ), cobalamina (1  $\mu\text{g}$ ), ácido *p*-aminobenzoico (3  $\mu\text{g}$ ), ácido fólico (5  $\mu\text{g}$ ) y piridoxamina (15  $\mu\text{g}$ ).

### ***General***

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de los conocimientos en la técnica. Dichas técnicas se explican en su totalidad en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las referencias [36-43], etc.

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

La expresión “alrededor de” 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 “sustancialmente libre” de  $Y$  puede encontrarse completamente libre de  $Y$ . Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significan que, cuando están alineadas, dicho porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse mediante el uso de programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos que se describen en la sección 7.7.18 de la ref. [44]. Una alineación preferida se determina por medio del algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda afín de huecos con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se describe en la ref. [45].

A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende diversas etapas puede comprender etapas adicionales al inicio o al final del método, o puede comprender etapas intermedias adicionales. Además, las etapas pueden combinarse, omitirse o llevarse a cabo en un orden alternativo, si corresponde.

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

## **FORMAS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION**

### ***Ejemplo 1 - Administración de inóculos bacterianos a ratas con microbiota de intestino de IBS***

#### **Resumen**

Se inocularon las ratas con microbiota fecal de un sujeto humano con IBS. A las ratas se les administraron composiciones que comprendían cepas bacterianas de acuerdo con la invención y se analizó la colonización por *Blautia hydrogenotrophica*.

Cepa

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

Composiciones y administración

Liofilizado de BH - administrado por sonda oral

5 Solución de control administrada por sonda oral

Ratas

Se inocularon con microbiota intestinal humana de un sujeto con IBS

Diseño del estudio

Día -14 - se inocularon ratas con microbiota intestinal humana de un sujeto con IBS

10 Días 0 a 28 - dosis diaria de liofilizado de BH o solución de control

Días 0, 14 y 28 - qPCR de población de BH en muestras fecales

Resultados

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

15

Conclusiones

La administración de composiciones que comprenden *Blautia hydrogenotrophica* llevó a una colonización exitosa.

20

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

Se estudiaron los efectos de la administración de un liofilizado de la cepa DSM 10507/14294 de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) en ratas HIM saludables y los resultados se informan en las Figuras 2-5. Se proporcionan más detalles con respecto a los experimentos en las descripciones que anteceden de las figuras. La Figura 2 muestra que la dosis adecuada para BH en ratas es  $10^9$  células por día o más. La Figura 3 muestra que en estos experimentos BH no colonizó de forma permanente el tracto digestivo de las ratas. La Figura 4 muestra que BH se halla principalmente en el ciego. Sorpresivamente, la Figura 5 muestra que la administración de BH induce una reducción estadísticamente significativa de *Enterobacteriaceae* en heces de ratas, según se detecta mediante qPCR.

25

30

### **Ejemplo 3 - Administración de liofilizado bacteriano en un modelo de rata de IBS**

Se investigaron adicionalmente los efectos de la administración de un liofilizado de la cepa DSM 10507/14294 de *Blautia hydrogenotrophica* (BH) en un modelo de rata de IBS. Se inocularon ratas libres de gérmenes con muestras fecales de pacientes con C-IBS (con estreñimiento) o U-IBS (sin subtipo). Los resultados se informan en la Figura 6 y se proporcionan más detalles con respecto a los experimentos en las descripciones que anteceden de las figuras. La Figura 6 confirma que la administración de liofilizado de BH provoca una reducción estadísticamente significativa de *Enterobacteriaceae*, que es principalmente *E. coli*. Tal como se esperaba, también se observó un aumento en BH.

### **Ejemplo 4 - Comparación de *Blautia hydrogenotrophica* en microbiota de paciente**

Se llevó a cabo un ensayo clínico de fase I en el cual se le administró *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", cepa depositada con el número de acceso DSM 10507/14294) a pacientes humanos que tenían síndrome de intestino irritable (IBS). A los pacientes se les administró Blautix durante un período de dosificación (días 1-16) con un período de descanso entre los días 19-23. Se halló que Blautix era tanto seguro como bien tolerado. Se midió *Blautia hydrogenotrophica* (Blautix) en la microbiota de los pacientes en el día 1, día 16 y al final del estudio (EOS, por sus siglas en inglés) con los siguientes resultados:

Tabla 1:

| Pacient<br>e | Tratamient<br>o | Blautix Día 1 |              | Blautix Día 16 |              | Blautix EOS  |              |
|--------------|-----------------|---------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
|              |                 | Promedi<br>o  | SD           | Promedi<br>o   | SD           | Promedi<br>o | SD           |
| Placebo      | Sano            | 4,30E+0<br>7  | 8,40E+0<br>7 | 4,79E+0<br>7   | 7,63E+0<br>7 | 3,59E+0<br>7 | 6,23E+0<br>7 |
| Blautix      | Sano            | 2,92E+0<br>7  | 2,25E+0<br>7 | 6,35E+0<br>7   | 1,02E+0<br>8 | 2,58E+0<br>7 | 3,34E+0<br>7 |
| Placebo      | IBS             | 3,58E+0<br>7  | 3,45E+0<br>7 | 2,44E+0<br>7   | 3,13E+0<br>7 | 2,09E+0<br>7 | 2,47E+0<br>7 |
| Blautix      | IBS             | 3,17E+0<br>7  | 6,28E+0<br>7 | 8,53E+0<br>7   | 1,57E+0<br>8 | 3,71E+0<br>7 | 5,56E+0<br>7 |



El análisis muestra tendencias en los niveles de *Blautia hydrogenotropica* en las muestras de heces de pacientes (véase la Figura 7a). Los participantes que recibieron Blautix tuvieron niveles aumentados de bacterias en sus muestras de heces después del período de dosificación (día 16). Esto demuestra la administración exitosa de Blautix al intestino. Los niveles vuelven a la normalidad después del período de reposo (final del estudio; EOS). Por lo tanto, Blautix no coloniza de forma permanente el intestino una vez que cesa la dosificación. Ambas observaciones son congruentes con el modelo preclínico.

**Ejemplo 5 - comparación de Enterobacteria en microbiota de pacientes.**

También se midió la Enterobacteria en la microbiota de los durante el ensayo clínico de fase I en el día 1, día 16 y al final del estudio con los siguientes resultados:

| Pacient<br>e | Tratamient<br>o | Enterobacteria Día<br>1 |              | Enterobacteria Día<br>16 |          | Enterobacteria<br>EOS |              |
|--------------|-----------------|-------------------------|--------------|--------------------------|----------|-----------------------|--------------|
|              |                 | Promedi<br>o            | SD           | Promedio                 | SD       | Promedi<br>o          | SD           |
| Placebo      | Sano            | 5,89E+0<br>8            | 1,00E+0<br>9 | 3,32E+08                 | 6,26E+08 | 2,85E+0<br>8          | 4,28E+0<br>8 |
| Blautix      | Sano            | 9,96E+0<br>8            | 1,06E+0<br>9 | 4,87E+08                 | 6,64E+08 | 2,70E+0<br>8          | 3,76E+0<br>8 |
| Placebo      | IBS             | 7,85E+0<br>8            | 1,28E+0<br>9 | 3,01E+08                 | 4,92E+08 | 2,45E+0<br>9          | 2,45E+0<br>9 |
| Blautix      | IBS             | 8,38E+0<br>9            | 1,96E+1<br>0 | 1,12E+09                 | 1,45E+09 | 6,17E+0<br>8          | 9,91E+0<br>8 |

El análisis muestra tendencias en los niveles de Enterobacteria en las muestras de heces de pacientes (véase la Figura 7b). Los pacientes con IBS tratados con Blautix tuvieron una reducción de Enterobacteria. Esto es congruente con las observaciones a partir del modelo preclínico.

**Ejemplo 6 - Resultados de la prueba de hidrógeno en el aliento**

Los niveles de hidrógeno en el aliento son un biomarcador de la actividad de Blautix - el modo de acción implica el metabolismo de H<sub>2</sub> endógeno para producir acetato. Se les administró lactulosa a sujetos humanos y se tomaron muestras de los niveles (Cmax) de hidrógeno (H<sub>2</sub>)

en cuatro momentos: día 1, día 2, día 15 y día 16. Los resultados sin corregir de hidrógeno se convirtieron en resultados corregidos de hidrógeno.

Algunos pacientes se excluyeron del análisis. Hubo tres motivos por los cuales no se incluyó un sujeto en el análisis de prueba de hidrógeno en el aliento. 1) Produjeron un resultado de prueba de hidrógeno en el aliento CMAX de  $<20$  en uno de los cuatro días de toma de muestras y, por lo tanto, se consideró que no respondían a la prueba; 2) produjeron metano (se toma que produjeron más metano que hidrógeno en la prueba de aliento), esto afecta la respuesta de hidrógeno; y/o 3) se obtuvo un valor anómalo en la prueba de hidrógeno en el aliento (232 ppm). Los sujetos 3.12 (Blautix), 3.24 (Blautix), 4.07 (Blautix) se excluyeron como sujetos que no respondían. Los sujetos 3.03 (Blautix) y 3.08 (Placebo) se excluyeron por producir metano (4.07, mencionado como excluido anteriormente, también produjo metano). El sujeto 4.09 (Placebo) se excluyó debido a un valor anómalo.

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

La Figura 9 muestra los resultados de hidrógeno sin corregir y corregido para el grupo de tratamiento con Blautix (Verum) junto con el análisis estadístico de los resultados. Se halló que los valores promedio para  $H_2$  sin corregir y corregido diferían entre el día 1 y el día 15. Después de 13,5 días de tratamiento, se detectó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de  $H_2$  en la prueba de aliento Cmax después de la estimulación con lactulosa. En contraste, para el grupo con placebo, se halló que el promedio era equivalente para el día 1 y día 15 ( $p > 0,05$ ) (Figura 10). Por lo tanto, el promedio para el grupo de tratamiento (también mencionado como el grupo VERUM) disminuyó entre el día 1 y el día 15, mientras que el promedio para el grupo con placebo fue equivalente entre el día 1 y el día 15 tanto para los resultados de hidrógeno sin corregir como los resultados de hidrógeno corregido (Figura 11).

### ***Ejemplo 7 - Prueba de estabilidad***

Una composición descrita en la presente que contiene al menos una cepa bacteriana descrita en la presente se almacena en un envase sellado a 25 °C o 4 °C y el envase se coloca en una

atmósfera que tiene 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 % de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la cepa bacteriana permanecerá según la medición en unidades formadoras de colonias determinada por protocolos estándares.

5 ***Ejemplo 8 – Eficacia de *B. hydrogenotrophica* para alterar la microbiota en rata asociada con microbiota humana (rata HMA, por sus siglas en inglés)***

Resumen

10 Se inocularon grupos de 16 ratas libres de gérmenes (que comprendían 8 ratas en el grupo de control y 8 ratas en el grupo de tratamiento) con microbiota fecal de un sujeto IBS humano (ratas IBS-HMA). Se llevaron a cabo tres experimentos sucesivos con muestras fecales de 3 pacientes de IBS diferentes. Se inocularon otros dos grupos de ratas (n = 10) con muestras fecales de sujetos saludables (n = 2 sujetos; 2 grupos de ratas HMA saludables) como control. Por tanto, había 24 ratas asociadas con microbiota IBS (control), 24 ratas asociadas con  
15 microbiota IBS tratadas con Blautix y 20 ratas asociadas con microbiota saludables. A la mitad de las ratas IBS-HMA se les administró posteriormente durante 28 días la composición que comprende la cepa bacteriana de *B. hydrogenotrophica* de conformidad con la invención mientras que la otra mitad de los animales recibió una solución de control. El día 28 después de la administración, se analizaron los niveles de microorganismos a partir de microbiota fecal  
20 que se halló previamente que se veía afectado en pacientes con IBS.

Cepa

Cepa DSM 10507<sup>T</sup>/14294 de *Blautia hydrogenotrophica* (BH)

Composición y administración

25 El liofilizado de BH se suspendió en una solución mineral estéril a una concentración de 10<sup>10</sup> bacterias por ml. Se administraron dos ml de esta suspensión por día por rata IBS-HMA, mediante sonda gástrica oral, durante un período de 28 días.

La solución de control fue la solución mineral estéril que se administró diariamente (2 ml por rata) mediante sonda gástrica oral al grupo de control de ratas IBS-HMA.

Ratas

30 Se inocularon ratas Fisher macho libres de gérmenes (10 semanas de edad) con microbiota fecal humana de un sujeto IBS (ratas IBS-HMA). Se inocularon dieciséis ratas con el mismo

inóculo fecal humano. Se llevaron a cabo tres experimentos sucesivos con muestras fecales de tres pacientes de IBS diferentes. Se inocularon otros dos grupos de diez ratas con una muestra fecal de 2 sujetos saludables (grupos de control de sensibilidad normal).

### Diseño del estudio

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

### Resultados

- La **Figura 12** presenta los resultados de análisis qPCR de la población de *B. hydrogenotrophica* en muestras fecales de ratas IBS-HMA que reciben solución de control o
- 15 liofilizado de BH. Se observó un aumento significativo en la población de BH al final del período de administración (D 28) en las ratas que recibían el liofilizado de BH, lo que confirma el suministro exitoso de BH en el colon.

- La **Figura 13** informa el efecto de la administración de *B. hydrogenotrophica* sobre determinados microorganismos en la microbiota fecal, que se halló previamente que se veía
- 20 afectada en pacientes con IBS. El nivel de especies de *Enterobacteriaceae* disminuyó después de la administración de *B. hydrogenotrophica*.

### Conclusiones

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

### 25 **Ejemplo 9 - Cambios en los síntomas del paciente durante ensayo clínico de fase I**

- Se llevó a cabo un ensayo clínico de fase I en el cual se le administró *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", cepa depositada con el número de acceso DSM 10507 y también con el número de acceso DSM 14294) a pacientes humanos que tenían síndrome de
- 30 intestino irritable (IBS). A los pacientes se les administró Blautix durante un período de dosificación (días 1-16) con un período de descanso entre los días 19-23. Se halló que Blautix era tanto seguro como bien tolerado. Los síntomas se monitorearon, de los cuales uno era

diarrea. El estudio registró si los pacientes experimentaban una mejora, ningún cambio o empeoramiento de cada uno de estos síntomas. Se compararon los resultados de los pacientes a los que se les administró Blautix con los obtenidos de pacientes a los que se les administró placebo. Se monitorearon los síntomas en tres momentos: día 1, día 15/16 y al final del estudio. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15.

Cuando se compararon los síntomas informados por pacientes en el día 16 con el valor de referencia en el día 1, 82 % de 17 pacientes con IBS que recibieron Blautix informaron una mejora en los síntomas (Figura 14). La mejora en los síntomas, de los cuales uno era diarrea, sustenta el uso de Blautix para el tratamiento o prevención de la diarrea.

50 % de los pacientes que recibieron placebo informaron una mejor en los síntomas (Figura 14). Las tasas elevadas de respuesta al placebo son un fenómeno establecido en los estudios clínicos de IBS. Se aprobó recientemente Xifaxan para tratar IBS basándose en mejoras mucho menores con respecto al placebo (véase: <http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d.xml>).

Se espera un empeoramiento de los síntomas al finalizar el estudio (día 19-23) en comparación con los síntomas presentes al finalizar la dosificación (día 16) basándose en lo que se describe en la presente. Este empeoramiento de los síntomas se observó en el ensayo clínico de fase I: 41 % de los pacientes con IBS informaron un empeoramiento de los síntomas después de cesar la dosificación con Blautix (Figura 15). El empeoramiento de los síntomas, uno de los cuales era diarrea, después del cese de la dosificación de Blautix, por lo tanto, también sustenta el uso de Blautix para tratar o prevenir la diarrea.

### Secuencias

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

```

1 tgcaagtcga gccaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61 gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaac
121 ggctgctaataccgcataag cgcacggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccggtgg
181 tatgagatgg acccgcgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc

```

301 ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc  
 361 gcgtaagga agaagtatct cggatgtaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt  
 421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca  
 481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg  
 5 541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaactgt tttcttgag tgccggagag  
 601 gtaagcggaa ttctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc  
 661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg  
 721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaagc  
 781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg  
 10 841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag  
 901 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt  
 961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgctgac agctcgtgc gtgagatgtt  
 1021 gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccct atctcagta gccagcaggt gaagctgggc  
 1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat  
 15 1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc  
 1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac  
 1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttccc  
 1321 ggtctgtac acaccgccc tcacacatg ggagtcagta acgcccgaag tc  
  
 20 SEQ ID NO:2 (*Blautia wexlerae* cepa WAL 14507 gen de ARN ribosomal 16S, secuencia  
 parcial - EF036467)  
 1 caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaattaat tctagtggcg  
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc  
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat  
 25 181 aagatggacc cgcgttggat tagcttgtg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc  
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta  
 301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg  
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacgttacc  
 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc  
 30 481 gttatccgga ttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa  
 541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta

601 agcggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa  
 661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt  
 721 agataccctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca  
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa  
 5 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca  
 901 acggaagaa cctaccaag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggatctttcc  
 961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttg  
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcact  
 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc  
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg  
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac  
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cggatgaatac gttccgggt  
 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac  
 1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

15

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

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAG  
 CGCTTACGACAGAACCTTCGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
 AACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACC  
 20 GCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACC  
 CGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAACGGCCCAACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGG  
 CCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
 CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAG  
 GAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACT  
 25 AAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTA  
 TCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGC  
 TGGGGCTTAACCCCAAGGACTGCATTGGAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGC  
 GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG  
 CGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
 30 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTT  
 CGGTGCCGCAGCAAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAA

CTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTCTGAAGCAA  
 CGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGGAACCTTTCCTT  
 CGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCAC  
 5 TCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATG  
 CCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGCCC  
 GCGAGGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGA  
 CTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCC  
 GGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCCGAAGTCAGTGAC  
 10 CCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTGGGGTGAAGTCTAGGG  
 GGT

SEQ ID NO:4 (secuencia de consenso de ARNr 16S para *Blautia wexlerae* cepa MRX008)  
 TTCATTGAGACTTCGGTGGATTCTAGTTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCG  
 15 TGGGTAACCTGCCTTATACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAG  
 CGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTT  
 GGATTAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGGCCTGAG  
 AGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
 TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAG  
 20 TATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGC  
 CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT  
 TTAAGTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCT  
 CAACCTGTGGACTGCATTGGAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATT  
 CCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT  
 25 ACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC  
 CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGT  
 GCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAA  
 AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCG  
 AAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGG  
 30 GACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTA  
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTAAAGGTGGGCACTCTG



GGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC  
 CTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGA  
 GATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACA  
 CGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGT  
 5 CTTGTACACACCGCCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCCGAAGTCAGTGACCTAA  
 CTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

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

10 1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga  
 61 ttccggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct  
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt  
 181 cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtg gattagctag  
 241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc  
 15 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtgga gaattattgca  
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa  
 421 acttctatca gcagggaaga aagtgcggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt  
 481 gccagcagcc gcggtaatc gtaaggggca agcggtatcc ggatttactg ggtgtaaagg  
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat  
 20 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcttagtgt agcggtgaaa  
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt  
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaa  
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta  
 841 ttccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca  
 25 901 caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac  
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca  
 1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacctt  
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg  
 1141 gaggaagggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc  
 30 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg  
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc

1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctcttga cacaccgccc gtcacaccat

1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtgg

1441 gactgataac tggggtga

## REFERENCIAS

- [1] Spor et ál. (2011) *Nat Rev Microbiol*. 9(4):279-90.
- 5 [2] Eckburg et ál. (2005) *Science*. 10; 308(5728):1635-8).
- [3] Tap et ál. (2009), *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84
- [4] Macpherson et ál. (2001) *Microbes Infect*. 3(12):1021-35
- [5] Macpherson et ál. (2002) *Cell Mol Life Sci*. 59(12):2088-96.
- [6] Mazmanian et ál. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- 10 [7] Frank et ál. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [8] Scanlan et ál. (2006) *J Clin Microbiol*. 44(11):3980-8.
- [9] Kang et ál. (2010) *Inflamm Bowel Dis*. 16(12):2034-42.
- [10] Machiels et ál. (2013) *Gut*. 63(8):1275-83.
- [11] Lopetuso et ál. (2013), *Gut Pathogens*, 5: 23
- 15 [12] WO 2013/050792
- [13] WO 03/046580
- [14] WO 2013/008039
- [15] WO 2014/167338
- [16] Lee y Lee (2014) *World J Gastroenterol*. 20(27): 8886-8897.
- 20 [17] Liu et ál. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896–1902.
- [18] Bernalier et ál. (1996) *Arch. Microbiol*. 166 (3), 176-183.
- [19] Park et ál. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol*. 62(Pt 4):776-9.
- [20] Masco et ál. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [21] Srůtková et ál. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- 25 [22] Darfeuille-Michaud et ál. (2004) *Gastroenterology* 127(2):412-21.
- [23] Strus et ál. (2015) *Cent Eur J Immunol*.40(4):420-30.
- [24] Petersen et ál. (2015) *Scand J Gastroenterol.*;50(10):1199-207.
- [25] Miyamoto-Shinohara et ál. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9–24.
- [26] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. Day y McLellan, Humana Press.
- 30 [27] Leslie et ál. (1995) *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 3592–3597.
- [28] Mitropoulou et ál. (2013) *J Nutr Metab*. (2013) 716861.

- [29] Kailasapathy et ál. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [30] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>a</sup> edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller
- [31] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- 5 [32] US 2016/0067188
- [33] *Handbook of Microbiological Media, cuarta edición* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [34] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [35] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- 10 [36] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20<sup>a</sup> edición, ISBN: 0683306472.
- [37] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et ál., eds., 1998, Academic Press).
- [38] *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 15 [39] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [40] Sambrook et ál. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.<sup>a</sup> edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [41] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- 20 [42] Ausubel et ál. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5.<sup>a</sup> edición (Protocolos actuales).
- [43] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2.<sup>a</sup> edición (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [44] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et ál., eds., 1987) Suplemento 30
- 25 [45] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.