

VESÍCULAS EXTRACELULARES BACTERIANAS**SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica las ventajas de prioridad de las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos con números de serie 62/556.015, presentada el 8 de septiembre de 2017 y 62/669.151, presentada el 9 de mayo de 2018, cuyo contenido se ha incorporado como referencia en el presente documento en su totalidad.

SUMARIO

En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden vesículas extracelulares (VE) bacterianas de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas), así como métodos para fabricar y/o identificar dichas VE, y métodos para utilizar dichas composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para el tratamiento de cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, bien solas o junto con otros tratamientos). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tanto VE como bacterias completas (por ejemplo, bacterias vivas, bacterias muertas, bacterias atenuadas). En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden bacterias en ausencia de VE. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden VE en ausencia de bacterias. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden VE y/o bacterias de una o más cepas de bacterias relacionadas en la Tabla 1 y/o la Tabla 2.

En determinadas realizaciones, la composición

farmacéutica comprende una proporción específica entre bacterias y partículas VE. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos 1 bacteria por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} partículas VE. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1 bacteria por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9,

3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} partículas VE. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica no comprende más de 1 bacteria por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8. 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7,

9.8, 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 5 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 10 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 15 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} partículas VE. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos 1 partícula 20 VE por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 25 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 30 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89,

90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 ,
5 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 ,
10 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} bacterias. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1 partícula VE por cada 1, 1.1,
15 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8. 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1,
20 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49,
25 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 ,
30 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 ,

2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 ,
 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 ,
 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 ,
 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 ,
5 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} ,
 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} ,
 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} bacterias. En algunas
realizaciones, la composición farmacéutica no comprende más
de 1 VE por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8.
10 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3,
3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2,
4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4,
5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6,
6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8,
15 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9,
9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 11, 12,
13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,
43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57,
20 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72,
73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87,
88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 150,
200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750,
800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 ,
25 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 ,
 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 ,
 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 ,
 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 ,
 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 ,
30 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 ,
 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} ,
 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} ,

5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} bacterias.

En determinados aspectos, las VE de una bacteria genomanipulada que está modificada para potenciar algunas propiedades deseables. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria genomanipulada está modificada para aumentar la producción de VE. En algunas realizaciones, la bacteria está genomanipulada para producir VE que tienen una mejor administración oral (por ejemplo, una mejora a la resistencia a la abrasión, de la mucoadherencia y/o penetración y/o resistencia a los ácidos biliares, resistencia a péptidos antimicrobianos y/o neutralización de anticuerpos), para dirigirse a tipos de células deseados (por ejemplo, linfocitos M, células de globo, enterocitos, células dendríticas, macrófagos) para mejorar la biodisponibilidad sistémica o en un nicho adecuado (por ejemplo, ganglios linfáticos mesentéricos, placas de Peyer, lámina propia, ganglios linfáticos que drenan un tumor y/o la sangre), para potenciar el efecto inmunomodulador y/o terapéutico de las VE que producen (por ejemplo, tanto solas como junto con otro agente terapéutico), para potenciar la inmunoactivación mediante las VE que producen y/o mejorar la fabricación de bacterias y/o de VE (por ejemplo, mayor estabilidad, mejor tolerancia a la congelación-descongelación, tiempos de generación más cortos). En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para fabricar dichas VE y bacterias.

En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar un sujeto que tiene cáncer que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, en el presente documento se

proporcionan métodos para tratar un sujeto que tiene un trastorno inmunitario (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una alergia) que comprende administrar al sujeto una composición descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar un sujeto que tiene una enfermedad metabólica que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto un antibiótico. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto uno o más terapias contra el cáncer adicionales (por ejemplo, la extirpación quirúrgica de un tumor, la administración de un agente quimioterapéutico, la administración de radioterapia, y/o la administración de una inmunoterapia contra el cáncer tal como un inhibidores del punto de control inmunitario, un anticuerpo específico del cáncer, una vacuna del cáncer, una célula presentadora de antígeno cebada, un linfocito T específico del cáncer, un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico del cáncer de linfocitos T, una proteína inmunoactivadora, y/o un adyuvante). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de otras bacterias y/o VE terapéuticos. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un supresor inmunitario y/o un agente antiinflamatorio. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un agente terapéutico contra una enfermedad metabólica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Fig. 1** muestra la eficacia de *Blautia massiliensis* administrada iv en comparación con un anticuerpo dirigido

contra PD-1 administrado por vía intraperitoneal (i.p.) en un modelo de carcinoma colorrectal de ratón.

La **Fig. 2** muestra la inhibición del crecimiento tumoral (en volumen) mediante la administración intravenosa de *Blautia massiliensis* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 administrado por vía intraperitoneal (i.p.) en un modelo de carcinoma colorrectal de ratón.

La **Fig. 3A** muestra la eficacia de *Prevotella histicola* y VE derivadas de *P. histicola* administradas por vía oral o intraperitoneal para reducir la inflamación en la oreja (espesor de la oreja) 24 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH. Se observó eficacia tanto en el grupo oral como en el de administración i.p.

La **Fig. 3B** muestra la eficacia de *Prevotella histicola* y VE derivadas de *P. histicola* administradas por vía oral o intraperitoneal para reducir la inflamación en la oreja (espesor de la oreja) específica de antígeno 48 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH.

La **Fig. 3C** muestra la eficacia de las VE derivadas de *P. histicola* administradas por vía intraperitoneal a la dosis indicada (10 µg, 3 µg, 1 µg, y 0.1 µg) para reducir la inflamación en la oreja (espesor de la oreja) específica de antígeno 48 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH.

La **Fig. 3D** muestra la capacidad de las VE derivadas de *Prevotella histicola* administradas por vía intraperitoneal para reducir la expresión de IL-1β 48 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH.

La **Fig. 3E** muestra la capacidad de las VE derivadas de *Prevotella histicola* administradas por vía intraperitoneal para aumentar la acumulación de Tregs en los ganglios linfáticos cervicales 48 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH.

La **Fig. 4** muestra que *P. histicola* fue eficaz para reducir la puntuación de actividad NASH (NAS) en ratones que recibieron una dieta deficiente en metionina colina (MCD), que induce síntomas de NASH.

La **Fig. 5A** muestra que *P. histicola* redujo la esteatosis en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 5B** y la **Fig. 5C** muestran que *P. histicola* redujo la inflamación en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 5D** muestra que *P. histicola* redujo la inserción de globos en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 6** muestra que *P. histicola* redujo el colesterol total hepático en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 7A** y la **Fig. 7B** muestran que *P. histicola* redujo la puntuación de fibrosis en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 8A** muestra la eficacia de administrar *Prevotella histicola*, *P. melanogenica*, VE derivadas de *P. histicola*, VE derivadas de *P. melanogenica* para reducir la inflamación en la oreja (espesor de la oreja) 24 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH. Las VE derivadas de *P. melanogenica* son más eficaces que *P. melanogenica*.

La **Fig. 8B** muestra la eficacia de administrar *Prevotella histicola*, *P. melanogenica*, VE derivadas de *P. histicola*, VE derivadas de *P. melanogenica* para reducir la inflamación en la oreja (espesor de la oreja) 48 horas después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH. Las VE derivadas de *P. melanogenica* son más eficaces que *P. melanogenica*.

La **Fig. 9A** muestra el efecto de *P. histicola* sobre los ácidos grasos libres hepáticos en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 9B** muestra el efecto de *P. histicola* sobre el colesterol total hepático en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 9C** muestra el efecto de *P. histicola* sobre los triglicéridos hepáticos en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 9D** muestra el efecto de *P. histicola* y *P. melanogenica* sobre la alanina aminotransferasa en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 9E** muestra el efecto de *P. histicola* y *P. melanogenica* sobre la aspartato aminotransferasa en ratones alimentados con una dieta MCD.

Fig. 10A muestra que *P. histicola* es eficaz para reducir la puntuación de actividad NASH (NAS) en ratones que reciben una dieta deficiente en metionina colina (MCD), que induce síntomas de NASH.

La **Fig. 10B** muestra que *Prevotella histicola*, *P. melanogenica*, *P. histicola* junto con OCD para reducir la puntuación de actividad NASH (NAS) en ratones que reciben una dieta deficiente en metionina colina (MCD), que induce síntomas de NASH.

La **Fig. 11** muestra la eficacia de cepas de *Veillonella tobetsuensis* y *Veillonella parvula* para reducir la inflamación en la oreja (espesor de la oreja) a las 24 horas en comparación con el vehículo (control negativo), el
5 antiinflamatorio dexametasona (control positivo), y *Bifidobacterium animalis lactis* en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH.

La **Fig. 12** muestra la eficacia de las VE derivadas de dos cepas de *Veillonella tobetsuensis* y *Veillonella parvula*
10 en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratón.

La **Fig. 13** muestra la eficacia de las VE derivadas de cepas de *Veillonella tobetsuensis* y *Veillonella parvula* en
15 comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratón en el día 11.

La **Fig. 14** muestra la eficacia dependiente de la dosis y la vía de administración de VE derivadas de cepas de
20 *Veillonella tobetsuensis* y *Veillonella parvula* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratón.

La **Fig. 15** muestra la eficacia dependiente de la dosis y la vía de administración de VE derivadas de cepas de
25 *Veillonella tobetsuensis* y *Veillonella parvula* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratón en el día 11.

30 La **Fig. 16** muestra que *Veillonella parvula* fue eficaz para reducir la puntuación de actividad NASH (NAS) en ratones que reciben una dieta deficiente en metionina

colina (MCD), que induce síntomas de NASH.

La **Fig. 17** muestra que *Veillonella parvula* redujo la fibrosis en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 18** muestra que *Veillonella parvula* redujo el colesterol total hepático en ratones alimentados con una dieta MCD.

La **Fig. 19** muestra que *Veillonella parvula* redujo los triglicéridos hepáticos en ratones alimentados con una dieta MCD

La **Figura 20** muestra la eficacia de VE de *Burkholderia pseudomallei* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 administrado por vía intravenosa (i.v.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal de ratón.

La **Figura 21** muestra la eficacia de VE de *Burkholderia pseudomallei* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 administrado por vía intravenosa (i.v.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal de ratón en el día 11. ** La diferencia en el volumen tumoral en el grupo tratado con VE de *Burkholderia pseudomallei* comparada con el grupo del control con vehículo en el día 11 fue muy significativa, con un valor P de 0.0011 según se determina por la prueba de la T (bilateral, no emparejada, corregida según Welch) calculada en GraphPad.

La **Fig. 22** muestra la eficacia de VE de *Neisseria Meningitidis* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 administrado por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal de ratón.

La **Fig. 23** muestra la eficacia de VE de *Neisseria Meningitidis* en comparación con un anticuerpo dirigido contra PD-1 administrado por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal de ratón en el día 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADADefiniciones

“Adyuvante” o “Terapia con adyuvante” se refiere de forma amplia a un agente que altera una respuesta inmunológica o fisiológica en un paciente o sujeto. Por ejemplo, un adyuvante aumentaría la presencia de un antígeno con el tiempo o lo llevaría hacia una zona de interés como un tumor, ayudaría a absorber un antígeno en células presentadoras de antígenos, activaría macrófagos y los linfocitos y respaldaría la producción de citoquinas. Mediante la alteración de una respuesta inmunitaria, un adyuvante permitiría que una dosis más pequeña de un agente que interactúa con el sistema inmunitario aumenta la eficacia o la seguridad de una dosis en particular el agente que interactúa con el sistema inmunitario. Por ejemplo, un adyuvante evitaría el agotamiento de los linfocitos T y de esta forma aumentaría la eficacia o la seguridad de un agente que interactúa con el sistema inmunitario.

“Administración” se refiere ampliamente a una vía de administración de una composición a un sujeto. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración oral, administración rectal, administración tópica, inhalación (nasal) o inyección. La administración por inyección incluye la administración intravenosa (IV), intramuscular (IM), intratumoral (IT) y subcutánea (SC). Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar por cualquier forma mediante cualquier vía eficaz, incluidas, aunque no de forma limitativa, la intratumoral, oral, parenteral, enteral, intravenosa, intraperitoneal, tópica, transdérmica (por ejemplo, usando cualquier parche convencional),

intradérmica, oftálmica, (intra)nasal, local, no oral, tal como aerosol, inhalación, subcutánea, intramuscular, bucal, sublingual, (trans)rectal, vaginal, intraarterial, e intratecal, transmucosal (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, transvaginal y perivaginal), implante, intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, e intrabronquial. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran por vía oral, por vía rectal, por vía intratumoral, por vía tópica, por vía intravesical, mediante inyección dentro o adyacente a un ganglio linfático drenante, por vía intravenosa, mediante inhalación o aerosol, o por vía subcutánea.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se puede referir tanto a un anticuerpo intacto como a un fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos intactos son glicoproteínas que incluyen al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada incluye una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera incluye una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada una de las V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno.

Las expresiones "fragmentos de unión a antígeno" y "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a un antígeno). Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fv unido por enlaces disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios, NANOBOODIES®, CDRH3 aislado, y otros fragmentos de anticuerpo que retengan al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener usando técnicas recombinantes y/o enzimáticas convencionales y se pueden cribar para determinar la unión con el antígeno de la misma forma que los anticuerpos intactos.

"Cáncer" se refiere de forma amplia al crecimiento anómalo de las propias células de un hospedador que conduce a la invasión del tejido circundante y potencialmente tejido distal al sitio inicial del crecimiento celular anómalo en el hospedador. Las clases principales incluyen los carcinomas, que son cánceres del tejido epitelial (por ejemplo, piel, células escamosas); sarcomas que son

cánceres el tejido conectivo (por ejemplo, hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, etc.); leucemias que son cánceres del tejido que forma la sangre (por ejemplo, tejido de la médula ósea); linfomas y mielomas que son cánceres de las células inmunitarias; y cánceres del sistema nervioso central que incluyen cánceres del cerebro y tejido espinal. "Cáncer(es)", "neoplasia(s)", y "tumor(es)" se utilizan indistintamente en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos entre los que se incluyen leucemias, carcinomas y sarcomas, tanto nuevos como recurrentes. Los ejemplos específicos de cánceres son: carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y tumores de tipo mixto. Los ejemplos no limitativos de cánceres son cánceres nuevos o recurrentes del cerebro, melanoma, vejiga, mama, cuello del útero, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, pulmón no microcítico, mesotelioma, ovario, próstata, sarcoma, estómago, útero y meduloblastoma.

"Aumento celular" se refiere ampliamente a la entrada de células o expansión de células en un entorno que no están sustancialmente presentes en el entorno antes de la administración de una composición y no presentes en la propia composición. Las células que aumentan en el entorno incluyen células inmunitarias, células estromales, células bacterianas y/o fúngicas. Los entornos de especial interés son los microentornos donde residen o se ubican las células cancerosas. En algunos casos, el microentorno es un microentorno tumoral o un ganglio linfático que drena un tumor. En otros casos, el microentorno es un sitio de tejido precanceroso o el sitio de administración local de una composición o un sitio donde la composición se va a

acumular después de la administración remota.

“Clado” se refiere a las UOT o miembros de un árbol filogenético que se encuentran después de un nodo estadísticamente válido en un árbol filogenético. El clado
5 comprende un conjunto de hojas finales del árbol filogenético que es una unidad monofilética evolutiva diferente y que comparte cierta extensión de similitud de la secuencia. “Unidades taxonómicas operativas”, “UTO” (o en plural, “UTOs”) se refiere a una hoja final de un árbol
10 filogenético y se define por una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, el genoma completo, o una secuencia genética específica, y todas las secuencias que comparten identidad con esta secuencia de ácidos nucleicos en el nivel de la especie. En algunas realizaciones, la secuencia
15 genética específica puede ser la secuencia de 16S o una parte de la secuencia de 16S. En otras realizaciones, los genomas completos de dos entidades se secuencian y se comparan. En otra realización, regiones seleccionadas tales como marcas de secuencia multilocus (MLST), genes
20 específicos, o conjuntos de genes, se pueden comparar genéticamente. En las realizaciones de 16S, Las UTO que comparten $\geq 97\%$ de identidad de nucleótidos en promedio para la totalidad de la región de 16S o alguna región variable de 16S se consideran la misma UTO (véanse, por
25 ejemplo, Claesson M J, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole J R, Ros R P, y O'Toole P W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 38: e200.
30 Konstantinidis K T, Ramette A, y Tiedje J M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.). En las

realizaciones que implican el genoma completo, los MLST, genes específicos, o conjuntos de genes UTO que comparten $\geq 95\%$ identidad de nucleótidos en promedio se consideran la misma UTO (véase, por ejemplo, Achtman M, y Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440. Konstantinidis K T, Ramette A, y Tiedje J M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.). Las UTO se definen frecuentemente por comparación de secuencias entre organismos. En general, secuencias con menos del 95% de identidad de secuencia no se consideran parte de la misma UTO. Las UTO también se caracterizan por cualquier combinación de marcadores de nucleótidos o de genes, en particular de genes muy conservados (por ejemplo, genes "constitutivos), o una combinación de los mismos. Dicha caracterización utiliza, por ejemplo, datos WGS o una secuencia genómica completa.

Una "combinación" de VE derivadas de dos o más cepas microbianas incluye la coexistencia física de las dos VE, bien en el mismo material o producto o en productos físicamente relacionados, así como la coadministración o colocalización temporal de las VE de las dos cepas.

El término "disminución" o "agotamiento" significa un cambio, de tal forma que la diferencia es, dependiendo de las circunstancias, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000, 1/1.000.000 o indetectable después del tratamiento en comparación con el estado anterior al tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "disbiosis" se refiere a un estado en que la sinergia entre los microbios y el tumor está rota de forma que los

microbios ya no soportan la nucleación, mantenimiento, progresión o diseminación o metástasis de un tumor.

El término "epítopo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un receptor de anticuerpo o linfocitos T. Los epítomos suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares. Algunos epítomos se pueden definir por una secuencia de aminoácidos concreta con la que se puede unir un anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, "bacteria genomanipulada" es cualquier bacteria que se ha alterado genéticamente a partir de su estado natural mediante la intervención humana y la progenie de cualquiera de dichas bacterias. Bacterias genomanipuladas incluyen, por ejemplo, los productos de modificaciones genéticas dirigidas, los productos de cribado de mutagénesis aleatoria y los productos de la evolución dirigida.

El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificado por dicha secuencia genómica.

La "identidad" como entre secuencias de ácido nucleico o dos moléculas de ácido nucleico o se puede determinar en forma de porcentaje de identidad usando algoritmos informáticos conocidos, tales como el programa "FASTA", que utiliza, por ejemplo, los parámetros predeterminados como en Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el paquete informático GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA Atschul, S. F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Mrtin

J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, se puede usar la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para
5 determinar la identidad. Otros programas comerciales o públicamente disponibles incluyen, el programa DNASTar "MegAlign" (Madison, Wis.) y el programa "Gap" del grupo de genética informatizada de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison Wis.).

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno inmunitario" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o síntoma de enfermedad causado por una actividad del sistema inmunitario, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y alergias.
15 Los trastornos inmunitarios incluyen, aunque no de forma limitativa, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, lupus, esclerodermia, anemia hemolítica, vasculitis, diabetes de tipo uno, enfermedad de Grave, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, síndrome de Goodpasture,
20 anemia perniciosa y/o miopatía), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, acné común, asma, enfermedad celíaca, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide,
25 sarcoidosis, rechazo de trasplante, vasculitis y/o cistitis intersticial) y/o alergias (por ejemplo, alergias alimenticias, alergias a fármacos y/o alergias ambientales).

"Inmunoterapia" es el tratamiento que utiliza el
30 sistema inmunitario de un sujeto para tratar enfermedades (por ejemplo, enfermedades inmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, cáncer) e

incluyen, por ejemplo, inhibidores del punto de control, vacunas del cáncer, citoquinas, terapia celular, linfocitos T CAR, y terapia con células dendríticas.

El término "aumento" significa un cambio, de tal forma
5 que la diferencia es, dependiendo de las circunstancias, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2 veces, 4 veces, 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces, y/o 10^7 veces más después del tratamiento en comparación con el estado anterior al
10 tratamiento. Las propiedades que se pueden aumentar incluyen las células inmunitarias, células bacterianas, células estromales, células supresoras derivadas de mieloides, fibroblastos, metabolitos, y citoquinas.

Los "agonistas inmunitarios innatos" o
15 "inmunoadyuvantes" son moléculas pequeñas, proteínas, u otros agentes que se dirigen específicamente a receptores inmunitarios innatos incluidos los receptores de tipo Toll (TLR), receptores NOD, RLR, receptores de lectina de tipo C, componentes de la ruta STING-cGAS, complejos de
20 inflamomas. Por ejemplo, LPS es un agonista de TLR-4 que se deriva de fuentes bacterianas o se sintetiza, y el aluminio se puede utilizar como un adyuvante inmunoestimulador. Los inmunoadyuvantes son una clase específica de un adyuvante o una terapia con adyuvantes más
25 amplia. Los ejemplos de agonistas de STING incluyen, aunque no de forma limitativa, 2'3'-cGAMP, 3'3'-cGAMP, c-di-AMP, c-di-GMP, 2'2'-cGAMP, y 2'3'-cGAM(PS)₂ (Rp/Sp) (isómeros Rp, Sp del bis-fosforotioato análogo de 2'3'-cGAMP). Los ejemplos de agonistas de TLR incluyen, aunque no de forma
30 limitativa, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 y TLR11. Los ejemplos de agonistas de NOD incluyen, aunque no de forma limitativa, N-acetilmuramil-L-

alanil-D-isoglutamina (muramidipéptido (MDP)), ácido gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimélico (iE-DAP), y desmuramilpéptidos (DMP).

El "separador transcrito interno" o " ITS" es un trozo
5 de ARN no funcional situado entre los ARN ribosómicos (ARNr) estructurales de un transcrito precursor común frecuentemente utilizado para la identificación de especies eucariotas, especialmente hongos. El ARNr de los hongos que constituye el núcleo del ribosoma se transcribe como una
10 señal génica y consiste en las regiones 8S, 5.8S y 28S estando ITS4 e ITS5 entre las regiones 8S y 5.8S y las regiones 5.8S y 28S, respectivamente. Estos dos segmentos intercistrónicos entre las regiones 18S y 5.8S y las regiones 5.8S y 28S se eliminan mediante corte y empalme y
15 contienen una variación significativa entre especies con fines de código de barras como se ha descrito anteriormente (Schoch et al Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 109:6241-6246. 2012). El ADNr de 18S se utiliza
20 tradicionalmente para la reconstrucción filogenética; sin embargo, el ITS puede realizar esta función ya que por lo general está muy bien conservado pero contiene regiones hipervariables que albergan suficiente diversidad de nucleótidos para diferenciar entre los géneros y especies
25 de la mayoría de los hongos.

Los términos "aislado" o "enriquecido" abarcan un microorganismo, VE u otra entidad o sustancia que (1) se ha separado de al menos parte de los componentes con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente (tanto en la
30 naturaleza como en un escenario experimental) y/o (2) se ha producido, preparado, purificado, y/o fabricado por la mano del hombre. Los microbios aislados se pueden separar de al

menos aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%,
aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%,
aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%,
aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%,
5 aproximadamente el 90%, o más del resto de componentes con
los que pueden estar inicialmente asociados. En algunas
realizaciones, los microbios aislados tienen más de
aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%,
aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%,
10 aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%,
aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%,
aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%,
aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de
aproximadamente el 99% de pureza. Tal como se usa en el
15 presente documento, Una sustancia es "pura" si está
prácticamente exenta de otros componentes. Los términos
"purificar", "purificación" y "purificado" se refieren a un
microorganismo u otro material que se ha separado de al
menos parte de los componentes con los que está asociado
20 tanto cuando se produjo o generó inicialmente (por ejemplo,
tanto en la naturaleza como en un escenario experimental) o
en cualquier momento tras su producción inicial. Un
microbio o población microbiana se puede considerar
purificada si se ha aislado en el momento de la producción,
25 o después, tal como a partir de un material o entorno que
contiene el microbio o la población microbiana, y un
microbio purificado o población microbiana puede contener
otros materiales hasta aproximadamente el 10%,
aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%,
30 aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%,
aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%,
aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, o más de

aproximadamente el 90% y seguir considerándose "aislado". En algunas realizaciones, los microbios purificados o la población microbiana tiene más de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%,
5 aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de aproximadamente el 99% de
10 pureza. En el caso de las composiciones microbianas proporcionadas en el presente documento, el uno o más tipos microbianos presentes en la composición pueden estar independientemente purificados de uno o más microorganismos producidos y/o presentes en el material o entorno que
15 contiene el tipo de microorganismo. Las composiciones microbianas y los componentes microbianos de las mismas generalmente están purificados de productos residuales de su hábitat.

"Metabolito" tal como se usa en el presente documento
20 se refiere a todos y cada uno de los compuestos moleculares, composiciones, moléculas, iones, cofactores, catalizadores o nutrientes usados como sustratos en cualquier reacción metabólica microbiana o celular o que aparezca como producto en forma de compuestos,
25 composiciones, moléculas, iones, cofactores, catalizadores o nutrientes procedentes de cualquier reacción metabólica microbiana o celular.

"Microorganismo" se refiere a cualquier organismo natural o diseñado mediante ingeniería genética tal como
30 una bacteria, hongo, alga microscópica, protozoo, y los estadios de desarrollo o los estadios del ciclo de la vida (por ejemplo, vegetativo, espora (incluida la esporulación,

estado de dormancia, y germinación), latencia, biopelícula) asociada con el organismo. Los ejemplos de microorganismos del intestino incluyen: *Actinomyces graevenitzii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Akkermansia muciniphila*,
5 *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bilophila wadsworthia*, *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter gracilis*, *Clostridia cluster III*, *Clostridia cluster IV*,
10 *Clostridia cluster IX* (grupo *Acidaminococcaceae*), *Clostridia cluster XI*, *Clostridia cluster XIII* (grupo *Peptostreptococcus*), *Clostridia cluster XIV*, *Clostridia cluster XV*, *Collinsella aerofaciens*, *Coprococcus*, *Corynebacterium sunsvallense*, *Desulfomonas pigra*,
15 *Dorea formicigenerans*, *Dorea longicatena*, *Escherichia coli*, *Eubacterium hadrum*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacteria prausnitzii*, *Gemella*, *Lactococcus*, *Lachnospira*, *Mollicutes cluster XVI*, *Mollicutes cluster XVIII*, *Prevotella*, *Rothia mucilaginosa*, *Ruminococcus callidus*,
20 *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques*, y *Streptococcus*.

"Microbioma" se refiere ampliamente a los microbios que residen en o sobre el sitio corporal de un sujeto o paciente. Los microorganismos de un microbioma pueden
25 incluir bacterias, virus, microorganismos eucariotas, y/o virus. Los microbios individuales de un microbioma pueden ser metabólicamente activos, durmientes, latentes, o existir en forma de esporas, pueden existir plactónicamente o en forma de biopelículas, o pueden estar presente en el
30 microbioma de forma continua o transitoria. El microbioma puede ser un microbioma comensal o saludable, o un microbioma patológico. El microbioma puede ser natural para

el sujeto o el paciente, o los componentes del microbioma pueden estar modulados, introducidos, o agotados debido a cambios en el estado de salud (por ejemplo, patología precancerosa o cancerosa) o las condiciones del tratamiento
5 (por ejemplo, tratamiento con antibióticos, exposición a diferentes microorganismos). En algunos aspectos, el microbioma se encuentra en la mucosa superficial. En algunos aspectos, el microbioma es un microbioma de intestino. En algunos aspectos, el microbioma es un
10 microbioma de tumor.

Un "perfil de microbioma" o una "firma de microbioma" de un tejido o muestra se refiere a al menos una caracterización parcial de la constitución bacteriana de un microbioma. En algunas realizaciones, un perfil de
15 microbioma indica si al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más cepas bacterianas están presentes o ausentes de un microbioma. En algunas realizaciones, un perfil de microbioma indica si al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7,
20 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más cepas bacterianas asociadas al cáncer están presentes en una muestra. En algunas realizaciones, el perfil de microbioma indica la cantidad relativa o absoluta de cada cepa bacteriana detectada en la
25 muestra. En algunas realizaciones, el perfil de microbioma es un perfil de microbioma asociado a cáncer. Un perfil de microbioma asociado al cáncer es un perfil de microbioma que se encuentra con mayor frecuencia en un sujeto que tiene cáncer que en la población general. En algunas
30 realizaciones, el perfil de microbioma asociado al cáncer comprende un número mayor o una cantidad de bacterias asociadas con el cáncer de lo que está normalmente presente

en un microbioma de otro tejido o muestra equivalente por otra parte de un individuo que no tiene cáncer.

“Modificado” en referencia a una bacteria se refiere ampliamente a una bacteria que ha experimentado un cambio desde su forma natural. Los ejemplos de modificaciones bacterianas incluyen la modificación genética, la expresión génica, modificación de fenotipo, formulación, modificación química, y dosis o concentración. Los ejemplos de propiedades mejoradas se describen a lo largo de esta memoria descriptiva, e incluyen, por ejemplo, atenuación, auxotrofía, búsqueda dirigida, o antigenicidad. La modificación de fenotipo podría incluir, a modo de ejemplo, crecimiento de bacterias en medios que modifican el fenotipo de una bacteria para aumentar o disminuir la virulencia.

Tal como se usa en el presente documento, un gen se “expresa en exceso” en una bacteria si se expresa en un nivel superior en una bacteria genomanipulada en al menos algunas condiciones de lo que se expresa en una bacteria no manipulada de la misma especie en las mismas condiciones. De manera similar, un gen se “expresa en defecto” en una bacteria si se expresa en un nivel menor en una bacteria genomanipulada en al menos algunas condiciones de lo que se expresa en una bacteria no manipulada de la misma especie en las mismas condiciones.

Los términos “polinucleótido”, y “ácido nucleico” se usados de forma indistinta. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de

polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, loci (locus) definidos mediante análisis de uniones, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), microARN (miARN), ARN de silenciamiento (ARNsi),
5 ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender
10 nucleótidos modificados, tales como nucleótidos y análogos de nucleótidos metilados. Si están presentes, pueden transmitirse modificaciones a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como
15 mediante conjugación con un componente marcador. En todas las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento, los nucleótidos de U son indistintos de los nucleótidos de T.

Un "oncobioma" tal como se usa en el presente
20 documento, comprende microbiota patógena, tumorigénica, y/o asociada con cáncer, en el que la microbiota comprende uno o más de un virus, una bacteria, un hongo, un protista, un parásito, u otro microorganismo.

Los microorganismos y bacterias "oncotróficos" u
25 "oncofílicos" son microorganismos que están muy vinculados o están presentes en un microentorno de cáncer. Preferentemente se seleccionan dentro de dicho entorno, preferentemente crecen en un microentorno de cáncer o son propensos a dicho microentorno.

30 "Unidades taxonómicas operativas" y "UTO(s)" se refieren a una hoja final de un árbol filogenético y se define por una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, el

genoma completo, o una secuencia genética específica, y todas las secuencias que comparten identidad con esta secuencia de ácidos nucleicos en el nivel de la especie. En algunas realizaciones, la secuencia genética específica

5 puede ser la secuencia de 16S o una parte de la secuencia de 16S. En otras realizaciones, los genomas completos de dos entidades se secuencian y se comparan. En otra realización, regiones seleccionadas tales como marcas de secuencia multilocus (MLST), genes específicos, o conjuntos

10 de genes, se pueden comparar genéticamente. Para el 16S, las UTO que comparten $\geq 97\%$ de identidad de nucleótidos en promedio para la totalidad de la región de 16S o alguna región variable de 16S se consideran la misma UTO. Véanse, por ejemplo, Claesson M J, Wang Q, Wang Q, O'Sullivan O,

15 Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, y O'Toole PW. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 38: e200. Konstantinidis KT, Ramette A, y Tiedje JM. 2006.

20 The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940. Para genomas completos, los MLST, genes específicos, diferentes a 16S, o conjuntos de genes UTO que comparten $\geq 95\%$ de identidad de nucleótidos en promedio se consideran la misma UTO. Véanse,

25 por ejemplo, Achtman M, y Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440. Konstantinidis KT, Ramette A, y Tiedje JM. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-

30 1940. Las UTO se definen frecuentemente por comparación de secuencias entre organismos. En general, secuencias con menos del 95% de identidad de secuencia no se consideran

parte de la misma UTO. Las UTO también se caracterizan por cualquier combinación de marcadores de nucleótidos o de genes, en particular de genes muy conservados (por ejemplo, genes "constitutivos), o una combinación de los mismos. Se proporcionan en el presente documento Unidades taxonómicas operativas (UTO) con asignaciones genómicas realizadas para, por ejemplo, el género, la especie, y el clado filogenético.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vesícula extracelular" o "VE" se refiere a una composición derivada de una bacteria que comprende lípidos bacterianos, y proteínas bacterianas y/o ácidos nucleicos bacterianos y/o restos de carbohidratos bacterianos contenidos en una nanopartícula. Estas VE pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 10, o más de 10 especies lipídicas diferentes. Las VE pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 10, o más de 10 especies proteicas diferentes. Las VE pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 10, o más de 10 especies de ácidos nucleicos diferentes. Estas VE pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 10, o más de 10 especies de carbohidratos diferentes.

Tal como se usa en el presente documento, Una sustancia es "pura" si está prácticamente exenta de otros componentes. Los términos "purificar", "purificación" y "purificado" se refieren a un microorganismo u otro material que se ha separado de al menos parte de los componentes con los que está asociado tanto cuando se produjo o generó inicialmente (por ejemplo, tanto en la naturaleza como en un escenario experimental) o en cualquier momento tras su producción inicial. Una VE se puede considerar purificada si se ha asilado en el momento de la producción, o después, tal como a partir de uno o más componentes bacterianos, y un microorganismo o población

microbiana purificada puede contener otros materiales hasta aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%,
5 aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, o más de aproximadamente el 90% y seguir considerándose "purificada". En algunas realizaciones, las VE purificadas tienen aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%,
10 aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de aproximadamente el 99% de
15 pureza. Las composiciones de VE y los componentes microbianos de las mismas están, por ejemplo, purificados de productos residuales de su hábitat.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición de VE purificada" o "composición de VE" se
20 refiere a una preparación que incluye las VE que se han separado de al menos una sustancia asociada encontrada en un material de origen (por ejemplo, separada de al menos otro componente bacteriano) o cualquier material asociado con las VE en cualquier proceso utilizado para producir la
25 preparación. También se refiere a una composición que esté significativamente enriquecida o concentrada. En algunas realizaciones, las VE están concentradas en 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, 1000 veces, 10.000 veces o más de 10.000 veces.

30 "Productos residuales del hábitat" se refiere al material derivado del hábitat para la microbiota del interior o la superficie de un sujeto. Por ejemplo, los

microorganismos viven en las heces del tracto gastrointestinal, sobre la propia piel, en la saliva, moco del tracto respiratorio, o secreciones del tracto genitourinario (es decir, el material biológico asociado con la comunidad microbiana). Prácticamente exento de productos residuales del hábitat significa que la composición microbiana ya no contiene el material biológico asociado con el entorno microbiano en o sobre el ser humano o animal y está exento en un 100%, exento en un 99%, exento en un 98%, exento en un 97%, exento en un 96%, o exento en un 95% de cualquier materia biológica contaminante asociada con la comunidad microbiana. Los productos residuales del hábitat pueden incluir materiales abióticos (incluida comida sin digerir) o puede incluir microorganismos no deseados. Prácticamente exento de productos residuales del hábitat también puede significar que la composición microbiana no contiene células detectables de un ser humano o animal y que solo son detectables las células microbianas. En una realización, prácticamente exento de productos residuales del hábitat también puede significar que la composición microbiana no contiene contaminantes detectables víricos (incluidos virus microbianos (por ejemplo, fagos)), fúngicos, micoplásmicos. En otra realización, significa que menos del $1 \times 10^{-2}\%$, $1 \times 10^{-3}\%$, $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$, $1 \times 10^{-6}\%$, $1 \times 10^{-7}\%$, $1 \times 10^{-8}\%$ de las células viables de la composición microbiana son de origen humano o animal, en comparación con las células microbianas. Existen múltiples formas para lograr este grado de pureza, ninguno de los cuales es limitante. Por lo tanto, la contaminación se puede reducir mediante el aislamiento de los constituyentes deseados usando múltiples etapas de división a colonias individuales sobre medio sólido hasta replicar

(tal como, pero no de forma limitativa, dos) lotes de colonias individuales en serie que tengan una sola morfología de colonia. Como alternativa, la reducción de la contaminación se puede llevar a cabo por múltiples rondas de diluciones en serie hasta las células individuales deseadas (por ejemplo, una dilución de 10^{-8} o 10^{-9}), tal como múltiples diluciones en serie de 10. Esto se puede confirmar adicionalmente mostrando que múltiples colonias aisladas tienen formas celulares similares y un comportamiento de tinción Gram similar. Otros métodos para confirmar la pureza adecuada incluyen el análisis genético (por ejemplo, PCR, secuenciación de ADN), serología y análisis de antígenos, análisis enzimático y metabólico, y métodos que utilizan instrumentación tales como citometría de flujo con reactivos que distinguen los constituyentes deseados de los contaminantes.

Tal como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno predeterminado o a la capacidad de un polipéptido para unirse a su ligando predeterminado. Típicamente, un anticuerpo o polipéptido se une específicamente a su antígeno o ligando predeterminado con una afinidad que corresponde a una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno/ligando predeterminado con una afinidad (expresada en forma de K_D) que es al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor o al menos 1000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno/ligando no específico y no relacionado (por ejemplo, BSA, caseína). Como alternativa, la unión específica se aplica más ampliamente a un sistema bicomponente donde un componente es una proteína, lípido, o carbohidrato, o combinación de los anteriores, y se vincula con el segundo componente que

es una proteína, lípido, carbohidrato, o combinación de los anteriores de una forma específica.

Los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a cualquier animal. Un sujeto o paciente descrito como "que
5 lo necesita" se refiere a uno que necesite un tratamiento de una enfermedad. Los mamíferos (es decir, los animales mamíferos) incluyen seres humanos, animales de laboratorio (por ejemplo, primates, ratas, ratones), ganado (por ejemplo, vacas, ovejas, cabras, cerdos), y mascotas (por
10 ejemplo, perros, gatos, roedores).

"Cepa" se refiere a un miembro de una especie bacteriana con una firma genética tal que se puede diferenciar de miembros estrechamente relacionados de la misma especie bacteriana. La firma genética puede ser la
15 ausencia de todo o parte de al menos un gen, la ausencia de todo o parte de al menos una región reguladora (por ejemplo, un promotor, un terminador, un ribointerruptor, un sitio de unión a ribosomas), la ausencia ("curado") de al menos un plásmido natural, la presencia de al menos un gen
20 recombinante, la presencia de al menos un gen mutado, la presencia de al menos un gen extraño (un gen derivado de otra especie), la presencia de al menos una región reguladora mutada (por ejemplo, un promotor, un terminador, un ribointerruptor, un sitio de unión a ribosomas), la
25 presencia de al menos un plásmido no natural, la presencia de al menos un casete de resistencia a antibióticos, o una combinación de los mismos. Las firmas genéticas entre diferentes cepas se pueden identificar mediante amplificación por PCR opcionalmente seguida por la
30 secuenciación del ADN de la una o más regiones genómicas de interés o del genoma completo. Si una cepa (comparada con otra de la misma especie) ha ganado o perdido o resistencia

a antibióticos o ha ganado o perdido capacidad biosintética (tal como una cepa auxotrofa), las cepas se pueden diferenciar por selección o contraselección usando un antibiótico o nutriente/metabolito, respectivamente.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" una enfermedad en un sujeto o "tratar" un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de uno o más agentes, de tal
10 forma que al menos un síntoma de la enfermedad se disminuya o se previene su empeoramiento. Por lo tanto, en una realización, "tratar" se refiere, entre otras cosas, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelera la recuperación,
15 aumentar la eficacia o disminuir la resistencia a sustancias terapéuticas alternativas, o una combinación de los mismos.

Bacterias

 En determinados aspectos, se proporciona en el
20 presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden bacterias y/o VE preparadas a partir de bacterias.

 En algunas realizaciones, las bacterias a partir de las que se obtienen las VE están modificadas para mejorar
25 la producción de VE, para mejorar la administración oral de las VE producidas (por ejemplo, una mejora a la resistencia a la abrasión, de la mucoadherencia y/o penetración y/o resistencia a los ácidos biliares, enzimas digestivas, resistencia a péptidos antimicrobianos y/o neutralización
30 de anticuerpos), para dirigirse a tipos de células deseados (por ejemplo, linfocitos M, células de globo, enterocitos, células dendríticas, macrófagos), para potenciar el efecto

inmunomodulador y/o terapéutico de las VE producidas (por ejemplo, tanto solas como junto con otro agente terapéutico), y/o para mejorar la activación o supresión inmunitaria mediante las VE producidas (por ejemplo, 5 mediante una modificación en la producción de polisacáridos, pili, fimbriae, adhesinas). En algunas realizaciones, las bacterias diseñadas mediante ingeniería genética descritas en el presente documento se modifican para mejorar la fabricación bacteriana y/o de VE (por 10 ejemplo, mayor tolerancia al oxígeno, estabilidad, mejor tolerancia a la congelación-descongelación, tiempos de generación más cortos). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las bacterias diseñadas mediante ingeniería genética descritas contienen uno o más cambios genéticos, 15 siendo dicho cambio una inserción, eliminación, traslocación, o sustitución, o cualquier combinación de las mismas, de uno o más nucleótidos contenidos en el cromosoma bacteriano o plásmido endógeno y/o uno o más plásmidos extraños, en el que el cambio genético puede dar como 20 resultado la expresión en defecto y/o en exceso de uno o más genes. El uno o más microorganismos diseñados mediante ingeniería genética se pueden producir usando cualquier técnica conocida en la materia, incluida, aunque no de forma limitativa, mutagénesis dirigida al sitio, 25 mutagénesis por trasposón, desactivaciones genéticas, activaciones genéticas, mutagénesis mediante la reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis química, mutagénesis mediante irradiación con luz ultravioleta, transformación (química o mediante electroporación), transducción de 30 fagos, evolución directa, o cualquier combinación de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, el término

"bacteria" se refiere ampliamente al dominio de los organismos procariotas, incluidos organismos gram positivos y gram negativos. Los ejemplos de especies y/o cepas de bacterias que se pueden usar para producir las VE descritas en el presente documento se proporcionan en las Tablas 1 y/o 2 y en cualquier otro sitio de la presente memoria descriptiva. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana es una cepa bacteriana que tiene un genoma que tiene al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% o 99.9% de identidad de la secuencia respecto a una cepa relacionada en la Tabla 1 y/o la Tabla 2. En algunas realizaciones, las VE proceden de bacterias oncotróficas. En algunas realizaciones, las VE proceden de bacterias inmunoestimuladoras. En algunas realizaciones, las VE proceden de bacterias inmunosupresoras. En algunas realizaciones, las VE proceden de bacterias inmunomoduladoras. En determinadas realizaciones, las VE se generan a partir de una combinación de cepas bacterianas proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la combinación es una combinación de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 cepas bacterianas. En algunas realizaciones, la combinación incluye VE procedentes de las cepas bacterianas relacionadas en la Tabla 1 y/o la Tabla 2 y/o de cepas bacterianas que tienen al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% o 99.9% de identidad de la secuencia respecto a una cepa relacionada en la Tabla 1 y/o la Tabla 2.

Tabla 1: Cepas bacterianas ilustrativas

UTO	Registro de acceso público DB
<i>Abiotrophia defectiva</i>	ACIN02000016
<i>Abiotrophia para_adiacens</i>	AB022027
<i>Abiotrophia sp. clon oral P4PA_155 P1</i>	AY207063
<i>Acetanaerobacterium elongatum</i>	NR_042930
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	NR_025917
<i>Acetivibrio ethanolgignens</i>	FR749897
<i>Acetobacter aceti</i>	NR_026121
<i>Acetobacter fabarum</i>	NR_042678
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	NR_040832
<i>Acetobacter malorum</i>	NR_025513
<i>Acetobacter orientalis</i>	NR_028625
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	NR_026107
<i>Acetobacter pomorum</i>	NR_042112
<i>Acetobacter syzygii</i>	NR_040868
<i>Acetobacter tropicalis</i>	NR_036881
<i>Acetobacteraceae bacterium AT_5844</i>	AGEZ01000040
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	NR_074448
<i>Achromobacter denitrificans</i>	NR_042021
<i>Achromobacter piechaudii</i>	ADMS01000149
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ACRC01000072
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	CP001859
<i>Acidaminococcus intestini</i>	CP003058
<i>Acidaminococcus sp. D21</i>	ACGB01000071
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	AY350586
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR_074660
<i>Acidovorax sp. 98_63833</i>	AY258065

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ACYQ01000014
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AM157426
5	<i>Acinetobacter genomosp. C1</i>	AY278636
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	ADMT01000017
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	ACPL01000162
	<i>Acinetobacter junii</i>	ACPM01000135
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ACPN01000204
10	<i>Acinetobacter parvus</i>	AIEB01000124
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	ACVR01000010
	<i>Acinetobacter schindleri</i>	NR_025412
	<i>Acinetobacter sp. 56A1</i>	GQ178049
	<i>Acinetobacter sp. CIP 101934</i>	JQ638573
15	<i>Acinetobacter sp. CIP 102143</i>	JQ638578
	<i>Acinetobacter sp. CIP 53.82</i>	JQ638584
	<i>Acinetobacter sp. M16_22</i>	HM366447
	<i>Acinetobacter sp. RUH2624</i>	ACQF01000094
20	<i>Acinetobacter sp. SH024</i>	ADCH01000068
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AY362885
	<i>Actinobacillus minor</i>	ACFT01000025
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	NR_074857
25	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	CP000746
	<i>Actinobacillus ureae</i>	AEVG01000167
	<i>Actinobaculum massiliae</i>	AF487679
	<i>Actinobaculum schaalii</i>	AY957507
	<i>Actinobaculum sp. BM#101342</i>	AY282578
30	<i>Actinobaculum sp. P2P_19 P1</i>	AY207066
	<i>Actinomyces cardiffensis</i>	GU470888

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Actinomyces europaeus</i>	NR_026363
	<i>Actinomyces funkei</i>	HQ906497
5	<i>Actinomyces genomosp. C1</i>	AY278610
	<i>Actinomyces genomosp. C2</i>	AY278611
	<i>Actinomyces genomosp. P1 clon oral MB6_C03</i>	DQ003632
	<i>Actinomyces georgiae</i>	GU561319
10	<i>Actinomyces israelii</i>	AF479270
	<i>Actinomyces massiliensis</i>	AB545934
	<i>Actinomyces meyeri</i>	GU561321
	<i>Actinomyces naeslundii</i>	X81062
15	<i>Actinomyces nasicola</i>	AJ508455
	<i>Actinomyces neuui</i>	X71862
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	ACYT01000123
	<i>Actinomyces oricola</i>	NR_025559
	<i>Actinomyces orihominis</i>	AJ575186
20	<i>Actinomyces oris</i>	BABV01000070
	<i>Actinomyces sp. 7400942</i>	EU484334
	<i>Actinomyces sp. c109</i>	AB167239
	<i>Actinomyces sp. CCUG 37290</i>	AJ234058
	<i>Actinomyces sp. ChDC B197</i>	AF543275
25	<i>Actinomyces sp. GEJ15</i>	GU561313
	<i>Actinomyces sp. HKU31</i>	HQ335393
	<i>Actinomyces sp. ICM34</i>	HQ616391
	<i>Actinomyces sp. ICM41</i>	HQ616392
	<i>Actinomyces sp. ICM47</i>	HQ616395
30	<i>Actinomyces sp. ICM54</i>	HQ616398
	<i>Actinomyces sp. M2231_94_1</i>	AJ234063

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Actinomyces sp. clon oral GU009</i>	AY349361
	<i>Actinomyces sp. clon oral GU067</i>	AY349362
5	<i>Actinomyces sp. clon oral IO076</i>	AY349363
	<i>Actinomyces sp. clon oral IO077</i>	AY349364
	<i>Actinomyces sp. clon oral IP073</i>	AY349365
	<i>Actinomyces sp. clon oral IP081</i>	AY349366
	<i>Actinomyces sp. clon oral JA063</i>	AY349367
10	<i>Actinomyces sp. taxón oral 170</i>	AFBL01000010
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 171</i>	AECW01000034
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 178</i>	AEUH01000060
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 180</i>	AEPP01000041
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 848</i>	ACUY01000072
15	<i>Actinomyces sp. taxón oral C55</i>	HM099646
	<i>Actinomyces sp. TeJ5</i>	GU561315
	<i>Actinomyces urogenitalis</i>	ACFH01000038
	<i>Actinomyces viscosus</i>	ACRE01000096
20	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	AB306661
	<i>Aerococcus sanguinicola</i>	AY837833
	<i>Aerococcus urinae</i>	CP002512
	<i>Aerococcus urinaequi</i>	NR_043443
	<i>Aerococcus viridans</i>	ADNT01000041
25	<i>Aeromicrobium marinum</i>	NR_025681
	<i>Aeromicrobium sp. JC14</i>	JF824798
	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	S39232
	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	X71121
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	NC_008570
30	<i>Aeromonas jandaei</i>	X60413
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	NC_009348

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Aeromonas trota</i>	X60415
	<i>Aeromonas veronii</i>	NR_044845
5	<i>Afipia genomosp. 4</i>	EU117385
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	CP001733
	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	CP001607
10	<i>Aggregatibacter segnis</i>	AEPS01000017
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	CP000628
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AJ389893
	<i>Agrococcus jenensis</i>	NR_026275
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	CP001071
15	<i>Alcaligenes faecalis</i>	AB680368
	<i>Alcaligenes sp. C014</i>	DQ643040
	<i>Alcaligenes sp. S3</i>	HQ262549
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	NR_074721
	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	NR_040844
20	<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	NR_041475
	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	NR_024754
	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	NR_024753
	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	NR_024801
	<i>Alicyclobacillus sp. CCUG 53762</i>	HE613268
25	<i>Alistipes finegoldii</i>	NR_043064
	<i>Alistipes indistinctus</i>	AB490804
	<i>Alistipes onderdonkii</i>	NR_043318
	<i>Alistipes putredinis</i>	ABFK02000017
	<i>Alistipes shahii</i>	FP929032
30	<i>Alistipes sp. HGB5</i>	AENZ01000082
	<i>Alistipes sp. JC50</i>	JF824804

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Alistipes sp. RMA 9912</i>	GQ140629
	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i>	AY137848
5	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	NR_043674
	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	NR_042583
	<i>Alloscardovia sp. OB7196</i>	AB425070
	<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i>	ACJX02000009
10	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	NR_026075
	<i>Anaerobiospirillum thomasi</i>	AJ420985
	<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	ABXA01000039
	<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	ABY001000217
15	<i>Anaerococcus octavius</i>	NR_026360
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	CP001708
	<i>Anaerococcus sp. 8404299</i>	HM587318
	<i>Anaerococcus sp. 8405254</i>	HM587319
	<i>Anaerococcus sp. 9401487</i>	HM587322
20	<i>Anaerococcus sp. 9403502</i>	HM587325
	<i>Anaerococcus sp. gpac104</i>	AM176528
	<i>Anaerococcus sp. gpac126</i>	AM176530
	<i>Anaerococcus sp. gpac155</i>	AM176536
	<i>Anaerococcus sp. gpac199</i>	AM176539
25	<i>Anaerococcus sp. gpac215</i>	AM176540
	<i>Anaerococcus tetradius</i>	ACGC01000107
	<i>Anaerococcus vaginalis</i>	ACXU01000016
	<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	ABIL02000005
	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	AGCJ01000054
30	<i>Anaerosporobacter mobilis</i>	NR_042953
	<i>Anaerostipes caccae</i>	ABAX03000023

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Anaerostipes sp. 3_2_56FAA</i>	ACWB01000002
	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	ABGD02000021
5	<i>Anaplasma marginale</i>	ABOR01000019
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	NC_007797
	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	AB101592
	<i>Aneurinibacillus danicus</i>	NR_028657
	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	NR_036799
10	<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	NR_042271
	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	NR_029303
	<i>Anoxybacillus contaminans</i>	NR_029006
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	NR_074667
	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	NR_025347
15	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	GU585578
	<i>Arcobacter butzleri</i>	AEPT01000071
	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	NR_025905
	<i>Arthrobacter agilis</i>	NR_026198
20	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	NR_074608
	<i>Arthrobacter bergerei</i>	NR_025612
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	NR_026187
	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	NR_026190
	<i>Atopobium minutum</i>	HM007583
25	<i>Atopobium parvulum</i>	CP001721
	<i>Atopobium rimae</i>	ACFE01000007
	<i>Atopobium sp. BS2</i>	HQ616367
	<i>Atopobium sp. F0209</i>	EU592966
	<i>Atopobium sp. ICM42b10</i>	HQ616393
30	<i>Atopobium sp. ICM57</i>	HQ616400
	<i>Atopobium vaginae</i>	AEDQ01000024

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Aurantimonas coralicida</i>	AY065627
	<i>Aureimonas altamirensis</i>	FN658986
5	<i>Auritibacter ignavus</i>	FN554542
	<i>Averyella dalhousiensis</i>	DQ481464
	<i>Bacillus aeolius</i>	NR_025557
	<i>Bacillus aerophilus</i>	NR_042339
	<i>Bacillus aestuarii</i>	GQ980243
10	<i>Bacillus alcalophilus</i>	X76436
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_075005
	<i>Bacillus anthracis</i>	AAEN01000020
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	NR_075016
	<i>Bacillus badius</i>	NR_036893
15	<i>Bacillus cereus</i>	ABDJ01000015
	<i>Bacillus circulans</i>	AB271747
	<i>Bacillus clausii</i>	FN397477
	<i>Bacillus coagulans</i>	DQ297928
20	<i>Bacillus firmus</i>	NR_025842
	<i>Bacillus flexus</i>	NR_024691
	<i>Bacillus fordii</i>	NR_025786
	<i>Bacillus gelatini</i>	NR_025595
	<i>Bacillus halmapalus</i>	NR_026144
25	<i>Bacillus halodurans</i>	AY144582
	<i>Bacillus herbersteinensis</i>	NR_042286
	<i>Bacillus horti</i>	NR_036860
	<i>Bacillus idriensis</i>	NR_043268
	<i>Bacillus lentus</i>	NR_040792
30	<i>Bacillus licheniformis</i>	NC_006270
	<i>Bacillus megaterium</i>	GU252124

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Bacillus nealsonii</i>	NR_044546
	<i>Bacillus niabensis</i>	NR_043334
5	<i>Bacillus niacini</i>	NR_024695
	<i>Bacillus pocheonensis</i>	NR_041377
	<i>Bacillus pumilus</i>	NR_074977
	<i>Bacillus safensis</i>	JQ624766
	<i>Bacillus simplex</i>	NR_042136
10	<i>Bacillus sonorensis</i>	NR_025130
	<i>Bacillus sp. 10403023 MM10403188</i>	CAET01000089
	<i>Bacillus sp. 2_A_57_CT2</i>	ACWD01000095
	<i>Bacillus sp. 2008724126</i>	GU252108
	<i>Bacillus sp. 2008724139</i>	GU252111
15	<i>Bacillus sp. 7_16AIA</i>	FN397518
	<i>Bacillus sp. 9_3AIA</i>	FN397519
	<i>Bacillus sp. AP8</i>	JX101689
	<i>Bacillus sp. B27(2008)</i>	EU362173
20	<i>Bacillus sp. BT1B_CT2</i>	ACWC01000034
	<i>Bacillus sp. GB1.1</i>	FJ897765
	<i>Bacillus sp. GB9</i>	FJ897766
	<i>Bacillus sp. HU19.1</i>	FJ897769
	<i>Bacillus sp. HU29</i>	FJ897771
25	<i>Bacillus sp. HU33.1</i>	FJ897772
	<i>Bacillus sp. JC6</i>	JF824800
	<i>Bacillus sp. taxón oral F26</i>	HM099642
	<i>Bacillus sp. taxón oral F28</i>	HM099650
	<i>Bacillus sp. taxón oral F79</i>	HM099654
30	<i>Bacillus sp. SRC_DSf1</i>	GU797283
	<i>Bacillus sp. SRC_DSf10</i>	GU797292

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Bacillus sp. SRC_DSf2</i>	GU797284
	<i>Bacillus sp. SRC_DSf6</i>	GU797288
5	<i>Bacillus sp. tc09</i>	HQ844242
	<i>Bacillus sp. zh168</i>	FJ851424
	<i>Bacillus sphaericus</i>	DQ286318
	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	NR_026010
10	<i>Bacillus subtilis</i>	EU627588
	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	NR_029151
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NC_008600
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	NR_074926
	<i>Bacteroidales bacterium ph8</i>	JN837494
15	<i>Bacteroidales genomsp. P1</i>	AY341819
	<i>Bacteroidales genomsp. P2 clon oral MB1_G13</i>	DQ003613
	<i>Bacteroidales genomsp. P3 clon oral MB1_G34</i>	DQ003615
20	<i>Bacteroidales genomsp. P4 clon oral MB2_G17</i>	DQ003617
	<i>Bacteroidales genomsp. P5 clon oral MB2_P04</i>	DQ003619
	<i>Bacteroidales genomsp. P6 clon oral MB3_C19</i>	DQ003634
25	<i>Bacteroidales genomsp. P7 clon oral MB3_P19</i>	DQ003623
	<i>Bacteroidales genomsp. P8 clon oral MB4_G15</i>	DQ003626
30	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	NR_028607
	<i>Bacteroides barnesiae</i>	NR_041446
	<i>Bacteroides caccae</i>	EU136686

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	ACCH01000108
	<i>Bacteroides clarus</i>	AFBM01000011
5	<i>Bacteroides coagulans</i>	AB547639
	<i>Bacteroides coprocola</i>	ABIY02000050
	<i>Bacteroides coprophilus</i>	ACBW01000012
	<i>Bacteroides dorei</i>	ABWZ01000093
10	<i>Bacteroides eggerthii</i>	ACWG01000065
	<i>Bacteroides faecis</i>	GQ496624
	<i>Bacteroides finegoldii</i>	AB222699
	<i>Bacteroides fluxus</i>	AFBN01000029
	<i>Bacteroides fragilis</i>	AP006841
15	<i>Bacteroides galacturonicus</i>	DQ497994
	<i>Bacteroides helcogenes</i>	CP002352
	<i>Bacteroides heparinolyticus</i>	JN867284
	<i>Bacteroides intestinalis</i>	ABJL02000006
	<i>Bacteroides massiliensis</i>	AB200226
20	<i>Bacteroides nordii</i>	NR_043017
	<i>Bacteroides oleiciplenus</i>	AB547644
	<i>Bacteroides ovatus</i>	ACWH01000036
	<i>Bacteroides pectinophilus</i>	ABVQ01000036
	<i>Bacteroides plebeius</i>	AB200218
25	<i>Bacteroides pyogenes</i>	NR_041280
	<i>Bacteroides salanitronis</i>	CP002530
	<i>Bacteroides salyersiae</i>	EU136690
	<i>Bacteroides sp. 1_1_14</i>	ACRP01000155
	<i>Bacteroides sp. 1_1_30</i>	ADCL01000128
30	<i>Bacteroides sp. 1_1_6</i>	ACIC01000215
	<i>Bacteroides sp. 2_1_22</i>	ACPQ01000117

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Bacteroides sp. 2_1_56FAA</i>	ACWI01000065
	<i>Bacteroides sp. 2_2_4</i>	ABZZ01000168
5	<i>Bacteroides sp. 20_3</i>	ACRQ01000064
	<i>Bacteroides sp. 3_1_19</i>	ADCJ01000062
	<i>Bacteroides sp. 3_1_23</i>	ACRS01000081
	<i>Bacteroides sp. 3_1_33FAA</i>	ACPS01000085
	<i>Bacteroides sp. 3_1_40A</i>	ACRT01000136
10	<i>Bacteroides sp. 3_2_5</i>	ACIB01000079
	<i>Bacteroides sp. 315_5</i>	FJ848547
	<i>Bacteroides sp. 31SF15</i>	AJ583248
	<i>Bacteroides sp. 31SF18</i>	AJ583249
	<i>Bacteroides sp. 35AE31</i>	AJ583244
15	<i>Bacteroides sp. 35AE37</i>	AJ583245
	<i>Bacteroides sp. 35BE34</i>	AJ583246
	<i>Bacteroides sp. 35BE35</i>	AJ583247
	<i>Bacteroides sp. 4_1_36</i>	ACTC01000133
20	<i>Bacteroides sp. 4_3_47FAA</i>	ACDR02000029
	<i>Bacteroides sp. 9_1_42FAA</i>	ACAA01000096
	<i>Bacteroides sp. AR20</i>	AF139524
	<i>Bacteroides sp. AR29</i>	AF139525
	<i>Bacteroides sp. B2</i>	EU722733
25	<i>Bacteroides sp. D1</i>	ACAB02000030
	<i>Bacteroides sp. D2</i>	ACGA01000077
	<i>Bacteroides sp. D20</i>	ACPT01000052
	<i>Bacteroides sp. D22</i>	ADCK01000151
	<i>Bacteroides sp. F_4</i>	AB470322
30	<i>Bacteroides sp. NB_8</i>	AB117565
	<i>Bacteroides sp. WH2</i>	AY895180

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Bacteroides sp. XB12B</i>	AM230648
	<i>Bacteroides sp. XB44A</i>	AM230649
5	<i>Bacteroides stercoris</i>	ABFZ02000022
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NR_074277
	<i>Bacteroides uniformis</i>	AB050110
	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	GQ167666
	<i>Bacteroides vulgatus</i>	CP000139
10	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	ADKP01000087
	<i>Bacteroidetes bacterium taxón oral D27</i>	HM099638
	<i>Bacteroidetes bacterium taxón oral F31</i>	HM099643
15	<i>Bacteroidetes bacterium taxón oral F44</i>	HM099649
	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	AB370251
	<i>Barnesiella viscericola</i>	NR_041508
	<i>Bartonella bacilliformis</i>	NC_008783
20	<i>Bartonella grahamii</i>	CP001562
	<i>Bartonella henselae</i>	NC_005956
	<i>Bartonella quintana</i>	BX897700
	<i>Bartonella tamiae</i>	EF672728
25	<i>Bartonella washoensis</i>	FJ719017
	<i>Bdellovibrio sp. MPA</i>	AY294215
	<i>Bifidobacteriaceae genomsp. C1</i>	AY278612
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	AAXD02000018
	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ABYS02000004
30	<i>Bifidobacterium animalis</i>	CP001606
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ABQP01000027

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Bifidobacterium breve</i>	CP002743
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ABXY01000019
5	<i>Bifidobacterium dentium</i>	CP001750
	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	ABXB03000004
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	AY151398
	<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	AB491757
	<i>Bifidobacterium longum</i>	ABQQ01000041
10	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	ABXX02000002
	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	NR_043442
	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	AJ307005
	<i>Bifidobacterium sp. HM2</i>	AB425276
15	<i>Bifidobacterium sp. HMLN12</i>	JF519685
	<i>Bifidobacterium sp. M45</i>	HM626176
	<i>Bifidobacterium sp. MSX5B</i>	HQ616382
	<i>Bifidobacterium sp. TM_7</i>	AB218972
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	DQ340557
20	<i>Bifidobacterium urinalis</i>	AJ278695
	<i>Bilophila wadsworthia</i>	ADCP01000166
	<i>Taxón Bisgaard</i>	AY683487
	<i>Taxón Bisgaard</i>	AY683489
	<i>Taxón Bisgaard</i>	AY683491
25	<i>Taxón Bisgaard</i>	AY683492
	<i>Blastomonas natatoria</i>	NR_040824
	<i>Blautia coccoides</i>	AB571656
	<i>Blautia glucerasea</i>	AB588023
	<i>Blautia glucerasei</i>	AB439724
30	<i>Blautia hansenii</i>	ABYU02000037
	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	ACBZ01000217

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Blautia luti</i>	AB691576
	<i>Blautia producta</i>	AB600998
5	<i>Blautia schinkii</i>	NR_026312
	<i>Blautia sp. M25</i>	HM626178
	<i>Blautia stercoris</i>	HM626177
	<i>Blautia wexlerae</i>	EF036467
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	NR_025949
10	<i>Bordetella holmesii</i>	AB683187
	<i>Bordetella parapertussis</i>	NR_025950
	<i>Bordetella pertussis</i>	BX640418
	<i>Borrelia afzelii</i>	ABCU01000001
15	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ABGI01000001
	<i>Borrelia crocidurae</i>	DQ057990
	<i>Borrelia duttonii</i>	NC_011229
	<i>Borrelia garinii</i>	ABJV01000001
	<i>Borrelia hermsii</i>	AY597657
20	<i>Borrelia hispanica</i>	DQ057988
	<i>Borrelia persica</i>	HM161645
	<i>Borrelia recurrentis</i>	AF107367
	<i>Borrelia sp. NE49</i>	AJ224142
	<i>Borrelia spielmanii</i>	ABKB01000002
25	<i>Borrelia turicatae</i>	NC_008710
	<i>Borrelia valaisiana</i>	ABCY01000002
	<i>Brachybacterium alimentarium</i>	NR_026269
	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	AB537169
	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	NR_026272
30	<i>Brachyspira aalborgi</i>	FM178386
	<i>Brachyspira pilosicoli</i>	NR_075069

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Brachyspira sp. HIS3</i>	FM178387
	<i>Brachyspira sp. HIS4</i>	FM178388
5	<i>Brachyspira sp. HIS5</i>	FM178389
	<i>Brevibacillus agri</i>	NR_040983
	<i>Brevibacillus brevis</i>	NR_041524
	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	NR_043414
10	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	NR_040980
	<i>Brevibacillus invocatus</i>	NR_041836
	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	NR_037005
	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	NR_040981
	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	NR_040982
15	<i>Brevibacillus sp. phR</i>	JN837488
	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	NR_026514
	<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	NR_044854
	<i>Brevibacterium casei</i>	JF951998
	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	NR_029262
20	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	NR_042639
	<i>Brevibacterium linens</i>	AJ315491
	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	ADNU01000076
	<i>Brevibacterium paucivorans</i>	EU086796
	<i>Brevibacterium sanguinis</i>	NR_028016
25	<i>Brevibacterium sp. H15</i>	AB177640
	<i>Brevibacterium sp. JC43</i>	JF824806
	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	CP002102
	<i>Brucella abortus</i>	ACBJ01000075
	<i>Brucella canis</i>	NR_044652
30	<i>Brucella ceti</i>	ACJD01000006
	<i>Brucella melitensis</i>	AE009462

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Brucella microti</i>	NR_042549
	<i>Brucella ovis</i>	NC_009504
5	<i>Brucella sp. 83_13</i>	ACBQ01000040
	<i>Brucella sp. B01</i>	EU053207
	<i>Brucella suis</i>	ACBK01000034
	<i>Bryantella formatexigens</i>	ACCL02000018
10	<i>Buchnera aphidicola</i>	NR_074609
	<i>Bulleidia extructa</i>	ADFR01000011
	<i>Burkholderia ambifaria</i>	AAUZ01000009
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	AAHI01000060
	<i>Burkholderia cepacia</i>	NR_041719
15	<i>Burkholderia mallei</i>	CP000547
	<i>Burkholderia multivorans</i>	NC_010086
	<i>Burkholderia oklahomensis</i>	DQ108388
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	CP001408
	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	HQ005410
20	<i>Burkholderia sp. 383</i>	CP000151
	<i>Burkholderia xenovorans</i>	U86373
	<i>Burkholderiales bacterium 1_1_47</i>	ADCQ01000066
	<i>Butyricicoccus pullicaecorum</i>	HH793440
	<i>Butyricimonas virosa</i>	AB443949
25	<i>Butyrivibrio crossotus</i>	ABWN01000012
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	U41172
	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	NR_040787
	<i>Caminicella sporogenes</i>	NR_025485
	<i>Campylobacter coli</i>	AAFL01000004
30	<i>Campylobacter concisus</i>	CP000792
	<i>Campylobacter curvus</i>	NC_009715

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Campylobacter fetus</i>	ACLG01001177
	<i>Campylobacter gracilis</i>	ACYG01000026
5	<i>Campylobacter hominis</i>	NC_009714
	<i>Campylobacter jejuni</i>	AL139074
	<i>Campylobacter lari</i>	CP000932
	<i>Campylobacter rectus</i>	ACFU01000050
10	<i>Campylobacter showae</i>	ACVQ01000030
	<i>Campylobacter sp. FOBRC14</i>	HQ616379
	<i>Campylobacter sp. FOBRC15</i>	HQ616380
	<i>Campylobacter sp. clon oral BB120</i>	AY005038
	<i>Campylobacter sputorum</i>	NR_044839
15	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	AEP01000040
	<i>Candidatus Arthromitus sp. SFB_mouse_Yit</i>	NR_074460
	<i>Candidatus Sulcia muelleri</i>	CP002163
	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	CP002113
20	<i>Capnocytophaga genomosp. C1</i>	AY278613
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ACLQ01000011
	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	X97248
	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	AEOH01000054
	<i>Capnocytophaga sp. GEJ8</i>	GU561335
25	<i>Capnocytophaga sp. clon oral AH015</i>	AY005074
	<i>Capnocytophaga sp. clon oral ASCH05</i>	AY923149
	<i>Capnocytophaga sp. clon oral ID062</i>	AY349368
30	<i>Capnocytophaga sp. cepa oral A47ROY</i>	AY005077
	<i>Capnocytophaga sp. cepa oral S3</i>	AY005073

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Capnocytophaga sp. taxón oral 338</i>	AEXX01000050
	<i>Capnocytophaga sp. Slb</i>	U42009
5	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ABZV01000054
	<i>Cardiobacterium hominis</i>	ACKY01000036
	<i>Cardiobacterium valvarum</i>	NR_028847
	<i>Carnobacterium divergens</i>	NR_044706
	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	NC_019425
10	<i>Catabacter hongkongensis</i>	AB671763
	<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	AB030224
	<i>Catonella genomosp. P1 clon oral MB5_P12</i>	DQ003629
15	<i>Catonella morbi</i>	ACIL02000016
	<i>Catonella sp. clon oral FL037</i>	AY349369
	<i>Cedecea davisae</i>	AF493976
	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	AY501364
	<i>Cetobacterium somerae</i>	AJ438155
20	<i>Chlamydia muridarum</i>	AE002160
	<i>Chlamydia psittaci</i>	NR_036864
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	U68443
	<i>Chlamydiales bacterium NS11</i>	JN606074
	<i>Chlamydiales bacterium NS13</i>	JN606075
25	<i>Chlamydiales bacterium NS16</i>	JN606076
	<i>Chlamydophila pecorum</i>	D88317
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	NC_002179
	<i>Chlamydophila psittaci</i>	D85712
	<i>Chloroflexi genomosp. P1</i>	AY331414
30	<i>Christensenella minuta</i>	AB490809
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	NC_005085

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Chryseobacterium anthropi</i>	AM982793
5	<i>Chryseobacterium gleum</i>	ACKQ02000003
	<i>Chryseobacterium hominis</i>	NR_042517
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	FR870441
	<i>Citrobacter braakii</i>	NR_028687
	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371
	<i>Citrobacter freundii</i>	NR_028894
10	<i>Citrobacter gillenbergii</i>	AF025367
	<i>Citrobacter koseri</i>	NC_009792
	<i>Citrobacter murliniae</i>	AF025369
	<i>Citrobacter rodentium</i>	NR_074903
15	<i>Citrobacter sedlakii</i>	AF025364
	<i>Citrobacter sp. 30_2</i>	ACDJ01000053
	<i>Citrobacter sp. KMSI_3</i>	GQ468398
	<i>Citrobacter werkmanii</i>	AF025373
	<i>Citrobacter youngae</i>	ABWL02000011
20	<i>Cloacibacillus evryensis</i>	GQ258966
	<i>Clostridiaceae bacterium END_2</i>	EF451053
	<i>Clostridiaceae bacterium JC13</i>	JF824807
	<i>Clostridiales bacterium 1_7_47FAA</i>	ABQR01000074
	<i>Clostridiales bacterium 9400853</i>	HM587320
25	<i>Clostridiales bacterium 9403326</i>	HM587324
	<i>Clostridiales bacterium clon oral P4PA_66 P1</i>	AY207065
	<i>Clostridiales bacterium taxón oral 093</i>	GQ422712
30	<i>Clostridiales bacterium taxón oral F32</i>	HM099644

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Clostridiales bacterium ph2</i>	JN837487
	<i>Clostridiales bacterium SY8519</i>	AB477431
5	<i>Clostridiales genomosp. BVAB3</i>	CP001850
	<i>Clostridiales sp. SM4_1</i>	FP929060
	<i>Clostridiales sp. SS3_4</i>	AY305316
	<i>Clostridiales sp. SSC_2</i>	FP929061
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NR_074511
10	<i>Clostridium aerotolerans</i>	X76163
	<i>Clostridium aldenense</i>	NR_043680
	<i>Clostridium aldrichii</i>	NR_026099
	<i>Clostridium algidicarnis</i>	NR_041746
15	<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>	NR_028726
	<i>Clostridium aminovalericum</i>	NR_029245
	<i>Clostridium amygdalinum</i>	AY353957
	<i>Clostridium argentinense</i>	NR_029232
	<i>Clostridium asparagiforme</i>	ACCJ01000522
20	<i>Clostridium baratii</i>	NR_029229
	<i>Clostridium bartlettii</i>	ABEZ02000012
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	NR_074434
	<i>Clostridium bifermentans</i>	X73437
	<i>Clostridium bolteae</i>	ABCC02000039
25	<i>Clostridium botulinum</i>	NC_010723
	<i>Clostridium butyricum</i>	ABDT01000017
	<i>Clostridium cadaveris</i>	AB542932
	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	FR733710
	<i>Clostridium carnis</i>	NR_044716
30	<i>Clostridium celatum</i>	X77844
	<i>Clostridium celerecrescens</i>	JQ246092

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Clostridium cellulosi</i>
	<i>Clostridium chauvoei</i>
5	<i>Clostridium citroniae</i>
	<i>Clostridium clariflavum</i>
	<i>Clostridium clostridiiformes</i>
	<i>Clostridium clostridioforme</i>
10	<i>Clostridium coccoides</i>
	<i>Clostridium cochlearium</i>
	<i>Clostridium cocleatum</i>
	<i>Clostridium colicanis</i>
	<i>Clostridium colinum</i>
15	<i>Clostridium difficile</i>
	<i>Clostridium disporicum</i>
	<i>Clostridium estertheticum</i>
	<i>Clostridium fallax</i>
	<i>Clostridium favosporum</i>
20	<i>Clostridium felsineum</i>
	<i>Clostridium frigidicarnis</i>
	<i>Clostridium gasigenes</i>
	<i>Clostridium ghonii</i>
	<i>Clostridium glycolicum</i>
25	<i>Clostridium glycyrrhizinilyticum</i>
	<i>Clostridium haemolyticum</i>
	<i>Clostridium hathewayi</i>
	<i>Clostridium hiranonis</i>
	<i>Clostridium histolyticum</i>
30	<i>Clostridium hylemonae</i>
	<i>Clostridium indolis</i>

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Clostridium innocuum</i>
	<i>Clostridium irregulare</i>
5	<i>Clostridium isatidis</i>
	<i>Clostridium kluyveri</i>
	<i>Clostridium lactatifermentans</i>
	<i>Clostridium lavalense</i>
10	<i>Clostridium leptum</i>
	<i>Clostridium limosum</i>
	<i>Clostridium magnum</i>
	<i>Clostridium malenominatum</i>
	<i>Clostridium mayombeii</i>
15	<i>Clostridium methylpentosum</i>
	<i>Clostridium nexile</i>
	<i>Clostridium novyi</i>
	<i>Clostridium orbiscindens</i>
	<i>Clostridium oroticum</i>
20	<i>Clostridium paraputrificum</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Clostridium phytofermentans</i>
	<i>Clostridium piliforme</i>
	<i>Clostridium putrefaciens</i>
25	<i>Clostridium quinii</i>
	<i>Clostridium ramosum</i>
	<i>Clostridium rectum</i>
	<i>Clostridium saccharogumia</i>
30	<i>Clostridium saccharolyticum</i>
	<i>Clostridium sardiniense</i>
	<i>Clostridium sartagoforme</i>

UTO	Registro de acceso público DB
<i>Clostridium scindens</i>	AF262238
<i>Clostridium septicum</i>	NR_026020
5 <i>Clostridium sordellii</i>	AB448946
<i>Clostridium sp. 7_2_43FAA</i>	ACDK01000101
<i>Clostridium sp. D5</i>	ADBG01000142
<i>Clostridium sp. HGF2</i>	AENW01000022
10 <i>Clostridium sp. HPB_46</i>	AY862516
<i>Clostridium sp. JC122</i>	CAEV01000127
<i>Clostridium sp. L2_50</i>	AAYW02000018
<i>Clostridium sp. LMG 16094</i>	X95274
<i>Clostridium sp. M62_1</i>	ACFX02000046
15 <i>Clostridium sp. MLG055</i>	AF304435
<i>Clostridium sp. MT4 E</i>	FJ159523
<i>Clostridium sp. NMBHI_1</i>	JN093130
<i>Clostridium sp. NML 04A032</i>	EU815224
<i>Clostridium sp. SS2_1</i>	ABGC03000041
20 <i>Clostridium sp. SY8519</i>	AP012212
<i>Clostridium sp. TM_40</i>	AB249652
<i>Clostridium sp. YIT 12069</i>	AB491207
<i>Clostridium sp. YIT 12070</i>	AB491208
<i>Clostridium sphenoides</i>	X73449
25 <i>Clostridium spiroforme</i>	X73441
<i>Clostridium sporogenes</i>	ABKW02000003
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	NR_044835
<i>Clostridium stercorarium</i>	NR_025100
<i>Clostridium sticklandii</i>	L04167
30 <i>Clostridium straminisolvens</i>	NR_024829
<i>Clostridium subterminale</i>	NR_041795

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	NR_044161
	<i>Clostridium symbiosum</i>	ADLQ01000114
5	<i>Clostridium tertium</i>	Y18174
	<i>Clostridium tetani</i>	NC_004557
	<i>Clostridium thermocellum</i>	NR_074629
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	NR_044718
	<i>Clostridium viride</i>	NR_026204
10	<i>Clostridium xyloxyticum</i>	NR_037068
	<i>Collinsella aerofaciens</i>	AAVN02000007
	<i>Collinsella intestinalis</i>	ABXH02000037
	<i>Collinsella stercoris</i>	ABXJ01000150
15	<i>Collinsella tanakaei</i>	AB490807
	<i>Comamonadaceae bacterium NML000135</i>	JN585335
	<i>Comamonadaceae bacterium NML790751</i>	JN585331
	<i>Comamonadaceae bacterium NML910035</i>	JN585332
	<i>Comamonadaceae bacterium NML910036</i>	JN585333
20	<i>Comamonadaceae bacterium taxón oral F47</i>	HM099651
	<i>Comamonas sp. NSP5</i>	AB076850
	<i>Conchiformibius kuhniae</i>	NR_041821
	<i>Coprobasillus cateniformis</i>	AB030218
25	<i>Coprobasillus sp. 29_1</i>	ADKX01000057
	<i>Coprobasillus sp. D7</i>	ACDT01000199
	<i>Coprococcus catus</i>	EU266552
	<i>Coprococcus comes</i>	ABVR01000038
	<i>Coprococcus eutactus</i>	EF031543
30	<i>Coprococcus sp. ART55_1</i>	AY350746
	<i>Coriobacteriaceae bacterium BV3Ac1</i>	JN809768

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Coriobacteriaceae bacterium JC110</i>
	<i>Coriobacteriaceae bacterium phI</i>
5	<i>Corynebacterium accolens</i>
	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
	<i>Corynebacterium appendicis</i>
10	<i>Corynebacterium argentoratense</i>
	<i>Corynebacterium atypicum</i>
	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>
	<i>Corynebacterium bovis</i>
	<i>Corynebacterium canis</i>
15	<i>Corynebacterium casei</i>
	<i>Corynebacterium confusum</i>
	<i>Corynebacterium coyleae</i>
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
	<i>Corynebacterium durum</i>
20	<i>Corynebacterium efficiens</i>
	<i>Corynebacterium falsenii</i>
	<i>Corynebacterium flavescens</i>
	<i>Corynebacterium genitalium</i>
	<i>Corynebacterium glaucum</i>
25	<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	<i>Corynebacterium hansenii</i>
	<i>Corynebacterium imitans</i>
30	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>
	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Corynebacterium macginleyi</i>
	<i>Corynebacterium mastitidis</i>
5	<i>Corynebacterium matruchotii</i>
	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>
	<i>Corynebacterium propinquum</i>
10	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>
	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>
	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
	<i>Corynebacterium pyruviciproducens</i>
15	<i>Corynebacterium renale</i>
	<i>Corynebacterium resistens</i>
	<i>Corynebacterium riegelii</i>
	<i>Corynebacterium simulans</i>
	<i>Corynebacterium singulare</i>
20	<i>Corynebacterium sp. 1 ex sheep</i>
	<i>Corynebacterium sp. L_2012475</i>
	<i>Corynebacterium sp. NML 93_0481</i>
	<i>Corynebacterium sp. NML 97_0186</i>
	<i>Corynebacterium sp. NML 99_0018</i>
25	<i>Corynebacterium striatum</i>
	<i>Corynebacterium sundsvallense</i>
	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>
	<i>Corynebacterium tuscaniae</i>
	<i>Corynebacterium ulcerans</i>
30	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
	<i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Corynebacterium variabile</i>	NR_025314
	<i>Corynebacterium xerosis</i>	FN179330
5	<i>Coxiella burnetii</i>	CP000890
	<i>Cronobacter malonaticus</i>	GU122174
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	NC_009778
	<i>Cronobacter turicensis</i>	FN543093
	<i>Cryptobacterium curtum</i>	GQ422741
10	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	GU230889
	<i>Cytophaga xylanolytica</i>	FR733683
	<i>Deferribacteres sp. clon oral JV001</i>	AY349370
15	<i>Deferribacteres sp. clon oral JV006</i>	AY349371
	<i>Deferribacteres sp. clon oral JV023</i>	AY349372
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	AE000513
20	<i>Deinococcus sp. R_43890</i>	FR682752
	<i>Delftia acidovorans</i>	CP000884
	<i>Dermabacter hominis</i>	FJ263375
	<i>Dermacoccus sp. Ellin185</i>	AEIQ01000090
	<i>Desmospora activa</i>	AM940019
25	<i>Desmospora sp. 8437</i>	AFHT01000143
	<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	AJ276701
	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	NR_074996
	<i>Desulfobulbus sp. clon oral CH031</i>	AY005036
	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	NR_044832
30	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DQ092636
	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	U42221

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Desulfovibrio piger</i>	AF192152
	<i>Desulfovibrio sp. 3_1_syn3</i>	ADDR01000239
5	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	NR_074897
	<i>Dialister invisus</i>	ACIM02000001
	<i>Dialister micraerophilus</i>	AFBB01000028
	<i>Dialister microaerophilus</i>	AENT01000008
	<i>Dialister pneumosintes</i>	HM596297
10	<i>Dialister propionicifaciens</i>	NR_043231
	<i>Dialister sp. taxón oral 502</i>	GQ422739
	<i>Dialister succinatiphilus</i>	AB370249
	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	GQ870426
15	<i>Dietzia sp. BBDP51</i>	DQ337512
	<i>Dietzia sp. CA149</i>	GQ870422
	<i>Dietzia timorensis</i>	GQ870424
	<i>Dorea formicigenerans</i>	AAXA02000006
	<i>Dorea longicatena</i>	AJ132842
20	<i>Dysgonomonas gadei</i>	ADLV01000001
	<i>Dysgonomonas mossii</i>	ADLW01000023
	<i>Edwardsiella tarda</i>	CP002154
	<i>Eggerthella lenta</i>	AF292375
	<i>Eggerthella sinensis</i>	AY321958
25	<i>Eggerthella sp. 1_3_56FAA</i>	ACWN01000099
	<i>Eggerthella sp. HGA1</i>	AEXR01000021
	<i>Eggerthella sp. YY7918</i>	AP012211
	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	AAIF01000035
	<i>Eikenella corrodens</i>	ACEA01000028
30	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	ACYI01000081
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AJ251468

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Enterobacter asburiae</i>
	NR_024640
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
	Z96078
5	<i>Enterobacter cloacae</i>
	FP929040
	<i>Enterobacter cowanii</i>
	NR_025566
	<i>Enterobacter hormaechei</i>
	AFHR01000079
	<i>Enterobacter sp. 247BMC</i>
	HQ122932
10	<i>Enterobacter sp. 638</i>
	NR_074777
	<i>Enterobacter sp. JC163</i>
	JN657217
	<i>Enterobacter sp. SCSS</i>
	HM007811
	<i>Enterobacter sp. TSE38</i>
	HM156134
15	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>
	9_2_54FAA
	ADCU01000033
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>
	CF01Ent_1
	AJ489826
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>
	Smarlab 3302238
	AY538694
20	<i>Enterococcus avium</i>
	AF133535
	<i>Enterococcus caccae</i>
	AY943820
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
	AEWT01000047
	<i>Enterococcus durans</i>
	AJ276354
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	AE016830
25	<i>Enterococcus faecium</i>
	AM157434
	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	AB269767
	<i>Enterococcus gilvus</i>
	AY033814
	<i>Enterococcus hawaiiensis</i>
	AY321377
	<i>Enterococcus hirae</i>
30	AF061011
	<i>Enterococcus italicus</i>
	AEPV01000109
	<i>Enterococcus mundtii</i>
	NR_024906

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Enterococcus raffinosus</i>	FN600541
	<i>Enterococcus sp. BV2CASA2</i>	JN809766
5	<i>Enterococcus sp. CCRI_16620</i>	GU457263
	<i>Enterococcus sp. F95</i>	FJ463817
	<i>Enterococcus sp. RfL6</i>	AJ133478
	<i>Enterococcus thailandicus</i>	AY321376
	<i>Eremococcus coleocola</i>	AENN01000008
10	<i>Erysipelothrix inopinata</i>	NR_025594
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	ACLK01000021
	<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	NR_040871
	<i>Erysipelotrichaceae bacterium</i>	ACTJ01000113
15	3_1_53	
	<i>Erysipelotrichaceae bacterium</i>	ACZW01000054
	5_2_54FAA	
	<i>Escherichia albertii</i>	ABKX01000012
	<i>Escherichia coli</i>	NC_008563
20	<i>Escherichia fergusonii</i>	CU928158
	<i>Escherichia hermannii</i>	HQ407266
	<i>Escherichia sp. 1_1_43</i>	ACID01000033
	<i>Escherichia sp. 4_1_40B</i>	ACDM02000056
	<i>Escherichia sp. B4</i>	EU722735
25	<i>Escherichia vulneris</i>	NR_041927
	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	AY675965
	<i>Eubacteriaceae bacterium P4P_50 P4</i>	AY207060
	<i>Eubacterium barkeri</i>	NR_044661
	<i>Eubacterium bifforme</i>	ABYT01000002
30	<i>Eubacterium brachy</i>	U13038
	<i>Eubacterium budayi</i>	NR_024682

	UTO	Registro de acceso público DB
5	<i>Eubacterium callanderi</i>	NR_026330
	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	AY178842
	<i>Eubacterium contortum</i>	FR749946
	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	HM037995
	<i>Eubacterium cylindroides</i>	FP929041
10	<i>Eubacterium desmolans</i>	NR_044644
	<i>Eubacterium dolichum</i>	L34682
	<i>Eubacterium eligens</i>	CP001104
	<i>Eubacterium fissicatena</i>	FR749935
	<i>Eubacterium hadrum</i>	FR749933
15	<i>Eubacterium hallii</i>	L34621
	<i>Eubacterium infirmum</i>	U13039
	<i>Eubacterium limosum</i>	CP002273
	<i>Eubacterium moniliforme</i>	HF558373
	<i>Eubacterium multifforme</i>	NR_024683
20	<i>Eubacterium nitritogenes</i>	NR_024684
	<i>Eubacterium nodatum</i>	U13041
	<i>Eubacterium ramulus</i>	AJ011522
	<i>Eubacterium rectale</i>	FP929042
	<i>Eubacterium ruminantium</i>	NR_024661
25	<i>Eubacterium saburreum</i>	AB525414
	<i>Eubacterium saphenum</i>	NR_026031
	<i>Eubacterium siraeum</i>	ABCA03000054
	<i>Eubacterium sp. 3_1_31</i>	ACTL01000045
	<i>Eubacterium sp. AS15b</i>	HQ616364
30	<i>Eubacterium sp. OBRC9</i>	HQ616354
	<i>Eubacterium sp. clon oral GI038</i>	AY349374
	<i>Eubacterium sp. clon oral IR009</i>	AY349376

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Eubacterium sp. clon oral JH012</i>	AY349373
	<i>Eubacterium sp. clon oral JI012</i>	AY349379
5	<i>Eubacterium sp. clon oral JN088</i>	AY349377
	<i>Eubacterium sp. clon oral JS001</i>	AY349378
	<i>Eubacterium sp. clon oral OH3A</i>	AY947497
	<i>Eubacterium sp. WAL 14571</i>	FJ687606
	<i>Eubacterium tenue</i>	M59118
10	<i>Eubacterium tortuosum</i>	NR_044648
	<i>Eubacterium ventriosum</i>	L34421
	<i>Eubacterium xylanophilum</i>	L34628
	<i>Eubacterium yurii</i>	AEES01000073
15	<i>Ewingella americana</i>	JN175329
	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	FJ970034
	<i>Facklamia hominis</i>	Y10772
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ACOP02000011
	<i>Filifactor alocis</i>	CP002390
20	<i>Filifactor villosus</i>	NR_041928
	<i>Finegoldia magna</i>	ACHM02000001
	<i>Flavobacteriaceae genomosp. C1</i>	AY278614
	<i>Flavobacterium sp. NF2_1</i>	FJ195988
	<i>Flavonifractor plautii</i>	AY724678
25	<i>Flexispira rappini</i>	AY126479
	<i>Flexistipes sinusarabici</i>	NR_074881
	<i>Francisella novicida</i>	ABSS01000002
	<i>Francisella philomiragia</i>	AY928394
	<i>Francisella tularensis</i>	ABAZ01000082
30	<i>Fulvimonas sp. NML 060897</i>	EF589680
	<i>Fusobacterium canifelinum</i>	AY162222

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Fusobacterium genomosp. C1</i>	AY278616
	<i>Fusobacterium genomosp. C2</i>	AY278617
5	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	ACET01000043
	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	ACDB02000034
	<i>Fusobacterium naviforme</i>	HQ223106
	<i>Fusobacterium necrogenes</i>	X55408
	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	AM905356
10	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ADVK01000034
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ACJY01000002
	<i>Fusobacterium russii</i>	NR_044687
	<i>Fusobacterium sp. 1_1_41FAA</i>	ADGG01000053
15	<i>Fusobacterium sp. 11_3_2</i>	ACUO01000052
	<i>Fusobacterium sp. 12_1B</i>	AGWJ01000070
	<i>Fusobacterium sp. 2_1_31</i>	ACDC02000018
	<i>Fusobacterium sp. 3_1_27</i>	ADGF01000045
	<i>Fusobacterium sp. 3_1_33</i>	ACQE01000178
20	<i>Fusobacterium sp. 3_1_36A2</i>	ACPU01000044
	<i>Fusobacterium sp. 3_1_5R</i>	ACDD01000078
	<i>Fusobacterium sp. AC18</i>	HQ616357
	<i>Fusobacterium sp. ACB2</i>	HQ616358
	<i>Fusobacterium sp. AS2</i>	HQ616361
25	<i>Fusobacterium sp. CM1</i>	HQ616371
	<i>Fusobacterium sp. CM21</i>	HQ616375
	<i>Fusobacterium sp. CM22</i>	HQ616376
	<i>Fusobacterium sp. D12</i>	ACDG02000036
	<i>Fusobacterium sp. clon oral ASCF06</i>	AY923141
30	<i>Fusobacterium sp. clon oral ASCF11</i>	AY953256
	<i>Fusobacterium ulcerans</i>	ACDH01000090

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Fusobacterium varium</i>	ACIE01000009
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	CP001849
5	<i>Gemella haemolysans</i>	ACDZ02000012
	<i>Gemella morbillorum</i>	NR_025904
	<i>Gemella morbillorum</i>	ACRX01000010
	<i>Gemella sanguinis</i>	ACRY01000057
	<i>Gemella sp. clon oral ASCE02</i>	AY923133
10	<i>Gemella sp. clon oral ASCF04</i>	AY923139
	<i>Gemella sp. clon oral ASCF12</i>	AY923143
	<i>Gemella sp. WAL 1945J</i>	EU427463
	<i>Gemmiger formicilis</i>	GU562446
15	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	NR_074989
	<i>Geobacillus sp. E263</i>	DQ647387
	<i>Geobacillus sp. WCH70</i>	CP001638
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NR_040794
	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	NR_043020
20	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	NR_074976
	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	NR_043022
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	NR_074931
	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	CP001124
	<i>Gloeobacter violaceus</i>	NR_074282
25	<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i>	NR_028767
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	NR_074292
	<i>Gluconacetobacter entanii</i>	NR_028909
	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	NR_026513
	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	NR_026133
30	<i>Gluconacetobacter johannae</i>	NR_024959
	<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	NR_041295

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	NR_074338
	<i>Gordonia bronchialis</i>	NR_027594
5	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	DQ385609
	<i>Gordonia sp. KTR9</i>	DQ068383
	<i>Gordonia sputi</i>	FJ536304
	<i>Gordonia terrae</i>	GQ848239
	<i>Gordonibacter pamelaee</i>	AM886059
10	<i>Gordonibacter pamelaee</i>	FP929047
	<i>Gracilibacter thermotolerans</i>	NR_043559
	<i>Gramella forsetii</i>	NR_074707
	<i>Granulicatella adiacens</i>	ACKZ01000002
	<i>Granulicatella elegans</i>	AB252689
15	<i>Granulicatella paradiacens</i>	AY879298
	<i>Granulicatella sp. M658_99_3</i>	AJ271861
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASC02</i>	AY923126
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASCA05</i>	DQ341469
20	<i>Granulicatella sp. clon oral ASCB09</i>	AY953251
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASCG05</i>	AY923146
	<i>Grimontia hollisae</i>	ADAQ01000013
25	<i>Haematobacter sp. BC14248</i>	GU396991
	<i>Haemophilus aegyptius</i>	AFBC01000053
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	AE017143
	<i>Haemophilus genomsp. P2 clon oral MB3_C24</i>	DQ003621
30	<i>Haemophilus genomsp. P3 clon oral MB3_C38</i>	DQ003635

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	JN175335
	<i>Haemophilus influenzae</i>	AADP01000001
5	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	GU561425
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	AEWU01000024
	<i>Haemophilus paraphrophaemolyticus</i>	M75076
	<i>Haemophilus parasuis</i>	GU226366
	<i>Haemophilus somnus</i>	NC_008309
10	<i>Haemophilus</i> sp. 70334	HQ680854
	<i>Haemophilus</i> sp. HK445	FJ685624
	<i>Haemophilus</i> sp. clon oral ASCA07	AY923117
	<i>Haemophilus</i> sp. clon oral ASCG06	AY923147
	<i>Haemophilus</i> sp. clon oral BJ021	AY005034
15	<i>Haemophilus</i> sp. clon oral BJ095	AY005033
	<i>Haemophilus</i> sp. clon oral JM053	AY349380
	<i>Haemophilus</i> sp. taxón oral 851	AGRK01000004
	<i>Haemophilus sputorum</i>	AFNK01000005
20	<i>Hafnia alvei</i>	DQ412565
	<i>Halomonas elongata</i>	NR_074782
	<i>Halomonas johnsoniae</i>	FR775979
	<i>Halorubrum lipolyticum</i>	AB477978
	<i>Helicobacter bilis</i>	ACDN01000023
25	<i>Helicobacter canadensis</i>	ABQS01000108
	<i>Helicobacter cinaedi</i>	ABQT01000054
	<i>Helicobacter pullorum</i>	ABQU01000097
	<i>Helicobacter pylori</i>	CP000012
	<i>Helicobacter</i> sp. None	U44756
30	<i>Helicobacter winthamensis</i>	ACDO01000013
	<i>Helicobacterium modesticaldum</i>	NR_074517

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	CP002039
	<i>Herbaspirillum sp. JC206</i>	JN657219
5	<i>Histophilus somni</i>	AF549387
	<i>Holdemania filiformis</i>	Y11466
	<i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i>	NR_044425
	<i>Hyperthermus butylicus</i>	CP000493
10	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	AY468372
	<i>Hyphomonas neptunium</i>	NR_074092
	<i>Ignatzschineria indica</i>	HQ823562
	<i>Ignatzschineria sp. NML 95_0260</i>	HQ823559
15	<i>Ignicoccus islandicus</i>	X99562
	<i>Inquilinus limosus</i>	NR_029046
	<i>Janibacter limosus</i>	NR_026362
	<i>Janibacter melonis</i>	EF063716
	<i>Janthinobacterium sp. SY12</i>	EF455530
20	<i>Johnsonella ignava</i>	X87152
	<i>Jonquetella anthropi</i>	AC0002000004
	<i>Kerstersia gyiorum</i>	NR_025669
	<i>Kingella denitrificans</i>	AEWV01000047
25	<i>Kingella genomosp. P1 oral cone MB2_C20</i>	DQ003616
	<i>Kingella kingae</i>	AFHS01000073
	<i>Kingella oralis</i>	ACJW02000005
	<i>Kingella sp. clon oral ID059</i>	AY349381
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AY292871
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP000647
	<i>Klebsiella sp. AS10</i>	HQ616362

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Klebsiella sp. Co9935</i>	DQ068764
5	<i>Klebsiella sp. clon de enriquecimiento de cultivo SRC_DSD25</i>	HM195210
	<i>Klebsiella sp. OBRC7</i>	HQ616353
	<i>Klebsiella sp. SP_BA</i>	FJ999767
10	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD1</i>	GU797254
	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD11</i>	GU797263
	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD12</i>	GU797264
	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD15</i>	GU797267
	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD2</i>	GU797253
15	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD6</i>	GU797258
	<i>Klebsiella variicola</i>	CP001891
	<i>Kluyvera ascorbata</i>	NR_028677
	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NR_028803
	<i>Kocuria marina</i>	GQ260086
20	<i>Kocuria palustris</i>	EU333884
	<i>Kocuria rhizophila</i>	AY030315
	<i>Kocuria rosea</i>	X87756
	<i>Kocuria varians</i>	AF542074
	<i>Lachnobacterium bovis</i>	GU324407
25	<i>Lachnospira multipara</i>	FR733699
	<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	L14675
	<i>Lachnospiraceae bacterium 1_1_57FAA</i>	ACTM01000065
30	<i>Lachnospiraceae bacterium 1_4_56FAA</i>	ACTN01000028
	<i>Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA</i>	ADLB01000035

	UTO	Registro de acceso público DB
5	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 2_1_58FAA	ACTO01000052
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 3_1_57FAA_CT1	ACTP01000124
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 4_1_37FAA	ADCR01000030
10	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 5_1_57FAA	ACTR01000020
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 5_1_63FAA	ACTS01000081
15	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 6_1_63FAA	ACTV01000014
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 8_1_57FAA	ACWQ01000079
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 9_1_43BFAA	ACTX01000023
20	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> A4	DQ789118
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> DJF VP30	EU728771
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> ICM62	HQ616401
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> MSX33	HQ616384
25	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> taxón oral 107	ADDS01000069
	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> taxón oral F15	HM099641
	<i>Lachnospiraceae genomsp.</i> C1	AY278618
	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	NR_024718
30	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CP000033
	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	NR_044701
	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	ADNY01000006

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	CP002338
	<i>Lactobacillus antri</i>	ACLL01000037
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	EU194349
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	ACGH01000101
	<i>Lactobacillus casei</i>	CP000423
	<i>Lactobacillus catenaformis</i>	M23729
10	<i>Lactobacillus coleohominis</i>	ACOH01000030
	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	NR_044705
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	ACOG01000151
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	NR_042437
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CP002341
15	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	NR_036861
	<i>Lactobacillus farciminis</i>	NR_044707
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP002033
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	AC0Z01000018
	<i>Lactobacillus gastricus</i>	AICN01000060
20	<i>Lactobacillus genomsp. C1</i>	AY278619
	<i>Lactobacillus genomsp. C2</i>	AY278620
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	ACLM01000202
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	ACGP01000200
	<i>Lactobacillus hominis</i>	FR681902
25	<i>Lactobacillus iners</i>	AEKJ01000002
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	ACQD01000066
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	AE017198
	<i>Lactobacillus kalixensis</i>	NR_029083
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	NR_042440
30	<i>Lactobacillus kefiri</i>	NR_042230
	<i>Lactobacillus kimchii</i>	NR_025045

	UTO	Registro de acceso público DB
5	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	JX986966
	<i>Lactobacillus mucosae</i>	FR693800
	<i>Lactobacillus murinus</i>	NR_042231
	<i>Lactobacillus nodensis</i>	NR_041629
	<i>Lactobacillus oeni</i>	NR_043095
10	<i>Lactobacillus oris</i>	AEKL01000077
	<i>Lactobacillus parabrevis</i>	NR_042456
	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	NR_041294
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	ABQV01000067
	<i>Lactobacillus parakefiri</i>	NR_029039
15	<i>Lactobacillus pentosus</i>	JN813103
	<i>Lactobacillus perolens</i>	NR_029360
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ACGZ02000033
	<i>Lactobacillus pontis</i>	HM218420
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	ACGW02000012
20	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ABWJ01000068
	<i>Lactobacillus rogosae</i>	GU269544
	<i>Lactobacillus ruminis</i>	ACGS02000043
	<i>Lactobacillus sakei</i>	DQ989236
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	AEBA01000145
25	<i>Lactobacillus saniviri</i>	AB602569
	<i>Lactobacillus senioris</i>	AB602570
	<i>Lactobacillus sp. 66c</i>	FR681900
	<i>Lactobacillus sp. BT6</i>	HQ616370
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0701</i>	EU600905
30	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0702</i>	EU600906
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0703</i>	EU600907
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0704</i>	EU600908

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0705</i>	EU600909
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0707</i>	EU600911
5	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0709</i>	EU600913
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0711</i>	EU600915
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0712</i>	EU600916
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0713</i>	EU600917
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0716</i>	EU600921
10	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0718</i>	EU600922
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0719</i>	EU600923
	<i>Lactobacillus sp. clon oral HT002</i>	AY349382
	<i>Lactobacillus sp. clon oral HT070</i>	AY349383
15	<i>Lactobacillus sp. taxón oral 052</i>	GQ422710
	<i>Lactobacillus tucseti</i>	NR_042194
	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	ACGU01000081
	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	ACGV01000168
	<i>Lactobacillus vini</i>	NR_042196
20	<i>Lactobacillus vitulinus</i>	NR_041305
	<i>Lactobacillus zeae</i>	NR_037122
	<i>Lactococcus garvieae</i>	AF061005
	<i>Lactococcus lactis</i>	CP002365
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	NR_044359
25	<i>Lactonifactor longoviformis</i>	DQ100449
	<i>Laribacter hongkongensis</i>	CP001154
	<i>Lautropia mirabilis</i>	AEQP01000026
	<i>Lautropia sp. clon oral AP009</i>	AY005030
	<i>Legionella hackeliae</i>	M36028
30	<i>Legionella longbeachae</i>	M36029
	<i>Legionella pneumophila</i>	NC_002942

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Legionella sp. D3923</i>	JN380999
	<i>Legionella sp. D4088</i>	JN381012
5	<i>Legionella sp. H63</i>	JF831047
	<i>Legionella sp. NML 93L054</i>	GU062706
	<i>Legionella steelei</i>	HQ398202
	<i>Leminorella grimontii</i>	AJ233421
	<i>Leminorella richardii</i>	HF558368
10	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NC_008508
	<i>Leptospira broomii</i>	NR_043200
	<i>Leptospira interrogans</i>	NC_005823
	<i>Leptospira licerasiae</i>	EF612284
15	<i>Leptotrichia buccalis</i>	CP001685
	<i>Leptotrichia genomosp. C1</i>	AY278621
	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	ADAD01000110
	<i>Leptotrichia hofstadii</i>	ACVB02000032
	<i>Leptotrichia shahii</i>	AY029806
20	<i>Leptotrichia sp. paciente neutropénico</i>	AF189244
	<i>Leptotrichia sp. clon oral GT018</i>	AY349384
	<i>Leptotrichia sp. clon oral GT020</i>	AY349385
	<i>Leptotrichia sp. clon oral HE012</i>	AY349386
25	<i>Leptotrichia sp. clon oral IK040</i>	AY349387
	<i>Leptotrichia sp. clon oral P2PB_51 P1</i>	AY207053
	<i>Leptotrichia sp. taxón oral 223</i>	GU408547
	<i>Leuconostoc carnosum</i>	NR_040811
30	<i>Leuconostoc citreum</i>	AM157444
	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	FN822744

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Leuconostoc inhae</i>	NR_025204
	<i>Leuconostoc kimchii</i>	NR_075014
5	<i>Leuconostoc lactis</i>	NR_040823
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ACKV01000113
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	NR_040814
	<i>Listeria grayi</i>	ACCR02000003
	<i>Listeria innocua</i>	JF967625
10	<i>Listeria ivanovii</i>	X56151
	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP002003
	<i>Listeria welshimeri</i>	AM263198
	<i>Luteococcus sanguinis</i>	NR_025507
15	<i>Lutispora thermophila</i>	NR_041236
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	FN397522
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	NR_074883
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	NR_074941
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	ACZX01000102
20	<i>Marvinbryantia formatexigens</i>	AJ505973
	<i>Massilia sp. CCUG 43427A</i>	FR773700
	<i>Megamonas funiformis</i>	AB300988
	<i>Megamonas hypermegale</i>	AJ420107
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	AY038996
25	<i>Megasphaera genomsp. C1</i>	AY278622
	<i>Megasphaera genomsp. tipo_1</i>	ADGP01000010
	<i>Megasphaera micronuciformis</i>	AECS01000020
	<i>Megasphaera sp. BLPYG_07</i>	HM990964
	<i>Megasphaera sp. UPII 199_6</i>	AFIJ01000040
30	<i>Metallosphaera sedula</i>	D26491
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	NR_025028

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Methanobrevibacter acididurans</i>	NR_028779
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	NR_042783
5	<i>Methanobrevibacter curvatus</i>	NR_044796
	<i>Methanobrevibacter cuticularis</i>	NR_044776
	<i>Methanobrevibacter filiformis</i>	NR_044801
	<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	NR_044789
	<i>Methanobrevibacter millerae</i>	NR_042785
10	<i>Methanobrevibacter olleyae</i>	NR_043024
	<i>Methanobrevibacter oralis</i>	HE654003
	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	NR_042784
	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	ABYV02000002
	<i>Methanobrevibacter thaueri</i>	NR_044787
15	<i>Methanobrevibacter woesei</i>	NR_044788
	<i>Methanobrevibacter wolinii</i>	NR_044790
	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	AY196684
	<i>Methylobacterium extorquens</i>	NC_010172
20	<i>Methylobacterium podarium</i>	AY468363
	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	GU294320
	<i>Methylobacterium sp. 1sub</i>	AY468371
	<i>Methylobacterium sp. MM4</i>	AY468370
	<i>Methylocella silvestris</i>	NR_074237
25	<i>Methylophilus sp. ECd5</i>	AY436794
	<i>Microbacterium chocolatum</i>	NR_037045
	<i>Microbacterium flavescens</i>	EU714363
	<i>Microbacterium gubbeenense</i>	NR_025098
	<i>Microbacterium lacticum</i>	EU714351
30	<i>Microbacterium oleivorans</i>	EU714381
	<i>Microbacterium oxydans</i>	EU714348

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AJ491806
	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	EU714359
5	<i>Microbacterium schleiferi</i>	NR_044936
	<i>Microbacterium sp. 768</i>	EU714378
	<i>Microbacterium sp. cepa oral C24KA</i>	AF287752
	<i>Microbacterium testaceum</i>	EU714365
10	<i>Micrococcus antarcticus</i>	NR_025285
	<i>Micrococcus luteus</i>	NR_075062
	<i>Micrococcus lylae</i>	NR_026200
	<i>Micrococcus sp. 185</i>	EU714334
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	NC_010296
15	<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	NR_028840
	<i>Mitsuokella multacida</i>	ABWK02000005
	<i>Mitsuokella sp. taxón oral 521</i>	GU413658
	<i>Mitsuokella sp. taxón oral G68</i>	GU432166
	<i>Mobiluncus curtisii</i>	AEPZ01000013
20	<i>Mobiluncus mulieris</i>	ACKW01000035
	<i>Moellerella wisconsensis</i>	JN175344
	<i>Mogibacterium diversum</i>	NR_027191
	<i>Mogibacterium neglectum</i>	NR_027203
	<i>Mogibacterium pumilum</i>	NR_028608
25	<i>Mogibacterium timidum</i>	Z36296
	<i>Mollicutes bacterium pACH93</i>	AY297808
	<i>Moorella thermoacetica</i>	NR_075001
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	CP002005
	<i>Moraxella lincolnii</i>	FR822735
30	<i>Moraxella osloensis</i>	JN175341
	<i>Moraxella sp. 16285</i>	JF682466

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Moraxella sp. GM2</i>	JF837191
	<i>Morganella morganii</i>	AJ301681
5	<i>Morganella sp. JB_T16</i>	AJ781005
	<i>Morococcus cerebrosus</i>	JN175352
	<i>Moryella indoligenes</i>	AF527773
	<i>Mycobacterium abscessus</i>	AGQU01000002
10	<i>Mycobacterium africanum</i>	AF480605
	<i>Mycobacterium alsiensis</i>	AJ938169
	<i>Mycobacterium avium</i>	CP000479
	<i>Mycobacterium chelonae</i>	AB548610
	<i>Mycobacterium colombiense</i>	AM062764
15	<i>Mycobacterium elephantis</i>	AF385898
	<i>Mycobacterium gordonae</i>	GU142930
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	GQ153276
	<i>Mycobacterium kansasii</i>	AF480601
	<i>Mycobacterium lacus</i>	NR_025175
20	<i>Mycobacterium leprae</i>	FM211192
	<i>Mycobacterium lepromatosis</i>	EU203590
	<i>Mycobacterium mageritense</i>	FR798914
	<i>Mycobacterium mantenii</i>	FJ042897
	<i>Mycobacterium marinum</i>	NC_010612
25	<i>Mycobacterium microti</i>	NR_025234
	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	AF268445
	<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	ADNV01000350
	<i>Mycobacterium paraterrae</i>	EU919229
	<i>Mycobacterium phlei</i>	GU142920
30	<i>Mycobacterium seoulense</i>	DQ536403
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CP000480

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Mycobacterium sp. 1761</i>	EU703150
	<i>Mycobacterium sp. 1776</i>	EU703152
5	<i>Mycobacterium sp. 1781</i>	EU703147
	<i>Mycobacterium sp. 1791</i>	EU703148
	<i>Mycobacterium sp. 1797</i>	EU703149
	<i>Mycobacterium sp. AQ1GA4</i>	HM210417
	<i>Mycobacterium sp. B10_07.09.0206</i>	HQ174245
10	<i>Mycobacterium sp. GN_10546</i>	FJ497243
	<i>Mycobacterium sp. GN_10827</i>	FJ497247
	<i>Mycobacterium sp. GN_11124</i>	FJ652846
	<i>Mycobacterium sp. GN_9188</i>	FJ497240
15	<i>Mycobacterium sp. GR_2007_210</i>	FJ555538
	<i>Mycobacterium sp. HE5</i>	AJ012738
	<i>Mycobacterium sp. NLA001000736</i>	HM627011
	<i>Mycobacterium sp. W</i>	DQ437715
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CP001658
20	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	AB548725
	<i>Mycobacterium vulneris</i>	EU834055
	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	AF010477
	<i>Mycoplasma amphoriforme</i>	AY531656
	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	NC_011025
25	<i>Mycoplasma bovoculi</i>	NR_025987
	<i>Mycoplasma faucium</i>	NR_024983
	<i>Mycoplasma fermentans</i>	CP002458
	<i>Mycoplasma flocculare</i>	X62699
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	L43967
30	<i>Mycoplasma hominis</i>	AF443616
	<i>Mycoplasma orale</i>	AY796060

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	NR_025989
	<i>Mycoplasma penetrans</i>	NC_004432
5	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NC_000912
	<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	U26055
	<i>Mycoplasma salivarium</i>	M24661
	<i>Mycoplasmataceae genomosp. P1 clon oral MB1_G23</i>	DQ003614
10	<i>Myroides odoratimimus</i>	NR_042354
	<i>Myroides sp. MY15</i>	GU253339
	<i>Neisseria bacilliformis</i>	AFAY01000058
	<i>Neisseria cinerea</i>	ACDY01000037
15	<i>Neisseria elongata</i>	ADBF01000003
	<i>Neisseria flavescens</i>	ACQV01000025
	<i>Neisseria genomosp. P2 clon oral MB5_P15</i>	DQ003630
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CP002440
20	<i>Neisseria lactamica</i>	ACEQ01000095
	<i>Neisseria macacae</i>	AFQE01000146
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NC_003112
	<i>Neisseria mucosa</i>	ACDX01000110
	<i>Neisseria pharyngis</i>	AJ239281
25	<i>Neisseria polysaccharea</i>	ADBE01000137
	<i>Neisseria sicca</i>	ACKO02000016
	<i>Neisseria sp. KEM232</i>	GQ203291
	<i>Neisseria sp. clon oral AP132</i>	AY005027
	<i>Neisseria sp. clon oral JC012</i>	AY349388
30	<i>Neisseria sp. cepa oral B33KA</i>	AY005028
	<i>Neisseria sp. taxón oral 014</i>	ADEA01000039

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Neisseria sp. SMC_A9199</i>	FJ763637
	<i>Neisseria sp. TM10_1</i>	DQ279352
5	<i>Neisseria subflava</i>	ACEO01000067
	<i>Neorickettsia risticii</i>	CP001431
	<i>Neorickettsia sennetsu</i>	NC_007798
	<i>Nocardia brasiliensis</i>	AIHV01000038
10	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	HQ009486
	<i>Nocardia farcinica</i>	NC_006361
	<i>Nocardia puris</i>	NR_028994
	<i>Nocardia sp. 01_Je_025</i>	GU574059
	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	CP002041
15	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	AAAV03000008
	<i>Oceanobacillus caeni</i>	NR_041533
	<i>Oceanobacillus sp. Ndiop</i>	CAER01000083
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	NC_009667
	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	ACQA01000001
20	<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>	DQ365921
	<i>Odoribacter laneus</i>	AB490805
	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	CP002544
	<i>Okadaella gastrococcus</i>	HQ699465
25	<i>Oligella ureolytica</i>	NR_041998
	<i>Oligella urethralis</i>	NR_041753
	<i>Olsenella genomosp. C1</i>	AY278623
	<i>Olsenella profusa</i>	FN178466
	<i>Olsenella sp. F0004</i>	EU592964
30	<i>Olsenella sp. taxón oral 809</i>	ACVE01000002
	<i>Olsenella uli</i>	CP002106
	<i>Opitutus terrae</i>	NR_074978

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Oribacterium sinus</i>	ACKX01000142
	<i>Oribacterium sp. ACB1</i>	HM120210
5	<i>Oribacterium sp. ACB7</i>	HM120211
	<i>Oribacterium sp. CM12</i>	HQ616374
	<i>Oribacterium sp. ICM51</i>	HQ616397
	<i>Oribacterium sp. OBRC12</i>	HQ616355
	<i>Oribacterium sp. taxón oral 078</i>	ACIQ02000009
10	<i>Oribacterium sp. taxón oral 102</i>	GQ422713
	<i>Oribacterium sp. taxón oral 108</i>	AFIH01000001
	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	AP008981
	<i>Ornithinibacillus bavariensis</i>	NR_044923
15	<i>Ornithinibacillus sp. 7_10AIA</i>	FN397526
	<i>Oscillibacter sp. G2</i>	HM626173
	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	NR_074793
	<i>Oscillospira guilliermondii</i>	AB040495
	<i>Oxalobacter formigenes</i>	ACDQ01000020
20	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	NR_042272
	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	NR_042756
	<i>Paenibacillus chibensis</i>	NR_040885
	<i>Paenibacillus cookii</i>	NR_025372
	<i>Paenibacillus durus</i>	NR_037017
25	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	D78470
	<i>Paenibacillus lactis</i>	NR_025739
	<i>Paenibacillus lautus</i>	NR_040882
	<i>Paenibacillus pabuli</i>	NR_040853
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NR_037006
30	<i>Paenibacillus popilliae</i>	NR_040888
	<i>Paenibacillus sp. CIP 101062</i>	HM212646

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Paenibacillus</i> sp. HGF5	AEXS01000095
	<i>Paenibacillus</i> sp. HGF7	AFDH01000147
5	<i>Paenibacillus</i> sp. JC66	JF824808
	<i>Paenibacillus</i> sp. taxón oral F45	HM099647
	<i>Paenibacillus</i> sp. R_27413	HE586333
	<i>Paenibacillus</i> sp. R_27422	HE586338
	<i>Paenibacillus timonensis</i>	NR_042844
10	<i>Pantoea agglomerans</i>	AY335552
	<i>Pantoea ananatis</i>	CP001875
	<i>Pantoea brenneri</i>	EU216735
	<i>Pantoea citrea</i>	EF688008
	<i>Pantoea conspicua</i>	EU216737
15	<i>Pantoea septica</i>	EU216734
	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	NR_025025
	<i>Parabacteroides distasonis</i>	CP000140
	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	AY974070
20	<i>Parabacteroides gordonii</i>	AB470344
	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	ABYH01000014
	<i>Parabacteroides merdae</i>	EU136685
	<i>Parabacteroides</i> sp. D13	ACPW01000017
	<i>Parabacteroides</i> sp. NS31_3	JN029805
25	<i>Parachlamydia</i> sp. UWE25	BX908798
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	CP000490
	<i>Paracoccus marcusii</i>	NR_044922
	<i>Paraprevotella clara</i>	AFFY01000068
	<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	AFBR01000011
30	<i>Parascardovia denticolens</i>	ADEB01000020
	<i>Parasutterella excrementihominis</i>	AFBP01000029

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Parasutterella secunda</i>	AB491209
	<i>Parvimonas micra</i>	AB729072
5	<i>Parvimonas sp. taxón oral 110</i>	AFII01000002
	<i>Pasteurella bettyae</i>	L06088
	<i>Pasteurella dagmatis</i>	ACZR01000003
	<i>Pasteurella multocida</i>	NC_002663
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	ACXB01000026
10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	NR_075052
	<i>Peptococcus niger</i>	NR_029221
	<i>Peptococcus sp. clon oral JM048</i>	AY349389
	<i>Peptococcus sp. taxón oral 167</i>	GQ422727
	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	D14145
15	<i>Peptoniphilus duerdenii</i>	EU526290
	<i>Peptoniphilus harei</i>	NR_026358
	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	AY153431
	<i>Peptoniphilus ivorii</i>	Y07840
20	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	ADDO01000050
	<i>Peptoniphilus sp. gpac007</i>	AM176517
	<i>Peptoniphilus sp. gpac018A</i>	AM176519
	<i>Peptoniphilus sp. gpac077</i>	AM176527
	<i>Peptoniphilus sp. gpac148</i>	AM176535
25	<i>Peptoniphilus sp. JC140</i>	JF824803
	<i>Peptoniphilus sp. taxón oral 386</i>	ADCS01000031
	<i>Peptoniphilus sp. taxón oral 836</i>	AEAA01000090
	<i>Peptostreptococcaceae bacterium ph1</i>	JN837495
30	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	AY326462
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	AM176538

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Peptostreptococcus</i> sp. 9succ1	X90471
5	<i>Peptostreptococcus</i> sp. clon oral AP24	AB175072
	<i>Peptostreptococcus</i> sp. clon oral FJ023	AY349390
	<i>Peptostreptococcus</i> sp. P4P_31 P3	AY207059
	<i>Peptostreptococcus</i> stomatis	ADGQ01000048
10	<i>Phascolarctobacterium</i> faecium	NR_026111
	<i>Phascolarctobacterium</i> sp. YIT 12068	AB490812
	<i>Phascolarctobacterium</i> succinatutens	AB490811
15	<i>Phenylobacterium</i> zucineum	AY628697
	<i>Photorhabdus</i> asymbiotica	Z76752
	<i>Pigmentiphaga</i> daeguensis	JN585327
	<i>Planomicrobium</i> koreense	NR_025011
	<i>Plesiomonas</i> shigelloides	X60418
20	<i>Porphyromonadaceae</i> bacterium NML 060648	EF184292
	<i>Porphyromonas</i> asaccharolytica	AENO01000048
	<i>Porphyromonas</i> endodontalis	ACNN01000021
25	<i>Porphyromonas</i> gingivalis	AE015924
	<i>Porphyromonas</i> levii	NR_025907
	<i>Porphyromonas</i> macacae	NR_025908
	<i>Porphyromonas</i> somerae	AB547667
	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral BB134	AY005068
30	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral F016	AY005069
	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral P2PB_52 P1	AY207054

	UTO	Registro de acceso público DB
5	<i>Porphyromonas sp. clon oral</i> <i>P4GB_100 P2</i>	AY207057
	<i>Porphyromonas sp. UQD 301</i>	EU012301
	<i>Porphyromonas uenonis</i>	ACLR01000152
	<i>Prevotella albensis</i>	NR_025300
	<i>Prevotella amnii</i>	AB547670
10	<i>Prevotella bergensis</i>	ACKS01000100
	<i>Prevotella bivia</i>	ADFO01000096
	<i>Prevotella brevis</i>	NR_041954
	<i>Prevotella buccae</i>	ACRB01000001
	<i>Prevotella buccalis</i>	JN867261
15	<i>Prevotella copri</i>	ACBX02000014
	<i>Prevotella corporis</i>	L16465
	<i>Prevotella dentalis</i>	AB547678
	<i>Prevotella denticola</i>	CP002589
	<i>Prevotella disiens</i>	AEDO01000026
20	<i>Prevotella genomsp. C1</i>	AY278624
	<i>Prevotella genomsp. C2</i>	AY278625
	<i>Prevotella genomsp. P7 clon oral</i> <i>MB2_P31</i>	DQ003620
25	<i>Prevotella genomsp. P8 clon oral</i> <i>MB3_P13</i>	DQ003622
	<i>Prevotella genomsp. P9 clon oral</i> <i>MB7_G16</i>	DQ003633
	<i>Prevotella heparinolytica</i>	GQ422742
	<i>Prevotella histicola</i>	JN867315
30	<i>Prevotella intermedia</i>	AF414829
	<i>Prevotella loescheii</i>	JN867231

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Prevotella maculosa</i>	AGEK01000035
	<i>Prevotella marshii</i>	AEEI01000070
5	<i>Prevotella melaninogenica</i>	CP002122
	<i>Prevotella micans</i>	AGWK01000061
	<i>Prevotella multiformis</i>	AEWX01000054
	<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	AFJE01000016
	<i>Prevotella nanceiensis</i>	JN867228
10	<i>Prevotella nigrescens</i>	AFPX01000069
	<i>Prevotella oralis</i>	AEPE01000021
	<i>Prevotella oris</i>	ADDV01000091
	<i>Prevotella oulorum</i>	L16472
15	<i>Prevotella pallens</i>	AFPY01000135
	<i>Prevotella ruminicola</i>	CP002006
	<i>Prevotella salivae</i>	AB108826
	<i>Prevotella sp. BI_42</i>	AJ581354
	<i>Prevotella sp. CM38</i>	HQ610181
20	<i>Prevotella sp. ICM1</i>	HQ616385
	<i>Prevotella sp. ICM55</i>	HQ616399
	<i>Prevotella sp. JCM 6330</i>	AB547699
	<i>Prevotella sp. clon oral AA020</i>	AY005057
	<i>Prevotella sp. clon oral ASCG10</i>	AY923148
25	<i>Prevotella sp. clon oral ASCG12</i>	DQ272511
	<i>Prevotella sp. clon oral AU069</i>	AY005062
	<i>Prevotella sp. clon oral CY006</i>	AY005063
	<i>Prevotella sp. clon oral DA058</i>	AY005065
	<i>Prevotella sp. clon oral FL019</i>	AY349392
30	<i>Prevotella sp. clon oral FU048</i>	AY349393
	<i>Prevotella sp. clon oral FW035</i>	AY349394

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Prevotella sp. clon oral GI030</i>	AY349395
	<i>Prevotella sp. clon oral GI032</i>	AY349396
5	<i>Prevotella sp. clon oral GI059</i>	AY349397
	<i>Prevotella sp. clon oral GU027</i>	AY349398
	<i>Prevotella sp. clon oral HF050</i>	AY349399
	<i>Prevotella sp. clon oral ID019</i>	AY349400
10	<i>Prevotella sp. clon oral IDR_CEC_0055</i>	AY550997
	<i>Prevotella sp. clon oral IK053</i>	AY349401
	<i>Prevotella sp. clon oral IK062</i>	AY349402
	<i>Prevotella sp. clon oral P4PB_83 P2</i>	AY207050
15	<i>Prevotella sp. taxón oral 292</i>	GQ422735
	<i>Prevotella sp. taxón oral 299</i>	ACWZ01000026
	<i>Prevotella sp. taxón oral 300</i>	GU409549
	<i>Prevotella sp. taxón oral 302</i>	ACZK01000043
20	<i>Prevotella sp. taxón oral 310</i>	GQ422737
	<i>Prevotella sp. taxón oral 317</i>	ACQH01000158
	<i>Prevotella sp. taxón oral 472</i>	ACZS01000106
	<i>Prevotella sp. taxón oral 781</i>	GQ422744
	<i>Prevotella sp. taxón oral 782</i>	GQ422745
25	<i>Prevotella sp. taxón oral F68</i>	HM099652
	<i>Prevotella sp. taxón oral G60</i>	GU432133
	<i>Prevotella sp. taxón oral G70</i>	GU432179
	<i>Prevotella sp. taxón oral G71</i>	GU432180
	<i>Prevotella sp. SEQ053</i>	JN867222
30	<i>Prevotella sp. SEQ065</i>	JN867234
	<i>Prevotella sp. SEQ072</i>	JN867238

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Prevotella</i> sp. SEQ116	JN867246
	<i>Prevotella</i> sp. SG12	GU561343
5	<i>Prevotella</i> sp. sp24	AB003384
	<i>Prevotella</i> sp. sp34	AB003385
	<i>Prevotella</i> stercorea	AB244774
	<i>Prevotella</i> tanneriae	ACIJ02000018
	<i>Prevotella</i> timonensis	ADEF01000012
10	<i>Prevotella</i> veroralis	ACVA01000027
	<i>Prevotella</i> jejuni, <i>Prevotella</i> aurantiaca, <i>Prevotella</i> baroniae, <i>Prevotella</i> colorans, <i>Prevotella</i> corporis, <i>Prevotella</i> dentasini, <i>Prevotella</i> enoeca, <i>Prevotella</i> falsenii, <i>Prevotella</i> fusca, <i>Prevotella</i> heparinolytica, <i>Prevotella</i> loescheii, <i>Prevotella</i> multisaccharivorax, <i>Prevotella</i> nanceiensis, <i>Prevotella</i> oryzae, <i>Prevotella</i> paludivivens, <i>Prevotella</i> pleuritidis, <i>Prevotella</i> ruminicola, <i>Prevotella</i> saccharolytica, <i>Prevotella</i> scopos, <i>Prevotella</i> shahii, <i>Prevotella</i> zoogloformans	
	<i>Prevotellaceae</i> bacterium P4P_62 P1	AY207061
	<i>Prochlorococcus</i> marinus	CP000551
	<i>Propionibacteriaceae</i> bacterium NML	
30	02_0265	EF599122
	<i>Propionibacterium</i> acidipropionici	NC_019395

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Propionibacterium acnes</i>
	ADJM01000010
	<i>Propionibacterium avidum</i>
5	AJ003055
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	NR_036972
	<i>Propionibacterium granulosum</i>
	FJ785716
	<i>Propionibacterium jensenii</i>
	NR_042269
	<i>Propionibacterium propionicum</i>
	NR_025277
10	<i>Propionibacterium sp. 434_HC2</i>
	AFIL01000035
	<i>Propionibacterium sp. H456</i>
	AB177643
	<i>Propionibacterium sp. LG</i>
	AY354921
	<i>Propionibacterium sp. taxón oral 192</i>
	GQ422728
15	<i>Propionibacterium sp. S555a</i>
	AB264622
	<i>Propionibacterium thoenii</i>
	NR_042270
	<i>Proteus mirabilis</i>
	ACLE01000013
	<i>Proteus penneri</i>
	ABVP01000020
	<i>Proteus sp. HS7514</i>
	DQ512963
20	<i>Proteus vulgaris</i>
	AJ233425
	<i>Providencia alcalifaciens</i>
	ABXW01000071
	<i>Providencia rettgeri</i>
	AM040492
	<i>Providencia rustigianii</i>
	AM040489
	<i>Providencia stuartii</i>
25	AF008581
	<i>Pseudoclavibacter sp. Timone</i>
	FJ375951
	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>
	AY136666
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	AABQ07000001
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	AY622220
	<i>Pseudomonas gessardii</i>
30	FJ943496
	<i>Pseudomonas mendocina</i>
	AAUL01000021
	<i>Pseudomonas monteilii</i>
	NR_024910

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Pseudomonas poae</i>	GU188951
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000
5	<i>Pseudomonas putida</i>	AF094741
	<i>Pseudomonas sp. 2_1_26</i>	ACWU01000257
	<i>Pseudomonas sp. G1229</i>	DQ910482
	<i>Pseudomonas sp. NP522b</i>	EU723211
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AM905854
10	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	AF320988
	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	NR_042764
	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	AB036759
	<i>Psychrobacter arcticus</i>	CP000082
	<i>Psychrobacter cibarius</i>	HQ698586
15	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	CP000323
	<i>Psychrobacter faecalis</i>	HQ698566
	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	HQ698587
	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	HQ698582
20	<i>Psychrobacter sp. 13983</i>	HM212668
	<i>Pyramidobacter piscicolens</i>	AY207056
	<i>Ralstonia pickettii</i>	NC_010682
	<i>Ralstonia sp. 5_7_47FAA</i>	ACUF01000076
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	AB364958
25	<i>Raoultella planticola</i>	AF129443
	<i>Raoultella terrigena</i>	NR_037085
	<i>Rhodobacter sp. taxón oral C30</i>	HM099648
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CP000144
	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	X80615
30	<i>Rhodococcus equi</i>	ADNW01000058
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ACNO01000030

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Rhodococcus fascians</i>
	NR_037021
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
5	CP000301
	<i>Rickettsia akari</i>
	CP000847
	<i>Rickettsia conorii</i>
	AE008647
	<i>Rickettsia prowazekii</i>
	M21789
	<i>Rickettsia rickettsii</i>
	NC_010263
	<i>Rickettsia slovaca</i>
10	L36224
	<i>Rickettsia typhi</i>
	AE017197
	<i>Robinsoniella peoriensis</i>
	AF445258
	<i>Roseburia cecicola</i>
	GU233441
	<i>Roseburia faecalis</i>
	AY804149
15	<i>Roseburia faecis</i>
	AY305310
	<i>Roseburia hominis</i>
	AJ270482
	<i>Roseburia intestinalis</i>
	FP929050
	<i>Roseburia inulinivorans</i>
	AJ270473
	<i>Roseburia sp. 11SE37</i>
	FM954975
20	<i>Roseburia sp. 11SE38</i>
	FM954976
	<i>Roseiflexus castenholzii</i>
	CP000804
	<i>Roseomonas cervicalis</i>
	ADVL01000363
	<i>Roseomonas mucosa</i>
	NR_028857
	<i>Roseomonas sp. NML94_0193</i>
	AF533357
25	<i>Roseomonas sp. NML97_0121</i>
	AF533359
	<i>Roseomonas sp. NML98_0009</i>
	AF533358
	<i>Roseomonas sp. NML98_0157</i>
	AF533360
	<i>Rothia aerea</i>
	DQ673320
	<i>Rothia dentocariosa</i>
	ADDW01000024
30	<i>Rothia mucilaginoso</i>
	ACVO01000020
	<i>Rothia nasimurium</i>
	NR_025310

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Rothia sp. taxón oral 188</i>	GU470892
	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	NR_026450
5	<i>Ruminococcaceae bacterium D16</i>	ADDX01000083
	<i>Ruminococcus albus</i>	AY445600
	<i>Ruminococcus bromii</i>	EU266549
	<i>Ruminococcus callidus</i>	NR_029160
	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	FP929052
10	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	NR_025931
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	X94967
	<i>Ruminococcus hansenii</i>	M59114
	<i>Ruminococcus lactaris</i>	ABOU02000049
	<i>Ruminococcus obeum</i>	AY169419
15	<i>Ruminococcus sp. 18P13</i>	AJ515913
	<i>Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA</i>	ACII01000172
	<i>Ruminococcus sp. 9SE51</i>	FM954974
	<i>Ruminococcus sp. ID8</i>	AY960564
20	<i>Ruminococcus sp. K_1</i>	AB222208
	<i>Ruminococcus torques</i>	AAVP02000002
	<i>Saccharomonospora viridis</i>	X54286
	<i>Salmonella bongori</i>	NR_041699
	<i>Salmonella enterica</i>	NC_011149
25	<i>Salmonella enterica</i>	NC_011205
	<i>Salmonella enterica</i>	DQ344532
	<i>Salmonella enterica</i>	ABEH02000004
	<i>Salmonella enterica</i>	ABAK02000001
	<i>Salmonella enterica</i>	NC_011080
30	<i>Salmonella enterica</i>	EU118094
	<i>Salmonella enterica</i>	NC_011094

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Salmonella enterica</i>	AE014613
	<i>Salmonella enterica</i>	ABFH02000001
5	<i>Salmonella enterica</i>	ABEM01000001
	<i>Salmonella enterica</i>	ABAM02000001
	<i>Salmonella typhimurium</i>	DQ344533
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF170176
10	<i>Sarcina ventriculi</i>	NR_026146
	<i>Scardovia inopinata</i>	AB029087
	<i>Scardovia wiggisiae</i>	AY278626
	<i>Segniliparus rotundus</i>	CP001958
	<i>Segniliparus rugosus</i>	ACZI01000025
15	<i>Selenomonas artemidis</i>	HM596274
	<i>Selenomonas diana</i>	GQ422719
	<i>Selenomonas flueggei</i>	AF287803
	<i>Selenomonas genomsp. C1</i>	AY278627
	<i>Selenomonas genomsp. C2</i>	AY278628
20	<i>Selenomonas genomsp. P5</i>	AY341820
	<i>Selenomonas genomsp. P6 clon oral MB3_C41</i>	DQ003636
	<i>Selenomonas genomsp. P7 clon oral MB5_C08</i>	DQ003627
25	<i>Selenomonas genomsp. P8 clon oral MB5_P06</i>	DQ003628
	<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802
	<i>Selenomonas noxia</i>	GU470909
	<i>Selenomonas ruminantium</i>	NR_075026
30	<i>Selenomonas sp. FOBRC9</i>	HQ616378
	<i>Selenomonas sp. clon oral FT050</i>	AY349403

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Selenomonas sp. clon oral GI064</i>	AY349404
	<i>Selenomonas sp. clon oral GT010</i>	AY349405
5	<i>Selenomonas sp. clon oral HU051</i>	AY349406
	<i>Selenomonas sp. clon oral IK004</i>	AY349407
	<i>Selenomonas sp. clon oral IQ048</i>	AY349408
	<i>Selenomonas sp. clon oral JI021</i>	AY349409
10	<i>Selenomonas sp. clon oral JS031</i>	AY349410
	<i>Selenomonas sp. clon oral OH4A</i>	AY947498
	<i>Selenomonas sp. clon oral P2PA_80 P4</i>	AY207052
	<i>Selenomonas sp. taxón oral 137</i>	AENV01000007
15	<i>Selenomonas sp. taxón oral 149</i>	AEEJ01000007
	<i>Selenomonas sputigena</i>	ACKP02000033
	<i>Serratia fonticola</i>	NR_025339
	<i>Serratia liquefaciens</i>	NR_042062
	<i>Serratia marcescens</i>	GU826157
20	<i>Serratia odorifera</i>	ADBY01000001
	<i>Serratia proteamaculans</i>	AAUN01000015
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	CP002457
	<i>Shigella boydii</i>	AAKA01000007
	<i>Shigella dysenteriae</i>	NC_007606
25	<i>Shigella flexneri</i>	AE005674
	<i>Shigella sonnei</i>	NC_007384
	<i>Shuttleworthia satellites</i>	ACIP02000004
	<i>Shuttleworthia sp. MSX8B</i>	HQ616383
	<i>Shuttleworthia sp. taxón oral G69</i>	GU432167
30	<i>Simonsiella muelleri</i>	ADCY01000105
	<i>Slackia equolifaciens</i>	EU377663

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Slackia exigua</i>
	<i>Slackia faecicanis</i>
5	<i>Slackia heliotrinireducens</i>
	<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>
	<i>Slackia piriformis</i>
	<i>Slackia</i> sp. NATTS
	<i>Solobacterium moorei</i>
10	<i>Sphingobacterium faecium</i>
	<i>Sphingobacterium mizutaii</i>
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>
15	<i>Sphingomonas echinoides</i>
	<i>Sphingomonas</i> sp. clon oral FI012
	<i>Sphingomonas</i> sp. clon oral FZ016
	<i>Sphingomonas</i> sp. taxón oral A09
	<i>Sphingomonas</i> sp. taxón oral F71
20	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>
	<i>Spiroplasma insolitum</i>
	<i>Sporobacter termitidis</i>
	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>
25	<i>Sporosarcina newyorkensis</i>
	<i>Sporosarcina</i> sp. 2681
	<i>Staphylococcaceae bacterium NML 92_0017</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
30	<i>Staphylococcus auricularis</i>
	<i>Staphylococcus capitis</i>

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Staphylococcus caprae</i>	ACRH01000033
	<i>Staphylococcus carnosus</i>	NR_075003
5	<i>Staphylococcus cohnii</i>	JN175375
	<i>Staphylococcus condimenti</i>	NR_029345
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ACHE01000056
	<i>Staphylococcus equorum</i>	NR_027520
	<i>Staphylococcus fleurettii</i>	NR_041326
10	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	NC_007168
	<i>Staphylococcus hominis</i>	AM157418
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	AEQA01000024
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	FJ189773
15	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	CP002439
	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	NR_029158
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	NC_007350
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	NR_025520
	<i>Staphylococcus sp. clone bottae7</i>	AF467424
20	<i>Staphylococcus sp. H292</i>	AB177642
	<i>Staphylococcus sp. H780</i>	AB177644
	<i>Staphylococcus succinus</i>	NR_028667
	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	NR_024670
	<i>Staphylococcus warneri</i>	ACPZ01000009
25	<i>Staphylococcus xylosus</i>	AY395016
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AAVZ01000005
	<i>Stenotrophomonas sp. FG_6</i>	EF017810
	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	NR_027615
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	AAJO01000130
30	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	NR_041781
	<i>Streptococcus anginosus</i>	AECT01000011

UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Streptococcus australis</i>
	<i>Streptococcus bovis</i>
5	<i>Streptococcus canis</i>
	<i>Streptococcus constellatus</i>
	<i>Streptococcus cristatus</i>
	<i>Streptococcus downei</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
10	<i>Streptococcus equi</i>
	<i>Streptococcus equinus</i>
	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
	<i>Streptococcus genomsp. C1</i>
15	<i>Streptococcus genomsp. C2</i>
	<i>Streptococcus genomsp. C3</i>
	<i>Streptococcus genomsp. C4</i>
	<i>Streptococcus genomsp. C5</i>
	<i>Streptococcus genomsp. C6</i>
20	<i>Streptococcus genomsp. C7</i>
	<i>Streptococcus genomsp. C8</i>
	<i>Streptococcus gordonii</i>
	<i>Streptococcus infantarius</i>
	<i>Streptococcus infantis</i>
25	<i>Streptococcus intermedius</i>
	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
	<i>Streptococcus massiliensis</i>
	<i>Streptococcus milleri</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>
30	<i>Streptococcus mutans</i>
	<i>Streptococcus oligofermentans</i>

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Streptococcus oralis</i>	ADMV01000001
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	AEKM01000012
5	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	AP012054
	<i>Streptococcus peroris</i>	AEVF01000016
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AE008537
	<i>Streptococcus porcinus</i>	EF121439
	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	FJ827123
10	<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	AENS01000003
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AE006496
	<i>Streptococcus rattii</i>	X58304
	<i>Streptococcus salivarius</i>	AGBV01000001
15	<i>Streptococcus sanguinis</i>	NR_074974
	<i>Streptococcus sinensis</i>	AF432857
	<i>Streptococcus sp. 16362</i>	JN590019
	<i>Streptococcus sp. 2_1_36FAA</i>	ACOI01000028
	<i>Streptococcus sp. 2285_97</i>	AJ131965
20	<i>Streptococcus sp. 69130</i>	X78825
	<i>Streptococcus sp. AC15</i>	HQ616356
	<i>Streptococcus sp. ACS2</i>	HQ616360
	<i>Streptococcus sp. AS20</i>	HQ616366
	<i>Streptococcus sp. BS35a</i>	HQ616369
25	<i>Streptococcus sp. C150</i>	ACRI01000045
	<i>Streptococcus sp. CM6</i>	HQ616372
	<i>Streptococcus sp. CM7</i>	HQ616373
	<i>Streptococcus sp. ICM10</i>	HQ616389
	<i>Streptococcus sp. ICM12</i>	HQ616390
30	<i>Streptococcus sp. ICM2</i>	HQ616386
	<i>Streptococcus sp. ICM4</i>	HQ616387

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Streptococcus sp. ICM45</i>	HQ616394
	<i>Streptococcus sp. M143</i>	ACRK01000025
5	<i>Streptococcus sp. M334</i>	ACRL01000052
	<i>Streptococcus sp. OBRC6</i>	HQ616352
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASB02</i>	AY923121
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCA03</i>	DQ272504
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCA04</i>	AY923116
10	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCA09</i>	AY923119
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCB04</i>	AY923123
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCB06</i>	AY923124
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCC04</i>	AY923127
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCC05</i>	AY923128
15	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCC12</i>	DQ272507
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCD01</i>	AY923129
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCD09</i>	AY923130
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCD10</i>	DQ272509
20	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE03</i>	AY923134
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE04</i>	AY953253
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE05</i>	DQ272510
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE06</i>	AY923135
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE09</i>	AY923136
25	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE10</i>	AY923137
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE12</i>	AY923138
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCF05</i>	AY923140
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCF07</i>	AY953255
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCF09</i>	AY923142
30	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCG04</i>	AY923145
	<i>Streptococcus sp. clon oral BW009</i>	AY005042

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Streptococcus sp. clon oral CH016</i>	AY005044
	<i>Streptococcus sp. clon oral GK051</i>	AY349413
5	<i>Streptococcus sp. clon oral GM006</i>	AY349414
	<i>Streptococcus sp. clon oral P2PA_41 P2</i>	AY207051
	<i>Streptococcus sp. clon oral P4PA_30 P4</i>	AY207064
10	<i>Streptococcus sp. taxón oral 071</i>	AEEP01000019
	<i>Streptococcus sp. taxón oral G59</i>	GU432132
	<i>Streptococcus sp. taxón oral G62</i>	GU432146
	<i>Streptococcus sp. taxón oral G63</i>	GU432150
	<i>Streptococcus sp. SHV515</i>	Y07601
15	<i>Streptococcus suis</i>	FM252032
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CP000419
	<i>Streptococcus uberis</i>	HQ391900
	<i>Streptococcus urinalis</i>	DQ303194
20	<i>Streptococcus vestibularis</i>	AEKO01000008
	<i>Streptococcus viridans</i>	AF076036
	<i>Streptomyces albus</i>	AJ697941
	<i>Streptomyces griseus</i>	NR_074787
	<i>Streptomyces sp. 1 AIP_2009</i>	FJ176782
25	<i>Streptomyces sp. SD 511</i>	EU544231
	<i>Streptomyces sp. SD 524</i>	EU544234
	<i>Streptomyces sp. SD 528</i>	EU544233
	<i>Streptomyces sp. SD 534</i>	EU544232
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	NR_027616
30	<i>Subdoligranulum variabile</i>	AJ518869
	<i>Succinatimonas hippei</i>	AEVO01000027

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Sutterella morbirenis</i>	AJ832129
	<i>Sutterella parvirubra</i>	AB300989
5	<i>Sutterella sanguinus</i>	AJ748647
	<i>Sutterella sp. YIT 12072</i>	AB491210
	<i>Sutterella stercoricanis</i>	NR_025600
	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	ADMF01000048
	<i>Synergistes genomsp. C1</i>	AY278615
10	<i>Synergistes sp. RMA 14551</i>	DQ412722
	<i>Synergistetes bacterium ADV897</i>	GQ258968
	<i>Synergistetes bacterium LBVCM1157</i>	GQ258969
	<i>Synergistetes bacterium taxón oral 362</i>	GU410752
15	<i>Synergistetes bacterium taxón oral D48</i>	GU430992
	<i>Syntrophococcus sucromutans</i>	NR_036869
	<i>Syntrophomonadaceae genomsp. P1</i>	AY341821
20	<i>Tannerella forsythia</i>	CP003191
	<i>Tannerella sp. 6_1_58FAA_CT1</i>	ACWX01000068
	<i>Tatlockia micdadei</i>	M36032
	<i>Tatumella ptyseos</i>	NR_025342
	<i>Tessaracoccus sp. taxón oral F04</i>	HM099640
25	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	NR_075020
	<i>Tetragenococcus koreensis</i>	NR_043113
	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	CP000924
	<i>Thermobifida fusca</i>	NC_007333
30	<i>Thermofilum pendens</i>	X14835
	<i>Thermus aquaticus</i>	NR_025900

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860
	<i>Trabulsiella guamensis</i>	AY373830
5	<i>Treponema denticola</i>	ADEC01000002
	<i>Treponema genomsp. P1</i>	AY341822
	<i>Treponema genomsp. P4 clon oral MB2_G19</i>	DQ003618
10	<i>Treponema genomsp. P5 clon oral MB3_P23</i>	DQ003624
	<i>Treponema genomsp. P6 clon oral MB4_G11</i>	DQ003625
	<i>Treponema lecithinolyticum</i>	NR_026247
15	<i>Treponema pallidum</i>	CP001752
	<i>Treponema parvum</i>	AF302937
	<i>Treponema phagedenis</i>	AEFH01000172
	<i>Treponema putidum</i>	AJ543428
	<i>Treponema refringens</i>	AF426101
20	<i>Treponema socranskii</i>	NR_024868
	<i>Treponema sp. 6:H:D15A_4</i>	AY005083
	<i>Treponema sp. clon DDKL_4</i>	Y08894
	<i>Treponema sp. clon oral JU025</i>	AY349417
	<i>Treponema sp. clon oral JU031</i>	AY349416
25	<i>Treponema sp. clon oral P2PB_53 P3</i>	AY207055
	<i>Treponema sp. taxón oral 228</i>	GU408580
	<i>Treponema sp. taxón oral 230</i>	GU408603
	<i>Treponema sp. taxón oral 231</i>	GU408631
	<i>Treponema sp. taxón oral 232</i>	GU408646
30	<i>Treponema sp. taxón oral 235</i>	GU408673
	<i>Treponema sp. taxón oral 239</i>	GU408738

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Treponema sp. taxón oral 247</i>	GU408748
	<i>Treponema sp. taxón oral 250</i>	GU408776
5	<i>Treponema sp. taxón oral 251</i>	GU408781
	<i>Treponema sp. taxón oral 254</i>	GU408803
	<i>Treponema sp. taxón oral 265</i>	GU408850
	<i>Treponema sp. taxón oral 270</i>	GQ422733
	<i>Treponema sp. taxón oral 271</i>	GU408871
10	<i>Treponema sp. taxón oral 508</i>	GU413616
	<i>Treponema sp. taxón oral 518</i>	GU413640
	<i>Treponema sp. taxón oral G85</i>	GU432215
	<i>Treponema sp. de la pododermatitis ovina</i>	AJ010951
15	<i>Treponema vincentii</i>	ACYH01000036
	<i>Tropheryma whipplei</i>	BX251412
	<i>Trueperella pyogenes</i>	NR_044858
	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	X80628
20	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	AB478958
	<i>Turicibacter sanguinis</i>	AF349724
	<i>Ureaplasma parvum</i>	AE002127
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	AAYN01000002
	<i>Ureibacillus composti</i>	NR_043746
25	<i>Ureibacillus suwonensis</i>	NR_043232
	<i>Ureibacillus terrenus</i>	NR_025394
	<i>Ureibacillus thermophilus</i>	NR_043747
	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	NR_040961
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	NR_026489
30	<i>Veillonella atypica</i>	AEDS01000059
	<i>Veillonella dispar</i>	ACIK02000021

	UTO	Registro de acceso público DB
5	<i>Veillonella genomosp. P1 clon oral MB5_P17</i>	DQ003631
	<i>Veillonella montpellierensis</i>	AF473836
	<i>Veillonella parvula</i>	ADFU01000009
	<i>Veillonella sp. 3_1_44</i>	ADCV01000019
	<i>Veillonella sp. 6_1_27</i>	ADCW01000016
10	<i>Veillonella sp. ACP1</i>	HQ616359
	<i>Veillonella sp. AS16</i>	HQ616365
	<i>Veillonella sp. BS32b</i>	HQ616368
	<i>Veillonella sp. ICM51a</i>	HQ616396
	<i>Veillonella sp. MSA12</i>	HQ616381
15	<i>Veillonella sp. NVG 100cf</i>	EF108443
	<i>Veillonella sp. OK11</i>	JN695650
	<i>Veillonella sp. clon oral ASCA08</i>	AY923118
	<i>Veillonella sp. clon oral ASCB03</i>	AY923122
	<i>Veillonella sp. clon oral ASCG01</i>	AY923144
20	<i>Veillonella sp. clon oral ASCG02</i>	AY953257
	<i>Veillonella sp. clon oral OH1A</i>	AY947495
	<i>Veillonella sp. taxón oral 158</i>	AENU01000007
	<i>Veillonellaceae bacterium taxón oral 131</i>	GU402916
25	<i>Veillonellaceae bacterium taxón oral 155</i>	GU470897
	<i>Vibrio cholerae</i>	AAUR01000095
	<i>Vibrio fluvialis</i>	X76335
	<i>Vibrio furnissii</i>	CP002377
30	<i>Vibrio mimicus</i>	ADAF01000001
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AAWQ01000116

	UTO	Registro de acceso público DB
	<i>Vibrio sp. RC341</i>	ACZT01000024
	<i>Vibrio vulnificus</i>	AE016796
5	<i>Victivallaceae bacterium NML 080035</i>	FJ394915
	<i>Victivallis vadensis</i>	ABDE02000010
	<i>Virgibacillus proomii</i>	NR_025308
	<i>Weissella beninensis</i>	EU439435
10	<i>Weissella cibaria</i>	NR_036924
	<i>Weissella confusa</i>	NR_040816
	<i>Weissella hellenica</i>	AB680902
	<i>Weissella kandleri</i>	NR_044659
15	<i>Weissella koreensis</i>	NR_075058
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	ACKU01000017
	<i>Weissella sp. KLDS 7.0701</i>	EU600924
	<i>Wolinella succinogenes</i>	BX571657
20	<i>Xanthomonadaceae bacterium NML 03_0222</i>	EU313791
	<i>Xanthomonas campestris</i>	EF101975
	<i>Xanthomonas sp. kmd_489</i>	EU723184
	<i>Xenophilus aerolatus</i>	JN585329
	<i>Yersinia aldovae</i>	AJ871363
25	<i>Yersinia aleksiciae</i>	AJ627597
	<i>Yersinia bercovieri</i>	AF366377
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	FR729477
	<i>Yersinia frederiksenii</i>	AF366379
	<i>Yersinia intermedia</i>	AF366380
30	<i>Yersinia kristensenii</i>	ACCA01000078
	<i>Yersinia mollaretii</i>	NR_027546

UTO	Registro de acceso público DB
<i>Yersinia pestis</i>	AE013632
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NC_009708
<i>Yersinia rohdei</i>	ACCD01000071
<i>Yokenella regensburgei</i>	AB273739
<i>Zimmermannella bifida</i>	AB012592
<i>Zymomonas mobilis</i>	NR_074274

Tabla 2: Bacterias oncofílicas ilustrativas

10	Géneros	Especie	Asociación con tumor
	<i>Mycoplasma</i>	<i>hyorhinis</i>	Carcinoma gástrico
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Acnes</i>	Cáncer de próstata
	<i>Mycoplasma</i>	<i>genitalium</i>	Cáncer de próstata
15	<i>Methylophilus</i>	<i>sp.</i>	Cáncer de próstata
	<i>Clamidia</i>	<i>trachomatis</i>	Cáncer de próstata
	<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>	MALT gástrico
	<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i>	Cáncer renal
20	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	Linfoma y leucemia
	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	Linfoma y leucemia
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Cáncer de mama
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Cáncer de mama
25	<i>Methylobacterium</i>	<i>radiotolerans</i>	Cáncer de mama
	<i>Shingomonas</i>	<i>yanoikuyae</i>	Cáncer de mama
	<i>Fusobacterium</i>	<i>sp</i>	Cáncer de laringe
	<i>Provetelis</i>	<i>sp</i>	Cáncer de laringe
30	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	Cáncer de laringe
	<i>Gemella</i>	<i>sp</i>	Cáncer de laringe

	Géneros	Especie	Asociación con tumor
	<i>Bordetella</i>	<i>Tosferina</i>	Cáncer de laringe
5	<i>Cornebacterium</i>	<i>tuberculo-steraricum</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	Carcinoma de células escamosas oral
10	<i>Exiguobacterium</i>	<i>oxidotolerans</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Fusobacterium</i>	<i>naviforme</i>	Carcinoma de células escamosas oral
15	<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	Carcinoma de células escamosas oral
20	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>veillonella</i>	<i>dispar</i>	Carcinoma de células escamosas oral
25	<i>Pepto-streptococcus</i>	<i>stomatis</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Gemella</i>	<i>Haemolysans</i>	Carcinoma de células escamosas oral
30	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	Carcinoma de células escamosas oral

	Géneros	Especie	Asociación con tumor
	<i>Johnsonella</i>	<i>ignava</i>	Carcinoma de células escamosas oral
5	<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguins</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	Carcinoma de células escamosas oral
	<i>Mycobacteria</i>	<i>marinum</i>	infección pulmonar
10	<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>	Esófago de Barrett
	<i>Campylobacter</i>	<i>rectus</i>	Esófago de Barrett
	<i>Oribacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Catonella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
15	<i>Pepto-streptococcus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Eubacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Dialister</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
20	<i>Veillonella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Anaeroglobus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Megasphaera</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Atopphium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
25	<i>Solobacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Rothia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Actinomyces</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Fusobacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
30	<i>Sneathia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Leptotrichia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico

	Géneros	Especie	Asociación con tumor
	<i>Prevotella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Porphyromonas</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
5	<i>Campylobacter</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Haemophilus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Neisseria</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>TM7</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
10	<i>Granulicatella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Variovorax</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma del peritoneo
	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	Pseudomixoma del peritoneo
15	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma del peritoneo
	<i>Tessaracoccus</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma del peritoneo
20	<i>Acinetobacter</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma del peritoneo
	<i>Helicobacter</i>	<i>hepaticus</i>	Cáncer de mama
	<i>Clamidia</i>	<i>psittaci</i>	Linfoma MALT
25	<i>Borrelia</i>	<i>burgdorferi</i>	Linfoma de linfocitos B cutáneo
	<i>Escherichia</i>	<i>Coli NC101</i>	Cáncer colorrectal
	<i>Salmonella</i>	<i>typhimurium</i>	Herramienta
	<i>Eterococcus</i>	<i>faecalis</i>	sangre
30	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	sangre
	<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>	sangre

Géneros	Especie	Asociación con tumor
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	sangre
<i>Streptococcus</i>	<i>salvarius</i>	sangre
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	sangre
<i>Streptococcus</i>	<i>gallolyticus</i>	Cáncer colorrectal
<i>Campylobacter</i>	<i>showae CC57C</i>	Cáncer colorrectal
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp</i>	Cáncer colorrectal

En algunos ejemplos, las VE descritas en el presente documento se obtienen a partir de bacterias anaerobias obligadas. Los ejemplos de bacterias anaerobias obligadas incluyen bacilos gram negativos (incluidos los géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila* y *Sutterella spp.*), cocos gram positivos (principalmente *Peptostreptococcus spp.*), gram positivos formadores de esporas (*Clostridium spp.*), bacilos no formadores de esporas (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium spp.*), y cocos gram negativos (principalmente *Veillonella spp.*). En algunas realizaciones, las bacterias anaerobias obligadas son de un género seleccionado de *Agathobaculum*, *Atopobium*, *Blautia*, *Burkholderia*, *Dielma*, *Longicatena*, *Paraclostridium*, *Turicibacter*, y *Tyzzerella*.

En algunas realizaciones, las VE descritas en el presente documento se obtienen a partir de una bacteria de un género seleccionado de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Shigella*, y *Staphylococcus*.

En algunas realizaciones, las bacterias y/o las VE descritas en el presente documento son de una especie seleccionada de *Blautia massiliensis*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Dielma fastidiosa*, *Longicatena caecimuris*, *Veillonella tobetsuensis*.

En algunas realizaciones, las bacterias o VE descritas en el presente documento se modifican de forma que comprenden, están vinculadas, y/o se unan mediante un resto terapéutico. En algunas realizaciones, el resto terapéutico es un resto específico del cáncer. En algunas realizaciones, el resto específico del cáncer tiene especificidad de unión por una célula cancerosa (por ejemplo, tiene especificidad de unión por un antígeno específico de cáncer). En algunas realizaciones, el resto específico de cáncer comprende un anticuerpo o fracción de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el resto específico de cáncer comprende un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el resto específico de cáncer comprende un ligando de un receptor expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o un fragmento de unión al receptor del mismo. En algunas realizaciones, el resto específico de cáncer es una proteína de fusión bipartita que también tiene dos partes: una primera parte que se une y/o está unida a la bacteria y una segunda parte que es capaz de unirse a una célula cancerosa (por ejemplo, por tener especificidad de unión por un antígeno específico del cáncer). En algunas realizaciones, la primera parte es un fragmento de o un peptidoglicano de longitud completa de una proteína de reconocimiento, tal como PGRP. En algunas realizaciones, la primera parte tiene una especificidad de unión por la VE (por ejemplo, por tener especificidad de unión por un antígeno bacteriano). En algunas realizaciones, la primera y/o segunda parte comprende un anticuerpo o fracción de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda parte comprende un receptor de linfocitos T o un receptor de

antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la primera y/o segunda parte comprende un ligando de un receptor expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o un fragmento de unión al receptor del mismo. En determinadas realizaciones, la administración simultánea del resto específico de cáncer con las VE (tanto en combinación como en administraciones independientes) aumenta el direccionamiento de las VE a las células cancerosas.

En algunas realizaciones, las VE descritas en el presente documento se modifican de forma que comprenden, están vinculadas, y/o están unidas mediante un resto magnético y/o paramagnético (por ejemplo, una perla magnética). En algunas realizaciones, el resto magnético y/o paramagnético está comprendido y/o directamente unido a la bacteria. En algunas realizaciones, el resto magnético y/o paramagnético está unido y/o forma parte de un resto de unión a VE que se une a la VE. En algunas realizaciones, el resto de unión a VE es un fragmento de o un peptidoglicano de longitud completa de una proteína de reconocimiento, tal como PGRP. En algunas realizaciones, el resto de unión a VE tiene una especificidad de unión por la VE (por ejemplo, por tener especificidad de unión por un antígeno bacteriano). En algunas realizaciones, el resto de unión a VE comprende un anticuerpo o fracción de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el resto de unión a VE comprende un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el resto de unión a VE comprende un ligando de un receptor expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o un fragmento de unión al receptor del mismo. En determinadas realizaciones, la administración simultánea del resto

magnético y/o paramagnético junto con las VE (tanto conjuntamente como en administraciones independientes) se puede usar para aumentar el direccionamiento de las VE a las células cancerosas o a un sujeto donde están presentes las células cancerosas.

Producción de las VE

En determinados aspectos, las VE descritas en el presente documento se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la materia.

En algunas realizaciones, las VE se preparan sin una etapa de purificación de las VE. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las bacterias que comprenden las VE descritas en el presente documento se destruyen usando un método que deje las VE bacterianas intactas y los componentes bacterianos resultantes, incluyendo las VE, se utilizadas en los métodos y composiciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, las bacterias se destruyen con un antibiótico (por ejemplo, usando un antibiótico descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, las bacterias se destruyen mediante irradiación UV.

En algunas realizaciones, las VE descritas en el presente documento se purifican a partir de uno o más componentes bacterianos adicionales. Se conocen en la técnica métodos para purificar VE de bacterias. En algunas realizaciones, las VE se preparan a partir de cultivos bacterianos usando métodos descritos en S. Bin Park, *et al.* PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011) o G. Norheim, *et al.* PLoS ONE. 10(9): e0134353 (2015), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, las bacterias se cultivan hasta una densidad óptica elevada y después se centrifugan para

aglomerar las bacterias (por ejemplo, a 10.000 x g durante 30 min a 4°C). En algunas realizaciones, a continuación, los sobrenadantes de cultivo se hacen pasar por un filtro para excluir las células bacterianas intactas (por ejemplo, un filtro de 0.22 µm). En algunas realizaciones, los sobrenadantes filtrados se centrifugan para aglomerar las VE bacterianas (por ejemplo, a 100.000-150.000 x g durante 1-3 horas a 4°C). En algunas realizaciones, las VE se purifican además resuspendiendo los aglomerados de VE resultantes (por ejemplo, en PBS), y aplicando las VE resuspendidas a un gradiente de sacarosa (por ejemplo, un gradiente de sacarosa discontinuo al 30-60%), seguido de centrifugación (por ejemplo, a 200.000 x g durante 20 horas a 4°C). Las bandas de VE se pueden recoger, lavar con (por ejemplo, con PBS), y centrifugarse para aglomerar las VE (por ejemplo, a 150.000 x g durante 3 horas a 4°C). Las VE purificadas se pueden almacenar, por ejemplo, a -80°C hasta su uso. En algunas realizaciones, las VE se purifican adicionalmente por tratamiento con DNasa y/o proteinasa K.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cultivos de bacterias divulgados en este documento se pueden centrifugar a 11.000 x g durante 20-40 min a 4°C para aglomerar las bacterias. Los sobrenadantes del cultivo se pueden hacer pasar por un filtro de 0.22 µm para excluir las células bacterianas intactas. A continuación, los sobrenadantes filtrados se pueden concentrar usando métodos que pueden incluir, aunque no de forma limitativa, precipitación en sulfato amónico, ultracentrifugación, o filtración. Por ejemplo, para la precipitación con sulfato de amonio, se puede añadir sulfato de amonio 1.5-3 M para filtrar el sobrenadante lentamente, con agitación a 4°C. Las precipitaciones se pueden incubar a 4°C durante 8-48

horas y después centrifugarse a 11.000 x g durante 20-40 min a 4°C. Los aglomerados resultantes contienen las VE bacterianas y otros residuos. Mediante ultracentrifugación, los sobrenadantes filtrados se pueden centrifugar a 5 100.000-200.000 x g durante 1-16 horas a 4°C. El aglomerado de esta centrifugación contiene las VE y otros residuos. En algunas realizaciones, usando una técnica de filtración, tal como mediante el uso de una centrifugación con filtro Amicon Ultra o mediante filtración en flujo tangencial, los 10 sobrenadantes se pueden filtrar para retener especies de peso molecular > 50 o 100 kDa.

Como alternativa, las VE se pueden obtener a partir de cultivos bacterianos continuamente durante el crecimiento, o en puntos temporales seleccionados durante el 15 crecimiento, conectando un biorreactor a un sistema de flujo tangencial alternante (ATF) (por ejemplo, XCell ATF de Repligen). El sistema ATF retiene células intactas (>0.22 μ m) en el biorreactor, y permite que los componentes de menor tamaño (por ejemplo, las VE, proteínas libres) 20 atraviesen el filtro para su recogida. Por ejemplo, el sistema se puede configurar para que el filtrado <0.22 μ m se pase a un segundo filtro de 100 kDa, permitiendo que especies como las VE entre 0.22 μ m y 100 kDa se recojan, y las especies menores de 100 kDa se devuelvan al 25 biorreactor. Como alternativa, el sistema se puede configurar para permitir que el medio del biorreactor se rellene y/o modifique durante el crecimiento del cultivo. Las VE recogidas por este método se puede purificar y/o concentrar mediante ultracentrifugación o centrifugación, 30 como se ha descrito anteriormente para los sobrenadantes filtrados.

Las VE obtenidas por los métodos proporcionados en el

presente documento se pueden purificar adicionalmente mediante cromatografía en columnas de exclusión molecular, por cromatografía de afinidad, y por ultracentrifugación en gradiente, usando métodos que pueden incluir, aunque no de forma limitativa, el uso de un gradiente de sacarosa o un gradiente Optiprep. En resumen, el uso de un método con gradiente de sacarosa, si se usó precipitación en sulfato amónico o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, los aglomerados se resuspenden en sacarosa al 60%, Tris 30 mM, pH 8.0. Si se usó filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se intercambia con tampón en sacarosa al 60%, Tris 30 mM, pH 8.0, con una columna Amicon Ultra. Las muestras se aplicaron a un gradiente de sacarosa discontinuo al 35-60% y se centrifugaron a 200.000 x g durante 3-24 horas a 4 °C. En resumen, usando un método en gradiente Optiprep, si se usó precipitación en sulfato amónico o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, los aglomerados se resuspenden en Optiprep al 35% en PBS. En algunas realizaciones, si se usó filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se diluye con Optiprep al 60% hasta una concentración final del 35% en Optiprep. Las muestras se aplicaron a un gradiente de sacarosa discontinuo al 35-60% y se centrifugaron a 200.000 x g durante 3-24 horas a 4 °C.

En algunas realizaciones, para confirmar la esterilidad y aislamiento de las preparaciones de VE, las VE se diluyen en serie en medio de agar usado para el cultivo rutinario de las bacterias a analizar, y se incuban en condiciones rutinarias. Las preparaciones no estériles se hacen pasar por un filtro de 0.22 um para excluir las células intactas. Para aumentar adicionalmente la pureza,

las VE aisladas se pueden tratar con DNasa o proteinasa K.

En algunas realizaciones, para la preparación de la VE usadas en inyecciones *in vivo*, las VE purificadas se procesan como se ha descrito anteriormente (G. Norheim, et al. *PLoS ONE*. 10(9): e0134353 (2015)). En resumen, después de la centrifugación en gradiente de sacarosa, las bandas que contienen las VE se resuspenden hasta una concentración final de 50 µg/ml en una solución que contiene sacarosa al 3% u otra solución adecuada para su inyección *in vivo* conocida del experto en la técnica. Esta solución también puede contener adyuvantes, por ejemplo, hidróxido de aluminio a una concentración de 0-0.5% (p/v).

En determinadas realizaciones, para preparar muestras adecuadas para ensayos adicionales (por ejemplo, para eliminar la sacarosa antes de la obtención de imágenes TEM o ensayos *in vitro*), las muestras se intercambiaron con tampón en PBS o Tris 30 mM, pH 8.0 usando filtración (por ejemplo, columnas Amicon Ultra), diálisis, o ultracentrifugación (200.000 x g, ≥ 3 horas, 4°C) y resuspensión.

En algunas realizaciones, la esterilidad de las preparaciones VE se pueden confirmar sembrando en placas una parte de las VE en medio agar utilizado para el cultivo habitual de las bacterias usadas en la generación de las VE e incubar usando condiciones convencionales.

En algunas realizaciones, las VE se aíslan y se enriquecen mediante cromatografía y restos de unión a superficie en las VE. En otras realizaciones, las VE seleccionadas se aíslan y/o enriquecen mediante clasificación celular con fluorescencia por métodos que utilizan reactivos de afinidad, colorantes químicos, proteínas recombinantes, u otros métodos conocidos del

experto en la materia.

Composiciones farmacéuticas

En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento son composiciones farmacéuticas que comprenden las VE y/o bacterias proporcionadas en el presente documento (por ejemplo, una composición de VE). En algunas realizaciones, la composición de VE comprende una VE y/o una combinación de las VE descritas en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden VE práctica o completamente exentas de bacterias. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tanto VE como bacterias completas (por ejemplo, bacterias vivas, bacterias muertas, bacterias atenuadas). En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden composiciones que comprenden bacterias que están práctica o completamente exentas de VE. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden las VE y/o bacterias derivadas de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) de las cepas o especies de bacterias relacionada en la Tabla 1 y/o la Tabla 2.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos 1 bacteria por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7,

9.8. 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 5 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 10 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 15 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} partículas VE.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica 20 comprende aproximadamente 1 bacteria por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8. 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8. 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8. 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8. 5.9, 6, 25 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8. 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8. 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8. 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8. 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 30 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80,

81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95,
96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450,
500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 ,
 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 ,
5 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 ,
 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 ,
 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 ,
 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 ,
 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 ,
10 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 ,
 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} ,
 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} ,
 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} partículas VE.

En determinadas realizaciones, la composición
15 farmacéutica comprende una proporción específica entre
partículas bacterianas y VE. El número de partículas
bacterianas se puede basar en el número de partículas real
o (si la bacteria está viva) el número de UFC. El número de
partículas se puede establecer combinando un conjunto de
20 cantidades de VE purificadas con un conjunto de cantidades
de bacterias purificadas, modificando las condiciones de
crecimiento en las que las bacterias se cultivan, o
modificando las propias bacterias para producir más o menos
VE.

25 En algunas realizaciones, para cuantificar las
cantidades de VE y/o bacterias presentes en una muestra
bacterianas, se puede usar el microscopio electrónico (por
ejemplo, EM de secciones congeladas ultrafinas) para
visualizar las vesículas y las bacterias y contar sus
30 cantidades relativas. Como alternativa, se puede usar un
análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), un contador
Coulter, y la dispersión dinámica de luz (DLS) o una

combinación de estas técnicas. El NTA y el contador Coulter cuentan partículas y muestran sus tamaños. La DLS proporciona la distribución del tamaño de las partículas, pero no la concentración. Las bacterias tienen
5 frecuentemente diámetros de 1-2 μm . El intervalo completo de 0.2-20 μm . Los resultados combinados del recuento Coulter y el NTA pueden indicar las cantidades de bacterias en una muestra dada. El recuento Coulter indica el número de partículas con diámetros de 0.7-10 μm . El NTA indica las
10 cantidades de partículas con diámetros de 50-1400 nm. Para la mayoría de especies bacterianas, el recuento Coulter por si solo puede proporcionar el número de bacterias en una muestra. Las VE tiene 20-250 nm de diámetro. El NTA permite contar el número de partículas que tienen 50-250 nm
15 diámetro. La DLS revela la distribución de partículas de diferentes diámetros dentro de un intervalo aproximado de 1 nm - 3 μm .

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica no comprende más de 1 bacteria por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3,
20 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8. 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8. 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8. 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8. 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8. 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3,
25 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8. 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8. 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8. 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51,
30 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 ,
 5 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} ,
 10 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} partículas VE.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos 1 partícula VE por cada 1, 1.1, 1.2,
 15 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8. 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8. 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8. 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8. 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8. 6.9, 7, 7.1, 7.2,
 20 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8. 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8. 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8. 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50,
 25 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 ,
 30 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 ,

2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 ,
 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 ,
 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 ,
 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 ,
5 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} ,
 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} ,
 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} bacterias.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica
 comprende aproximadamente 1 partícula VE por cada 1, 1.1,
 10 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3,
 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8. 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5,
 3.6, 3.7, 3.8. 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7,
 4.8. 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8. 5.9,
 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8. 6.9, 7, 7.1,
 15 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8. 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3,
 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8. 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5,
 9.6, 9.7, 9.8. 9.9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19,
 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34,
 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49,
 20 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64,
 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79,
 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94,
 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450,
 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1×10^3 ,
 25 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 ,
 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 ,
 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 ,
 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 ,
 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 ,
 30 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 ,
 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 ,
 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} ,

9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} ,
 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} bacterias. En algunas
 realizaciones, la composición farmacéutica no comprende más
 de 1 VE por cada 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8.
 5 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8. 2.9, 3,
 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8. 3.9, 4, 4.1, 4.2,
 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8. 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4,
 5.5, 5.6, 5.7, 5.8. 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6,
 6.7, 6.8. 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8.
 10 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8. 8.9, 9,
 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8. 9.9, 10, 11, 12,
 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. 39, 40, 41, 42,
 43, 44, 45, 46, 47, 48. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57,
 15 58. 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68. 69, 70, 71, 72,
 73, 74, 75, 76, 77, 78. 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87,
 88. 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98. 99, 100, 150,
 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750,
 800, 850, 900, 950, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 ,
 20 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 ,
 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 ,
 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 ,
 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 ,
 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 ,
 25 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 ,
 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} ,
 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} ,
 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , y/o 1×10^{12} bacterias.

En algunas realizaciones, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%,
 30 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,
 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%,
 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,

42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,
66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,
78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,
5 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las
partículas de la composición farmacéutica son VE.

En algunas realizaciones, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%,
5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,
18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%,
10 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,
42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,
66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,
78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,
15 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las
partículas de la composición farmacéutica son bacterias.

En algunas realizaciones, no más del 1%, 2%, 3%, 4%,
5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,
18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%,
20 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,
42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,
66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,
78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,
25 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las
partículas de la composición farmacéutica son VE.

En algunas realizaciones, no más del 1%, 2%, 3%, 4%,
5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,
18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%,
30 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,
42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,

66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las partículas de la composición farmacéutica son bacterias.

5 En algunas realizaciones, aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,
10 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las partículas de la composición farmacéutica son VE.

15 En algunas realizaciones, aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,
20 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las partículas de la composición farmacéutica son
25 bacterias.

 En algunas realizaciones, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,
30 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,

78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las proteínas de la composición farmacéutica es proteína de VE.

En algunas realizaciones, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%,
5 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,
10 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las proteínas de la composición farmacéutica es proteína bacteriana.

En algunas realizaciones, no más del 1%, 2%, 3%, 4%,
15 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
20 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las proteínas de la composición farmacéutica es proteína de VE.

En algunas realizaciones, no más del 1%, 2%, 3%, 4%,
25 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
30 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las proteínas de la composición farmacéutica es proteína bacteriana.

En algunas realizaciones, aproximadamente el 1%, 2%,
5 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%,
16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%,
28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%,
40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,
52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,
10 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,
76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%
de las proteínas de la composición farmacéutica es proteína
de VE.

En algunas realizaciones, aproximadamente el 1%, 2%,
15 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%,
16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%,
28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%,
40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,
20 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,
64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,
76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%
de las proteínas de la composición farmacéutica es proteína
25 bacteriana.

En algunas realizaciones, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%,
5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,
18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%,
30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,
30 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,
66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,

78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los lípidos de la composición farmacéutica son lípidos de VE.

En algunas realizaciones, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%,
5 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%,
10 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los lípidos de la composición farmacéutica son lípidos bacterianos.

En algunas realizaciones, no más del 1%, 2%, 3%, 4%,
15 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
20 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los lípidos de la composición farmacéutica son lípidos de VE.

En algunas realizaciones, no más del 1%, 2%, 3%, 4%,
25 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%,
30 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los lípidos de la composición farmacéutica son lípidos bacterianos.

En algunas realizaciones, aproximadamente el 1%, 2%,
5 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%,
16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%,
28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%,
40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,
52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,
10 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,
76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%
de los lípidos de la composición farmacéutica son lípidos
de VE.

En algunas realizaciones, aproximadamente el 1%, 2%,
15 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%,
16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%,
28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%,
40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,
20 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,
64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,
76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%
de los lípidos de la composición farmacéutica son lípidos
25 bacterianos.

En algunas realizaciones, las VE de la composición
farmacéutica se purifican a partir de uno o más componentes
bacterianos adicionales. En algunas realizaciones, la
composición farmacéutica comprende además otros componentes
30 bacterianos. En algunas realizaciones, la composición
farmacéutica comprende células bacterianas.

En determinados aspectos, se proporcionan

composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se combinan con materiales activos o inactivos adicionales para producir el producto final, que puede estar en un formato de monodosis o de multidosi-
5 puede estar en un formato de monodosis o de multidosi. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se combinan con un adyuvante tal como un inmuno-adyuvante (por ejemplo, agonistas de STING, agonistas de TLR, agonistas de NOD).

10 En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un carbohidrato. Un "carbohidrato" se refiere a un azúcar o polímero de azúcares. Los términos "sacárido", "polisacárido", "carbohidrato", y "oligosacárido" se pueden utilizar de forma indistinta. La mayoría de carbohidratos
15 son aldehídos o cetonas con muchos grupos hidroxilo, habitualmente uno en cada átomo de carbono de la molécula. Los carbohidratos tienen por lo general la fórmula molecular $C_nH_{2n}O_n$. Un carbohidrato puede ser un monosacárido, un disacárido, trisacárido, oligosacárido, o
20 polisacárido. El carbohidrato más básico es un monosacárido, tal como glucosa, sacarosa, galactosa, manosa, ribosa, arabinosa, xilosa, y fructosa. Los disacáridos son dos monosacáridos unidos. Entre los ejemplos de disacáridos se incluyen sacarosa, maltosa,
25 celobiosa y lactosa. Típicamente, un oligosacárido incluye entre tres y diez unidades de monosacáridos (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), y los polisacáridos incluyen seis o más unidades de monosacáridos. Entre los ejemplos de polisacáridos se incluyen almidón, glucógeno, y celulosa.
30 Los carbohidratos pueden incluir unidades de sacáridos modificadas tales como 2'-desoxirribosa de la que se ha eliminado un grupo hidroxilo, 2'-fluororribosa en la que un

grupo hidroxilo se ha sustituido por un átomo de flúor, o N-acetilglucosamina, una forma de glucosa que contiene nitrógeno (por ejemplo, 2'-fluororribosa, desoxirribosa y hexosa). Los hidratos de carbono pueden existir en muchas formas diferentes, por ejemplo, confórmers, formas cíclicas, formas acíclicas, estereoisómeros, tautómeros, anómeros e isómeros.

En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un lípido. Tal como se usa en el presente documento, un "lípido" incluye grasas, aceites, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos en cualquier incluidos los ácidos grasos libres. Las grasas, aceites y ácidos grasos pueden estar saturados, insaturados (cis o trans) o parcialmente insaturados (cis o trans). En algunas realizaciones, el lípido comprende al menos un ácido graso seleccionado entre ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido margárico (17:0), ácido heptadecenoico (17:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linolénico (18:3), ácido octadecatetraenoico (18:4), ácido araquídico (20:0), ácido eicosenoico (20:1), ácido eicosadienoico (20:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido eicosapentaenoico (20:5) (EPA), ácido docosanoico (22:0), ácido docosenoico (22:1), ácido docosapentaenoico (22:5), ácido docosaheptaenoico (22:6) (DHA), y ácido tetracosanoico (24:0). En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un lípido modificado, por ejemplo, un lípido que se ha modificado por cocinado.

En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un suplemento mineral o fuente mineral. Los ejemplos de minerales incluyen, sin limitación: cloruro, sodio,

calcio, hierro, cromo, cobre, yodo, cinc, magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio, y selenio. Las formas adecuadas de cualquiera de los minerales anteriores incluyen sales minerales solubles, sales minerales poco
5 solubles, sales minerales insolubles, minerales quelados, complejos minerales, minerales no reactivos tales como minerales de carbonilo, y minerales reducidos, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición comprende al
10 menos un suplemento de vitaminas. La al menos una vitamina puede ser una vitamina liposoluble o hidrosoluble. Las vitaminas adecuadas incluyen aunque no de forma limitativa vitamina C, vitamina A, vitamina E, vitamina B12, vitamina K, riboflavina, niacina, vitamina D, vitamina B6, ácido
15 fólico, piridoxina, tiamina, ácido pantoténico, y biotina. Las formas adecuadas de cualquiera de las anteriores son sales de la vitamina, derivados de la vitamina, compuestos que tienen una actividad similar o análoga a la de la vitamina, y metabolitos de la vitamina.

En algunas realizaciones, la composición comprende un
20 excipiente. Los ejemplos no limitativos de excipientes adecuados incluyen un agente tamponante, un conservante, un estabilizante, un aglutinante, un agente de compactación, un lubricante, un potenciador de la dispersión, un agente
25 disgregante, un agente aromatizante, un edulcorante, y un agente colorante.

En algunas realizaciones, el excipiente es un agente tamponante. Los ejemplos no limitativos de agentes tamponantes adecuados incluyen citrato de sodio, carbonato
30 de magnesio, bicarbonato de magnesio, carbonato de calcio, y bicarbonato de calcio.

En algunas realizaciones, el excipiente comprende un

conservante. Los ejemplos no limitativos de conservantes adecuados incluyen antioxidantes, tales como alfa-tocoferol y ascorbato, y antimicrobianos, como parabenos, clorobutanol, y fenol.

5 En algunas realizaciones, la composición comprende un aglutinante como excipiente. Los ejemplos no limitativos de aglutinantes adecuados incluyen almidones, almidones pregelatinizados, gelatina, polivinilpirrolidona, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa,
10 poliacrilamidas, poliviniloxoazolidona, poli(alcohol vinílico), alcoholes grasos C₁₂-C₁₈, polietilenglicol, polioles, sacáridos, oligosacáridos, y combinaciones de los mismos.

 En algunas realizaciones, la composición comprende un
15 lubricante como excipiente. Los ejemplos no limitativos de lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, aceites vegetales hidrogenados, sterotex, monoestearato polioxietilenado, talco, polietilenglicol, benzoato de sodio, lauril sulfato
20 sódico, laurilsulfato de magnesio, y aceite mineral ligero.

 En algunas realizaciones, la composición comprende un potenciador de la dispersión como excipiente. Los ejemplos no limitativos de dispersantes adecuados incluyen almidón, ácido algínico, polivinilpirrolidonas, goma guar, caolín,
25 bentonita, lana de celulosa purificada, glicolato sódico de almidón, silicato isoamorfo, y celulosa microcristalina tal como los emulsionantes tensioactivos de elevado HLB.

 En algunas realizaciones, la composición comprende un disgregante como excipiente. En algunas realizaciones, el
30 disgregante es un disgregante no efervescente. Los ejemplos no limitativos de disgregantes no efervescentes adecuados incluyen almidones tales como almidón de maíz, almidón de

patata, almidones gelatinizados y modificados de los mismos, edulcorantes, arcillas, tales como bentonita, celulosa microcristalina, alginatos, glicolato sódico de almidón, gomas tales como agar, goma guar, goma garrofín, 5 karaya, pectina, y tragacanto. En algunas realizaciones, el disgregante es un disgregante efervescente. Los ejemplos no limitativos de disgregantes efervescentes adecuados incluyen bicarbonato de sodio junto con ácido cítrico, y bicarbonato de sodio junto con ácido tartárico.

10 En algunas realizaciones, la composición es un producto alimentario (por ejemplo, un alimento o bebida) tal como un alimento o bebida saludable, un alimento o bebida para bebés, un alimento o bebida para mujeres embarazadas, atletas, personas de la tercera edad u otro 15 grupo especificado, un alimento funcional, una bebida, un alimento o bebida para uso sanitario específico, un suplemento de la dieta, un alimento o bebida para pacientes, o un alimento para animales. Los ejemplos específicos de alimentos y bebidas incluyen diversas 20 bebidas tales como zumos, bebidas refrescantes, bebidas de té, preparaciones para beber, bebidas de gelatina, y bebidas funcionales; bebidas alcohólicas tales como cervezas; alimentos que contienen carbohidratos tales como productos alimentarios de arroz, fideos, panes, y pastas; 25 productos de pasta tales como mojamas de pescado, salchichas, productos de pasta de marisco; especias de cocina tales como curries, aderezos con salsas espesadas con almidón, y sopas chinas; sopas; productos lácteos tales como leche, bebidas lácteas, helados, quesos, y yogures; 30 productos fermentados tales como pastas de soja, yogures, bebidas fermentadas, y encurtidos; productos de judías; diferentes productos de confitería, incluidas galletas de

mantequilla, galletas, y similares, golosinas, gomas de mascar, caramelos de goma, postres fríos incluidos gelatinas, caramelos de crema, y postres congelados; alimentos instantáneos tales como sopas instantáneas y
5 sopas de soja instantáneas; alimentos para calentar en el microondas; y similares. Además, los ejemplos también incluyen alimentos y bebidas saludables preparados en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, líquidos, pastas, y gelatinas.

10 En algunas realizaciones, la composición es un producto alimentario para animales, incluyendo seres humanos. Los animales, diferentes a seres humanos, no están especialmente limitados, y la composición se puede usar para diferentes tipos de ganado, ave de corral, mascotas,
15 animales experimentales, y similares. Los ejemplos específicos de animales incluyen, ganado bovino, caballos, ovejas, cabras, pollos, patos salvajes, avestruces, patos domésticos, perros, gatos, conejos, hámsteres, ratones, ratas, monos y similares, pero los animales no se limitan a
20 estos.

Agentes terapéuticos

En determinados aspectos, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración a un sujeto de una composición farmacéutica descrita en el
25 presente documento, tanto en solitario como junto con un compuesto terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico adicional es un inmunosupresor, un esteroide, agente terapéutico contra el cáncer.

En algunas realizaciones, la VE se administra al
30 sujeto antes de administrar el agente terapéutico (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas antes

o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días antes). En algunas realizaciones, la VE se administra al sujeto después de administrar el agente terapéutico (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas después o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días después). En algunas realizaciones, la VE y el compuesto terapéutico se administran al sujeto simultáneamente o casi simultáneamente (por ejemplo, las administraciones se producen con una separación de una hora entre sí). En algunas realizaciones, el sujeto recibe un antibiótico antes de administrar la VE al sujeto (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas antes o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días antes). En algunas realizaciones, el sujeto recibe un antibiótico después de administrar la VE al sujeto (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas antes o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días después). En algunas realizaciones, la VE y el antibiótico se administran al sujeto simultáneamente o casi simultáneamente (por ejemplo, las administraciones se producen con una separación de una hora entre sí).

En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico adicional es un compuesto terapéutico contra el cáncer. En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico contra el

cáncer es un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, 5 improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina 10 y bullatacinona); una camptotequina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina 15 (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de 20 mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por 25 ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omegall; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con 30 cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina,

daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, 5 idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, 10 zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de 15 pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales 20 tales como aminoglutenitida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; 25 diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; 30 losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK); razoxana; rizoxina; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico;

triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; 5 arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; 10 etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (por ejemplo, CPT-11); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); retinoides tales como 15 ácido retinoico; capecitabina; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico contra el cáncer es un agente de inmunoterapia. La 20 inmunoterapia se refiere al tratamiento que utiliza el sistema inmunitario de un sujeto para tratar un cáncer, por ejemplo, inhibidores del punto de control, vacunas del cáncer, citoquinas, terapia celular, linfocitos T CAR, y terapia con células dendríticas. Los ejemplos no 25 limitativos de inmunoterapias son inhibidores del punto de control, que incluyen Nivolumab (BMS, anti-PD-1), Pembrolizumab (Merck, anti-PD-1), Ipilimumab (BMS, anti-CTLA-4), MEDI4736 (AstraZeneca, anti-PD-L1), y MPDL3280A (Roche, anti-PD-L1). Otras inmunoterapias pueden ser 30 vacunas tumorales, tales como Gardail, Cervarix, BCG, sipulencel-T, Gp100:209-217, AGS-003, DCVax-L, Algenpantucel-L, Tergenpantucel-L, TG4010, ProstAtak,

Prostvac-V/R-TRICOM, Rindopepimul, acetato del péptido E75, IMA901, POL-103A, Belagenpumatucel-L, GSK1572932A, MDX-1279, GV1001, y Tecemotide. La inmunoterapia se puede administrar mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intratumoral, por vía subcutánea, o en los ganglios linfáticos), pero también se puede administrar por vía oral, por vía tópica, o mediante aerosol. Las inmunoterapias pueden comprender adyuvantes tales como citoquinas.

En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es un inhibidores del punto de control inmunitario. La inhibición del punto de control inmunitario se refiere ampliamente a inhibir los puntos de control que las células cancerosas pueden producir para evitar o disminuir una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de proteínas inmunitarias del punto de control incluyen, aunque no de forma limitativa, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, KIR, LAG3, TIM-3 o VISTA. Los inhibidores del punto de control inmunitarios pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen e inhiben una proteína inmunitaria del punto de control. Los ejemplos de inhibidores del punto de control inmunitarios incluyen, aunque no de forma limitativa, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, STI-A1110, TSR-042, RG-7446, BMS-936559, MEDI-4736, MSB-0020718C, AUR-012 y STI-A1010.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento junto con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento incluyen la administración de dos

agentes inmunoterapéuticos adicionales (por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario). Por ejemplo, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento junto con un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de CLTA-4 o un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de CTLA-4.

En algunas realizaciones, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo o fracción de unión a antígeno del mismo que, por ejemplo, se une a un antígeno asociado al cáncer. Los ejemplos de antígenos asociados al cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinina-4, alfa-fetoproteína ("AFP"), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteína de fusión b3a2 de BCR-ABL, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno carcinoembriónico ("CEA"), CASP-5, CASP-8, CD274, CD45, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, ciclina A1, proteína de fusión dek-can, DKK1, EFTUD2, factor de alargamiento 2, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antígeno epitelial tumoral ("ETA"), proteína de fusión ETV6-AML1, EZH2, FGF5, FLT3-ITD, FN1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4,5,6,7, GAS7, glipicano-3, GnTV, gp100/Pmel17, GPNMB, HAUS3, Hepsina, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralfa2, carboxiesterasa intestinal, K-ras, calicreína 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1, también conocido como CCDC110, LAGE-1, LDLR-fucosiltransferasa como proteína de fusión, Lengsina, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzima málica, mamaglobina-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A/MART-1, Meloe, Midquina, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC,

mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina, Miosina clase I, N-raw, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, Polipéptido P, p53, PAP, PAX5, PBF, proteína de fusión pml-RARalfa, antígeno de mucina epitelial polimórfica ("PEM"), PPP1R3B, PRAME, PRDX5, PSA, PSMA, PTPRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, SAGE, secernina 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, survivina, proteínas de fusión SYT-SSX1 o SYT-SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triosafosfato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirosinasa, tirosinasa ("TYR"), VEGF, WT1, XAGE-1b/GAGED2a. En algunas realizaciones, el antígeno es un neoantígeno.

En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es una vacuna del cáncer y/o un componente de una vacuna del cáncer (por ejemplo, un péptido y/o proteína antigénicos). La vacuna del cáncer puede ser una vacuna proteica, una vacuna de ácido nucleico o una combinación de las mismas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la vacuna del cáncer comprende un polipéptido que comprende un epítipo de un antígeno asociado al cáncer. En algunas realizaciones, la vacuna del cáncer comprende un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, tal como ARNm) que codifica un epítipo de un antígeno asociado al cáncer. Los ejemplos de antígenos asociados al cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinina-4, alfa-fetoproteína ("AFP"), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteína de fusión b3a2 de BCR-ABL, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno carcinoembriónico ("CEA"), CASP-5, CASP-8, CD274, CD45, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, ciclina A1, proteína de fusión dek-can, DKK1,

EFTUD2, factor de alargamiento 2, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antígeno epitelial tumoral ("ETA"), proteína de fusión ETV6-AML1, EZH2, FGF5, FLT3-ITD, FN1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4,5,6,7, GAS7, glipicano-
5 3, GnTV, gp100/Pmel17, GPNMB, HAUS3, Hepsina, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralfa2, carboxiesterasa intestinal, K-ras, calicreína 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1, también conocido como CCDC110, LAGE-1, LDLR-
10 fucosiltransferasa como proteína de fusión, Lengsina, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzima málica, mamaglobina-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A/MART-1, Meloe, Midquina, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC,
15 mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina, Miosina clase I, N-ras, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, Polipéptido P, p53, PAP, PAX5, PBF, proteína de fusión pml-RARalfa, antígeno de mucina epitelial polimórfica ("PEM"), PPP1R3B, PRAME, PRDX5, PSA, PSMA,
20 PTPRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, SAGE, secernina 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, survivina, proteínas de fusión SYT-SSX1 o SYT-SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triosafofosfato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2,
25 TRP2-INT2, tirosinasa, tirosinasa ("TYR"), VEGF, WT1, XAGE-1b/GAGED2a. En algunas realizaciones, el antígeno es un neoantígeno. En algunas realizaciones, la vacuna del cáncer se administra con un adyuvante. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, aunque no de forma limitativa, una proteína
30 moduladora inmunomoduladora, Adyuvante 65, α -GalCer, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, péptido β -Glucano, ADN CpG ODN, GPI-0100, lípido A,

lipopolisacárido, Lipovant, Montanide, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, Pam3CSK4, quil A, toxina colérica (TC) y toxina termolábil (TL) de *Escherichia coli* enterotoxigénica incluidos los derivados de las mismas
5 (CTB, mmCT, CTA1-DD, LTB, LTK63, LTR72, dmLT) y dimicolato de trehalosa.

En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es una proteína inmunomoduladora del sujeto. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es una
10 citoquina o quimioquina. Los ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, aunque no de forma limitativa, quimioatrayente de linfocitos B ("BLC"), motivo C-C de quimioquina 11 ("Eotaxina-1"), proteína quimiotáctica eosinófila 2 ("Eotaxina-2"), factor estimulador de las
15 colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), 1-309, molécula de adhesión intercelular1 (ICAM-1), Interferón alfa ("IFN-alfa"), Interferón beta ("IFN-beta"), interferón gamma ("IFN-gamma"), Interleuquina-1 alfa ("IL-1 alfa"),
20 Interleuquina-1 beta ("IL-1 beta"), Antagonista del receptor de la Interleuquina 1 (IL-1), Interleuquina-2 ("IL-2"), Interleuquina-4 ("IL-4"), Interleuquina-5 ("IL-5"), Interleuquina-6 ("IL-6"), receptor soluble de la interleuquina-6 ("IL-6 sR"), Interleuquina-7 ("IL-7"),
25 Interleuquina-8 ("IL-8"), Interleuquina-10 ("IL-10"), Interleuquina-11 ("IL-11"), Subunidad beta de la interleuquina-12 ("IL-12 p40" o "IL-12 p70"), Interleuquina-13 ("IL-13"), Interleuquina-15 ("IL-15"), Interleuquina-16 ("IL-16"), Interleuquina-17A-F ("IL-17A-F"),
30 Interleuquina-18 ("IL-18"), Interleuquina-21 ("IL-21"), Interleuquina-22 ("IL-22"), Interleuquina-23 ("IL-23"), Interleuquina-33 ("IL-33"), Ligando 2 de la

quimioquina (motivo C-C) ("MCP-1"), Factor estimulador de colonias de macrófagos ("M-CSF"), Monoquina inducida por interferón gamma ("MIG"), Ligando 2 de la quimioquina (motivo C-C) ("MIP-1 alfa"), Ligando 4 de la quimioquina (motivo C-C) ("MIP-1 beta"), Proteína-1-delta inflamatoria de los macrófagos ("MIP-1 delta"), Factor de crecimiento derivado de plaquetas, subunidad B ("PDGF-BB"), Ligando 5 de quimioquina (motivo C-C), regulada tras activación, Linfocitos T normales expresados y secretados ("RANTES"), Inhibidor de la metalopeptidasa TIMP 1 ("TIMP-1"), Inhibidor de la metalopeptidasa TIMP 2 ("TIMP-2"), Factor de necrosis tumoral, linfoxina-alfa ("TNF alfa"), Factor de necrosis tumoral, linfoxina-beta ("TNF beta"), Receptor de TNF soluble de tipo 1 ("sTNFRI"), sTNFRIIAR, Factor neurotrófico derivado del cerebro ("BDNF"), Factor de crecimiento de fibroblastos básico ("bFGF"), Proteína morfogenética ósea 4 ("BMP-4"), Proteína morfogenética ósea 5 ("BMP-5"), Proteína morfogenética ósea 7 ("BMP-7"), Factor de crecimiento de nervios ("b-NGF"), Factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), Receptor del factor de crecimiento epidérmico ("EGFR"), Factor de crecimiento endotelial vascular derivado de las glándulas endocrinas ("EG-VEGF"), Factor de crecimiento de fibroblastos 4 ("FGF-4"), Factor de crecimiento de queratinocitos ("FGF-7"), Factor de diferenciación del crecimiento 15 ("GDF-15"), Factor neurotrófico derivado de células gliales ("GDNF"), Hormona de crecimiento, Factor de crecimiento análogo a EGF de unión a heparina ("HB-EGF"), Factor de crecimiento de los hepatocitos ("HGF"), Proteína 1 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina ("IGFBP-1"), Proteína 2 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina ("IGFBP-2"), Proteína 3 de unión al factor de crecimiento de tipo

insulina ("IGFBP-3"), Proteína 4 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina ("IGFBP-4"), Proteína 6 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina ("IGFBP-6"), Factor de crecimiento de tipo insulina 1 ("IGF-1"),
5 Insulina, Factor estimulador de colonias de macrófagos ("M-CSF R"), Receptor del factor de crecimiento de los nervios ("NGF R"), Neurotrofina-3 ("NT-3"), Neurotrofina-4 ("NT-4"), Factor inhibidor de la osteoclastogénesis ("Osteoprotegerina"), Receptores del factor de crecimiento
10 derivado de plaquetas ("PDGF-AA"), Biosíntesis de fosfatidilinositol-glicano ("PIGF"), Skp, Cullin, Complejo que contiene la secuencia F ("SCF"), Receptor del factor de citoblastos ("SCF R"), Factor de crecimiento trasformante alfa ("TGFalfa"), Factor de crecimiento trasformante beta-1
15 ("TGF beta 1"), Factor de crecimiento trasformante beta-3 ("TGF beta 3"), Factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGFR2"), Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGFR3"), VEGF-D 6Cquina, Receptor de
20 la proteína tirosina quinasa UFO ("Axl"), Betacelulina ("BTC"), Quimioquina epitelial asociada a mucosas ("CCL28"), Ligando 27 de la quimioquina (motivo C-C) ("CTACK"), Ligando 16 de la quimioquina (motivo C-X-C) ("CXCL16"), Quimioquina 5 motivo C-X-C ("ENA-78"), Ligando
25 26 de la quimioquina (motivo C-C) ("Eotaxina-3"), Proteína 2 quimiotáctica de granulocitos ("GCP-2"), GRO, Ligando 14 de la quimioquina (motivo C-C) ("HCC-I"), Ligando 16 de la quimioquina (motivo C-C) ("HCC-4"), Interleuquina-9 ("IL-9"), Interleuquina-17 F ("IL-17F"), Proteína de unión a
30 Interleuquina-18 ("IL-18 BP_a"), Interleuquina-28 A ("IL-28A"), Interleuquina 29 ("IL-29"), Interleuquina 31 ("IL-31"), Quimioquina 10 motivo C-X-C ("IP-10"), Receptor de

quimioquina CXCR3 ("I-TAC"), Factor inhibidor de leucemia ("LIF"), Luz, Ligando de quimioquina (motivo C), Proteína quimioattractora de monocitos 2 ("MCP-2"), Proteína quimioattractora de monocitos 3 ("MCP-3"), Proteína quimioattractora de monocitos 4 ("MCP-4"), Quimioquina derivada de macrófagos ("MDC"), Factor inhibidor de la migración de macrófagos ("MIF"), Ligando 20 de la quimioquina (motivo C-C) ("MIP-3 alfa"), Motivo C-C de la quimioquina 19 ("MIP-3 beta"), Ligando 23 de la quimioquina (motivo C-C) ("MPIF-1"), Cadena alfa de la proteína estimulante de macrófagos ("MSPalfa"), Proteína 4 de ensamblaje de nucleosoma de tipo 1 ("NAP-2"), Fosfoproteína secretada 1 ("Osteopontina"), Citoquina pulmonar y regulada por la activación ("PARC"), Factor plaquetario 4 ("PF4"), Factor derivado de células del estroma 1-alfa ("SDF-1 alfa"), Ligando 17 de la quimioquina (motivo C-C) ("TACK"), Quimioquina expresada en el timo ("TECK"), Linfoproteína estromal tímica ("TSLP 4- IBB"), Antígeno CD-166 ("ALCAM"), Clúster de diferenciación 80 ("B7-1"), Miembro 17 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("BCMA"), Clúster de diferenciación 14 ("CD14"), Clúster de diferenciación 30 ("CD30"), Clúster de diferenciación 40 ("Ligando de CD40"), Molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembriónico (proteína biliar) ("CEACAM-1"), Receptor de muerte 6 ("DR6"), Deoxitimidina quinasa ("Dtk"), Glicoproteína de membrana de tipo 1 ("Endoglina"), Receptor de la proteína tirosina quinasa erbB-3 ("ErbB3"), Molécula 1 de adhesión a leucocitos endoteliales ("E-Selectina"), Antígeno de apoptosis 1 ("Fas"), Tirosina quinasa 3 de tipo Fms ("Flt-3L"), Miembro 1 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("GITR"), Miembro 14 de la superfamilia del factor

de necrosis tumoral ("HVEM"), Molécula 3 de adhesión intercelular ("ICAM-3"), IL-1 R4, IL-1 R1, IL-10 Rbeta, IL-17R, IL-2Rgamma, IL-21R, Proteína 2 de la membrana lisosómica ("LIMPII"), Lipocalina de neutrófilo asociada a
5 gelatinasa ("Lipocalina-2"), CD62L ("L-Selectina"), Endotelio linfático ("LYVE-1"), Secuencia A relacionada con la secuencia del polipéptido MHC clase I ("MICA"), Secuencia B relacionada con la secuencia del polipéptido MHC clase I ("MICB"), NRG1-betal, Receptor del factor de
10 crecimiento derivado de plaquetas de tipo beta ("PDGF Rbeta"), Molécula de adhesión a células endoteliales-plaquetas ("PECAM-1"), RAGE, Receptor celular 1 del virus de la hepatitis A ("TIM-1"), Miembro IOC de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("TRAIL R3"), Dominio de
15 unión a transglutaminasa de la proteína trapina ("Trapina-2"), Receptor de uroquinasa ("uPAR"), Proteína de adhesión a células vasculares 1 ("VCAM-1"), XEDARActivin A, Proteína relacionada con agutí ("AgRP"), Ribonucleasa 5 ("Angiogenina"), Angiopoyetina 1, angiostatina, Cateprina
20 S, CD40, Familia de la proteína críptica IB ("Cripto-1"), DAN, Proteína relacionada con Dickkopf 1 ("DKK-1"), E-Caderina, Molécula de adhesión a células epiteliales ("EpCAM"), Ligando Fas (FasL o CD95L), Fcg RIIB/C, FoUistatina, Galectina-7, Molécula 2 de adhesión
25 intercelular ("ICAM-2"), IL-13 R1, IL-13R2, IL-17B, IL-2 Ra, IL-2 Rb, IL-23, LAP, Molécula de adhesión a células neuronales ("NrCAM"), Inhibidor del activador del plasminógeno - 1 ("PAI-1"), Receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF-AB"), resistina,
30 Factor derivado de células estromales 1 ("SDF-1 beta"), sgpl30, Proteína 2 relacionada con Frizzled secretada ("ShhN"), Lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido

siálico ("Siglec-5"), ST2, Factor de crecimiento transformante beta 2 ("TGF beta 2"), Tie-2, Trombopoyetina ("TPO"), Miembro 10D de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("TRAIL R4"), Receptor de disparo expresado en células mieloides 1 ("TREM-1"), Factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF-C"), VEGFR1Adiponectina, Adipsina ("AND"), Alfa-fetoproteína ("AFP"), Análogo de angiopoyetina 4 ("ANGPTL4"), Beta-2-microglobulina ("B2M"), Molécula de adhesión a células basales ("BCAM"), Antígeno de carbohidratos 125 ("CA125"), Antígeno del cáncer 15-3 ("CA15-3"), Antígeno carcinoembriónico ("CEA"), Receptor de la proteína AMPc ("CRP"), Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano ("ErbB2"), Folistatina, Hormona estimuladora del folículo ("FSH"), Ligando 1 de la quimioquina (motivo C-X-C) ("GRO alfa"), gonadotropina coriónica humana ("beta HCG"), Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1 ("IGF-1"), IL-1 sRII, IL-3, IL-18 Rb, IL-21, Leptina, Metaloproteinasa de la matriz-1 ("MMP-1"), Metaloproteinasa de la matriz-2 ("MMP-2"), Metaloproteinasa de la matriz-3 ("MMP-3"), Metaloproteinasa de la matriz-8 ("MMP-8"), Metaloproteinasa de la matriz-9 ("MMP-9"), Metaloproteinasa de la matriz-10 ("MMP-10"), Metaloproteinasa de la matriz-13 ("MMP-13"), Molécula de adhesión a células neurales ("NCAM-1"), Entactina ("Nidogen-1"), Enolasa específica de neurona ("NSE"), Oncostatina M ("OSM"), Procalcitonina, prolactina, Antígeno específico de la próstata ("PSA"), Lectina análoga a Ig de unión a ácido siálico 9 ("Siglec-9"), Endopeptidasa ADAM 17 ("TACE"), Tiroglobulina, Inhibidor de la metaloproteinasa TIMP 4 ("TIMP-4"), TSH2B4, Proteína que contiene el dominio de la desintegrina y la metaloproteinasa 9 ("ADAM-9"), Angiopoyetina 2, Miembro 13

de la superfamilia del factor de necrosis tumoral/ Miembro B de la familia de la fosfoproteína 32 nuclear rica en leucina ácida ("APRIL"), Proteína morfogénica ósea 2 ("BMP-2"), Proteína morfogénica ósea 9 ("BMP-9"),
5 Componente del complemento 5a ("C5a"), Catepsina L, CD200, CD97, Chemerina, Miembro 6B de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("DcR3"), Proteína de unión a ácido graso 2 ("FABP2"), Proteína de activación de fibroblastos, alfa ("FAP"), Factor de crecimiento de fibroblastos 19
10 ("FGF-19"), Galectina-3, Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos ("HGF R"), IFN-gammalfa/beta R2, Factor de crecimiento de tipo insulina 2 ("IGF-2"), Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 2 ("IGF-2R"), receptor 6 de Interleuquina-1 (IL-1R6), Interleuquina 24
15 ("IL-24"), Interleuquina 33 ("IL-33"), calicreína 14, Asparaginil endopeptidasa ("Legumain"), Receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidada 1 ("LOX-1"), Lectina de unión a manosa ("MBL"), Neprilisina ("NEP"), Homólogo de la hendidura 1, asociado a traslocación (Drosophila)
20 ("Notch-1"), Nefoblastoma expresado en exceso ("NOV"), Osteoactivina, Proteína de muerte celular programada 1 ("PD-1"), N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa ("PGRP-5"), Serpina A4, Proteína 3 relacionada con Frizzled secretada ("sFRP-3"), Trombomodulina, Receptor de tipo Toll 2
25 ("TLR2"), Miembro 10A de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("TRAIL RI"), Transferrina ("TRF"), WIF-lACE-2, Albúmina, AMICA, Angiopoyetina 4, Factor activador de linfocitos B ("BAFF"), Antígeno de carbohidratos 19-9 ("CA19-9"), CD 163, Clusterina, CRT AM, Ligando 14 de la
30 quimioquina (motivo C-X-C) ("CXCL14"), Cistatina C, Decorina ("DCN"), Proteína relacionada con Dickkopf 3 ("DKK-3"), Proteína tipo delta 1 ("DLL1"), Fetuina A,

Factor de crecimiento de unión a heparina 1 ("aFGF"),
 Receptor alfa de folato ("FOLR1"), Furina, Proteína de
 clasificación 1 asociada a GPCR ("GASP-1"), Proteína de
 clasificación 2 asociada a GPCR ("GASP-2"), Receptor del
 5 factor estimulador de colonias de granulocitos ("GCSF R"),
 Hepsina de serina proteasa ("HAI-2"), Receptor de
 Interleuquina-17B ("IL-17B R"), Interleuquina 27 ("IL-27"),
 Gen 3 de activación de linfocitos ("LAG-3"),
 Apolipoproteína A-V ("LDL R"), Pepsinógeno I, Proteína de
 10 unión a retinol 4 ("RBP4"), SOST, Proteoglicano de sulfato
 de heparán ("Syndecan-1"), Miembro 13B de la superfamilia
 del factor de necrosis tumoral ("TACI"), Inhibidor de la
 ruta del factor tisular ("TFPI"), TSP-1, Superfamilia del
 receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10b
 15 ("TRAIL R2"), TRANCE, Troponina I, Activador del
 plasminógeno de la uroquinasa ("uPA"), Caderina 5, tipo 2 o
 VE-caderina (vascular endotelial) también conocida como
 CD144 ("VE-Caderina"), Proteína 1 de la ruta de
 señalización inducibles por WNT1 ("WISP-1"), y Receptor
 20 activador del factor nuclear κ B ("RANK").

En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra
 el cáncer es un compuesto contra el cáncer. Los compuestos
 contra el cáncer ilustrativos incluyen, aunque no de forma
 limitativa, Alemtuzumab (Campath®), Alitretinoína
 25 (Panretin®), Anastrozol (Arimidex®), Bevacizumab
 (Avastin®), Bexarotene (Targretin®), Bortezomib (Velcade®),
 Bosutinib (Bosulif®), Brentuximab vedotin (Adcetris®),
 Cabozantinib (Cometriq™), Carfilzomib (Kyprolis™),
 Cetuximab (Erbitux®), Crizotinib (Xalkori®), Dasatinib
 30 (Sprycel®), Denileukin diftitox (Ontak®), Clorhidrato de
 erlotinib (Tarceva®), Everolimus (Afinitor®), Exemestano
 (Aromasin®), Fulvestrant (Faslodex®), Gefitinib (Iressa®),

Ibritumomab tiuxetano (Zevalin®), Imatinib mesilato (Gleevec®), Ipilimumab (Yervoy™), Lapatinib ditosilato (Tykerb®), Letrozole (Femara®), Nilotinib (Tasigna®), Ofatumumab (Arzerra®), Panitumumab (Vectibix®), Pazopanib clorhidrato (Votrient®), Pertuzumab (Perjeta™), Pralatrexate (Folotyn®), Regorafenib (Stivarga®), Rituximab (Rituxan®), Romidepsina (Istodax®), Sorafenib tosilato (Nexavar®), Sunitinib malato (Sutent®), Tamoxifeno, Temsirolimus (Torisel®), Toremifeno (Fareston®),
10 Tositumomab y 131I-tositumomab (Bexxar®), Trastuzumab (Herceptin®), Tretinoin (Vesanoid®), Vandetanib (Caprelsa®), Vemurafenib (Zelboraf®), Vorinostat (Zolinza®), y Ziv-aflibercept (Zaltrap®).

Los compuestos contra el cáncer ilustrativos que
15 modifican la función de las proteínas que regulan la expresión génica y otras funciones celulares (por ejemplo, inhibidores de HDAC, ligandos del receptor retinoide) son Vorinostat (Zolinza®), Bexarotene (Targretin®) y Romidepsina (Istodax®), Alitretinoína (Panretin®), y
20 Tretinoína (Vesanoid®).

Los compuestos contra el cáncer ilustrativos que inducen la apoptosis (por ejemplo, inhibidores del proteosoma, antifolatos) son Bortezomib (Velcade®), Carfilzomib (Kyprolis™), y Pralatrexate (Folotyn®).

25 Los compuestos contra el cáncer ilustrativos que aumentan la respuesta inmunitaria antitumoral (por ejemplo, anti CD20, anti CD52; contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) son Rituximab (Rituxan®), Alemtuzumab (Campath®), Ofatumumab (Arzerra®), e Ipilimumab
30 (Yervoy™).

Los compuestos contra el cáncer ilustrativos que suministran agentes tóxicos a células cancerosas (por

ejemplo, fusiones de anticuerpo dirigido contra CD20 con nucleótidos; fusiones de la toxina diftérica con IL-2; fusiones de anticuerpo dirigido contra CD30-monometilauristatina E (MMAE)) son Tositumomab y ¹³¹I-tositumomab (Bexxar®) y Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), Denileukin diftitox (Ontak®), y Brentuximab vedotina (Adcetris®).

Otros compuestos contra el cáncer ilustrativos son inhibidores de molécula pequeña y conjugados de los mismos de, *por ejemplo*, quinasa Janus, ALK, Bcl-2, PARP, PI3K, receptor de VEGF, Braf, MEK, CDK, y HSP90.

Los compuestos contra el cáncer basados en platino ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, Nedaplatino, Triplatino, y Lipoplatino. Otros fármacos basados en metales adecuados para el tratamiento incluyen, aunque no de forma limitativa, los compuestos rutenados, derivados de ferroceno, compuestos titanados, y compuestos derivados de galio.

En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico contra el cáncer. es un resto radioactivo que comprende un radionucleido. Los radionucleidos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, Cr-51, Cs-131, Ce-134, Se-75, Ru-97, I-125, Eu-149, Os-189m, Sb-119, I-123, Ho-161, Sb-117, Ce-139, In-111, Rh-103m, Ga-67, Tl-201, Pd-103, Au-195, Hg-197, Sr-87m, Pt-191, P-33, Er-169, Ru-103, Yb-169, Au-199, Sn-121, Tm-167, Yb-175, In-113m, Sn-113, Lu-177, Rh-105, Sn-117m, Cu-67, Sc-47, Pt-195m, Ce-141, I-131, Tb-161, As-77, Pt-197, Sm-153, Gd-159, Tm-173, Pr-143, Au-198, Tm-170, Re-186, Ag-111, Pd-109, Ga-73, Dy-165, Pm-149, Sn-123, Sr-89, Ho-166, P-32, Re-188, Pr-142, Ir-194, In-114m/In-114, e Y-90.

En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico contra el cáncer es un antibiótico. Por ejemplo, si se detecta la presencia de una bacteria asociada al cáncer y/o un perfil de microbioma asociado al cáncer de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, se pueden administrar antibióticos para eliminar las bacterias asociadas al cáncer del sujeto. "Antibióticos" se refiere ampliamente a compuestos capaces de inhibir o prevenir una infección bacteriana. Los antibióticos se pueden clasificar de numerosas formas, incluidos su uso para infecciones específicas, su mecanismo de acción, su biodisponibilidad, o su espectro de microorganismo diana (por ejemplo, bacterias gram positivas o gram negativas, bacterias aerobias o anaerobias, etc.) y estos se pueden usar para destruir bacterias específicas en zonas específicas del hospedador ("nichos") (Leekha, et al 2011. General Principles of Antimicrobial Therapy. Mayo Clin Proc. 86(2): 156-167). En determinadas realizaciones, se pueden usar antibióticos para dirigirse selectivamente a bacterias de un nicho específico. En algunas realizaciones, se pueden usar antibióticos conocidos para tratar una infección concreta que incluye un nicho de cáncer para dirigirse a microorganismos asociados al cáncer, incluida las bacterias asociadas al cáncer en dicho nicho. En otras realizaciones, se administran los antibióticos después del tratamiento con bacterias. En algunas realizaciones, se administran los antibióticos después del tratamiento con bacterias para eliminar los injertos.

En algunos aspectos, los antibióticos se pueden seleccionar según sus propiedades bactericidas o bacteriostáticas. Los antibióticos bactericidas incluyen mecanismos de acción que alteran la pared celular (por

ejemplo, β -lactama), la membrana celular (por ejemplo, daptomicina), o el ADN bacteriano (por ejemplo, fluoroquinolonas). Los agentes bacteriostáticos inhiben la replicación bacteriana e incluyen sulfonamidas, tetraciclinas y macrólidos, y actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Además, aunque algunos fármacos pueden ser bactericidas para determinados organismos y bacteriostáticos para otros, el conocimiento del organismo diana permite al expertos en la materia seleccionar un antibiótico con las propiedades adecuadas. En determinadas condiciones de tratamiento, los antibióticos bacteriostáticos inhiben la actividad de los antibióticos bactericidas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los antibióticos bactericidas y bacteriostáticos no se combinan.

Los antibióticos incluyen, aunque no de forma limitativa, aminoglicósidos, ansamicinas, carbacefemos, carbapenemos, cefalosporinas, glucopéptidos, lincosamidas, lipopéptidos, macrólidos, monobactamas, nitrofuranos, oxazolidononas, penicilinas, polipéptidos antibióticos, quinolonas, fluoroquinolona, sulfonamidas, tetraciclinas, y compuestos antimicobacterianos, y combinaciones de los mismos.

Los aminoglicósidos incluyen, aunque no de forma limitativa, amikacina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Netilmicina, Tobramicina, Paromomicina, y Espectinomomicina. Los aminoglicósidos son eficaces, por ejemplo, contra las bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Francisella tularensis*, y contra determinadas bacterias aerobias, pero menos eficaz contra anaerobios estrictos/facultativos. Se cree que los aminoglicósidos se unen a la subunidad

ribosómica bacteriana de 30S o 50S, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas en la bacteria.

Las ansamicinas incluyen, aunque no de forma limitativa, Geldanamicina, Herbimicina, Rifamicina, y
5 Estreptovaricina. Se cree que Geldanamicina y Herbimicina inhiben o alteran el funcionamiento de la Proteína de choque térmico 90.

Los carbacefemos incluyen, aunque no de forma limitativa, Loracarbef. Se cree que los carbacefemos
10 inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.

Los carbapenemos incluyen, aunque no de forma limitativa, Ertapenem, Doripenem, Imipenem/Cilastatin, y Meropenem. Los carbapenemos son bactericidas para bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, y son
15 antibióticos de amplio espectro. Se cree que los carbapenemos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.

Las cefalosporinas incluyen, aunque no de forma limitativa, Cefadroxil, Cefazolin, Cefalotin, Cefalothin,
20 Cefalexin, Cefaclor, Cefamandol, Cefoxitin, Cefprozil, Cefuroxima, Cefixime, Cefdinir, Cefditoren, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefpodoxima, Ceftazidima, Ceftibuten, Ceftizoxima, Ceftriaxona, Cefepima, Ceftaroline fosamil, y Ceftobiprol. Las cefalosporinas seleccionadas son eficaces,
25 *por ejemplo*, contra bacterias Gram negativas y contra las bacterias Gram positivas, incluidas *Pseudomonas*, algunas cefalosporinas son eficaces contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Se cree que las cefalosporinas inhiben la síntesis de la pared celular
30 interrumpiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes de la célula bacteriana.

Los glicopéptidos incluyen, aunque no de forma

limitativa, Teicoplanina, Vancomicina, y Telavancina. Los glicopéptidos son eficaces, por ejemplo, contra bacterias aerobias y anaerobias gram positivas incluidos MRSA y *Clostridium difficile*. Se cree que las glicopéptidos
5 inhiben la síntesis de la pared celular interrumpiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes de la célula bacteriana.

Las lincosamidas incluyen, aunque no de forma limitativa, Clindamicina y Lincomicina. Las lincosamidas
10 son eficaces, *por ejemplo*, contra bacterias anaerobias, así como *Staphylococcus*, y *Streptococcus*. Se cree que las lincosamidas se unen a la subunidad ribosómica bacteriana de 50S, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas en la bacteria.

15 Los lipopéptidos incluyen, aunque no de forma limitativa, Daptomicina. Los lipopéptidos son eficaces, por ejemplo, contra las bacterias Gram positivas. Se cree que los lipopéptidos se unen a la membrana bacteriana y producen una despolarización rápida.

20 Los macrólidos incluyen, aunque no de forma limitativa, Azitromicina, Claritromicina, Diritromicina, Eritromicina, Roxitromicina, Troleandomicina, Telitromicina, y Espiramicina. los macrólidos son eficaces, por ejemplo, contra *Streptococcus* y *Mycoplasma*. Se cree que
25 los macrólidos se unen a la subunidad ribosómica 50S de la bacteria, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas en la bacteria.

Las monovactamas incluyen, aunque no de forma limitativa, Aztreonam. Las monobactamas son eficaces, por
30 ejemplo, contra las bacterias Gram negativas. Se cree que las monobactamas inhiben la síntesis de la pared celular interrumpiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de

las paredes de la célula bacteriana.

Los nitrofuranos incluyen, aunque no de forma limitativa, Furazolidona y Nitrofurantoina.

5 Las oxazolidononas incluyen, aunque no de forma limitativa, Linezolid, Posizolid, Radezolid, y Torezolid. Se cree que las oxazolidononas son inhibidores de la síntesis de proteínas.

10 Las penicilinas incluyen, aunque no de forma limitativa, Amoxicilina, Ampicilina, Azlocilina, Carbenicilina, Cloxacilina, Dicloxacilina, Flucloxacilina, Mezlocilina, Methicilina, Nafcilina, Oxacilina, Penicilina G, Penicilina V, Piperacilina, Temocilina y Ticarcilina. Las penicilinas son eficaces, por ejemplo, contra las bacterias Gram positivas, anaerobios facultativos, por
15 ejemplo, Streptococcus, Borrelia, y Treponema. Se cree que las penicilinas inhiben la síntesis de la pared celular interrumpiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes de la célula bacteriana.

20 Las combinaciones de penicilinas incluyen, aunque no de forma limitativa, Amoxicilina/clavulanato, Ampicilina/sulbactam, Piperacilina/tazobactam y ticarcilina/clavulanato.

25 Los polipéptidos antibióticos incluyen, aunque no de forma limitativa, Bacitracina, Colistina, y Polimixina B y E. Los polipéptidos antibióticos son eficaces, por ejemplo, contra las bacterias Gram negativas. Se cree que algunos polipéptidos antibióticos inhiben pirofosfato de isoprenilo implicado en la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas, mientras que otros
30 desestabilizan la membrana bacteriana externa desplazando contraiones bacterianos.

Las quinolonas y fluoroquinolonas incluyen, aunque no

de forma limitativa, Ciprofloxacina, Enoxacina, Gatifloxacina, Gemifloxacina, Levofloxacina, Lomefloxacina, Moxifloxacina, Ácido nalidíxico, Norfloxacina, Ofloxacina, Trovafloxacina, Grepafloxacina, Esparfloxacina, y
5 Temafloxacina. Las quinolonas/fluoroquinolonas son eficaces, por ejemplo, contra *Streptococcus* y *Neisseria*. Se cree que las quinolonas/fluoroquinolonas inhiben la ADN girasa o la topoisomerasa IV bacterianas, inhibiendo de esta forma la replicación y la transcripción del ADN.

10 Las sulfonamidas incluyen, aunque no de forma limitativa, Mafenida, Sulfacetamida, Sulfadiazina, Silver sulfadiazina, Sulfadimetoxina, Sulfametoazol, Sulfametoxazol, Sulfanilimida, Sulfasalazina, Sulfisoxazol, Trimetoprim-Sulfametoxazol (Co-trimoxazol), y
15 Sulfonamidocrisoidina. Se cree que las sulfamidas inhiben la síntesis de folato mediante la inhibición competitiva de la dihidropteroato sintetasa, inhibiendo de esta forma la síntesis de ácidos nucleicos.

Las tetraciclinas incluyen, aunque no de forma
20 limitativa, Demeclociclina, Doxiciclina, Minociclina, Oxitetraciclina, y Tetraciclina. Tetraciclinas son eficaces, por ejemplo, contra las bacterias Gram negativas. Se cree que las tetraciclinas se unen a la subunidad ribosómica bacteriana de 30S, inhibiendo de esta forma la
25 síntesis de proteínas en la bacteria.

Los compuestos antimicobacterianos incluyen, aunque no de forma limitativa, Clofazimina, Dapsone, Capreomicina, Cicloserine, Etambutol, Etionamida, Isoniazid, Pirazinamida, Rifampicina, Rifabutina, Rifapentina, y
30 Estreptomina.

Los antibióticos adecuados también incluyen arsfenamina, cloranfenicol, fosfomicina, ácido fusídico,

metronidazol, mupirocina, platensimicina,
 quinupristina/dalfopristina, tigeciclina, tinidazol,
 trimetoprim amoxicillina/clavulanato,
 ampicilina/sulbactama, amfomicina ristocetina,
 5 azitromicina, bacitracina, buforina II, carbomicina,
 cecropin Pl, claritromicina, eritromicinas, furazolidona,
 ácido fusídico, Na fusidato, gramicidina, imipenem,
 indolicidina, josamicina, magainan II, metronidazol,
 nitroimidazoles, mikamicina, mutacina B-Ny266, mutacina B-
 10 JH1 140, mutacina J-T8, nisina, nisina A, novobiocina,
 oleandomicina, ostreogricina, piperacillina/tazobactam,
 pristinamicina, ramoplanina, ranalexina, reuterina,
 rifaximina, rosamicina, rosaramicina, espectinomicina,
 espiramicina, estafilomicina, estreptogramina,
 15 estreptogramina A, sinergistina, taurolidina, teicoplanina,
 telitromicina, ticarcilina/clavulanato,
 triacetiloleandomicina, tilosina, tirocidina, tirotricina,
 vancomicina, vemamicina, y virginiamicina.

En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico
 20 adicional es un agente inmunosupresor, un DMAED, un fármaco
 analgésico, un esteroide, un fármaco antiinflamatorio no
 esteroideo (AINE), o un antagonista de la citoquina, y
 combinaciones de los mismos. Los agente representativos
 incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclosporina,
 25 retinoides, corticoesteroides, derivado del ácido
 propiónico, derivado del ácido acético, derivados de ácido
 enólico, derivados de ácido fenámico, inhibidores de Cox-2,
 lumiracoxib, ibuprofeno, colina salicilato de magnesio,
 fenoprofeno, salsalato, difunisal, tolmetina, ketoprofeno,
 30 flurbiprofeno, oxaprozina, indometacina, sulindaco,
 etodolaco, ketorolaco, nabumetona, naproxeno, valdecoxib,
 etoricoxib, MK0966; rofecoxib, acetominofeno, Celecoxib,

Diclofenac, tramadol, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, tolfenámico, valdecoxib, parecoxib, etodolaco, indometacina, aspirina, ibuprofeno, 5 firocoxib, metotrexato (MTX), fármacos antipalúdicos (por ejemplo, hidroxicloroquina y cloroquina), sulfasalazina, Leflunomida, azatioprina, ciclosporina, sales de oro, minociclina, ciclofosfamida, D-penicilamina, minociclina, auranofina, tacrolimus, miocrisina, clorambucilo, agonistas 10 de TNF alfa (por ejemplo, agonistas de TNF alfa o del receptor de TNF alfa), por ejemplo, ADALIMUMAB (Humira®), ETANERCEPT (Enbrel®), INFLIXIMAB (Remicade®; TA-650), CERTOLIZUMAB PEGOL (Cimzia®; CDP870), GOLIMUMAB (Simpom®; CNTO 148), ANAKINRA (Kineret®), RITUXIMAB (Rituxan®; 15 MabThera®), ABATACEPT (Orencia®), TOCILIZUMAB (RoActemra /Actemra®), antagonistas de la integrina (TYSABRI® (natalizumab)), antagonistas de IL-1 (ACZ885 (Ilaris)), Anakinra (Kineret®)), antagonistas de CD4, antagonistas de IL-23, antagonistas de IL-20, antagonistas de IL-6, 20 antagonistas de BlyS (por ejemplo, Atacicept, Benlysta®/ LymphoStat-B® (belimumab)), inhibidores de p38, antagonistas de CD20 (Ocrelizumab, Ofatumumab (Arzerra®)), agonistas de interferon gamma (Fontolizumab), prednisolona, Prednisona, dexametasona, Cortisol, cortisona, 25 hidrocortisona, metilprednisolona, betametasona, triamcinolona, beclometasoma, fludrocortisona, desoxicorticosterona, aldosterona, Doxiciclina, vancomicina, pioglitazona, SBI-087, SCIO-469, Cura-100, Oncoxin + Viusid, TwHF, Metoxsalen, Vitamina D - 30 ergocalciferol, Milnacipran, Paclitaxel, rosiglitazona, Tacrolimus (Prograf®), RADOOL, rapamune, rapamicina, fostamatinib, fentanilo, XOMA 052, Fostamatinib disodio,

rosiglitazona, Curcumina (Longvida™), Rosuvastatina, Maraviroc, ramipril, Milnacipran, Cobiprostona, somatropina, vector de tratamiento génico tgAAC94, MK0359, GW856553, esomeprazol, everolimus, trastuzumab, inhibidores de JAK1 y
5 JAK2, inhibidores de panJAK, por ejemplo, piridona 6 tetracíclica (P6), 325, PF-956980, denosumab, antagonistas de IL-6, antagonistas de CD20, antagonistas de CTLA4, antagonistas de IL-8, antagonistas de IL-21, antagonista de IL-22, antagonistas de la integrina (Tysabri®
10 (natalizumab)), antagonistas de VEGF, antagonistas de CXCL, antagonistas de MMP, antagonistas de defensina, antagonista de IL-1 (incluidos los antagonistas de IL-1 beta), y los antagonistas de IL-23 (por ejemplo, receptores señuelo, anticuerpos antagonistas, etc.).

15 En algunas realizaciones, el agente es un agente inmunosupresor. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, aunque no de forma limitativa, corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A,
20 mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolin sódico, anti-leukotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, antagonistas de TLR, inhibidores del inflamosoma, descogestivos
25 anticolinérgicos, estabilizadores de los mastocitos, anticuerpos monoclonales dirigidos contra IgE, vacunas (por ejemplo, vacunas usadas para la vacunación donde la cantidad de alérgeno aumenta gradualmente), inhibidores de las citoquinas, tales como anticuerpos dirigidos contra IL-
30 6, inhibidores de TNF tales como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, o etanercept, y combinaciones de los mismos.

Administración

En determinados aspectos, se proporciona en el presente documento un método para administrar una composición farmacéutica descrita en el presente documento a un sujeto. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la composición farmacéutica se administra junto con la administración de un compuesto terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende las VE y/o las bacterias coformuladas con el compuesto terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra simultáneamente con el compuesto terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico adicional se administra al sujeto antes de administrar la composición farmacéutica (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos antes, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas antes, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días antes). En algunas realizaciones, el compuesto terapéutico adicional se administra al sujeto después de administrar la composición farmacéutica (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos después, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas después, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días después). En algunas realizaciones, se utiliza el mismo modo de administración para administrar tanto la composición farmacéutica como el compuesto terapéutico adicional. En algunas realizaciones, se utilizan modos de administración

diferentes para administrar la composición farmacéutica y el compuesto terapéutico adicional. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía oral mientras que el compuesto terapéutico adicional se administra mediante inyección (por ejemplo, una inyección intravenosa, intramuscular y/o intratumoral).

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas, formas farmacéuticas, y kits descritos en el presente documento se pueden administrar junto con cualquier otro tratamiento contra el cáncer convencional, tales como, por ejemplo, radioterapia y resección quirúrgica del tumor. Estos tratamientos se pueden aplicar según sea necesario y/o como se ha indicado y se pueden realizar antes, simultáneamente o después de la administración de las composiciones farmacéuticas, formas farmacéuticas, y kits descritos en el presente documento.

El régimen de dosificación puede ser cualquiera de una variedad de métodos y cantidades, y el experto en la técnica puede determinarlo según factores clínicos conocidos. Como se sabe en la técnica médica, la dosis de un paciente cualquiera pueden depender de muchos factores, incluida la especie del sujeto, tamaño, el área superficial corporal, edad, el sexo, inmunocompetencia, y estado de salud general, el microorganismo concreto que se vaya a administrar, la duración y la vía de administración, el tipo y estadio de la enfermedad, por ejemplo, tamaño del tumor, y otros compuestos tales como fármacos que se van a administrar simultáneamente. Además de los factores anteriores, dichos niveles pueden verse afectados por la infectividad del microorganismo, y de la naturaleza del microorganismo, según puede determinar un experto en la materia. En los presentes métodos, niveles de dosificación

mínimos adecuados de microorganismos pueden ser niveles suficientes para que el microorganismo sobreviva, crezca y se replique. La dosis de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden adecuarse o
5 ajustarse adecuadamente dependiendo de la forma farmacéutica, de la vía de administración, del grado o estadio de la enfermedad a tratar, y similares. Por ejemplo, la dosis eficaz general de los agentes puede estar comprendida en el intervalo de 0.01 mg/kg de peso
10 corporal/día y 1000 mg/kg de peso corporal/día, entre 0.1 mg/kg de peso corporal/día y 1000 mg/kg de peso corporal/día, 0.5 mg/kg de peso corporal/día y 500 mg/kg de peso corporal/día, 1 mg/kg de peso corporal/día y 100 mg/kg de peso corporal/día, o entre 5 mg/kg de peso corporal/día
15 y 50 mg/kg de peso corporal/día. La dosis eficaz puede ser 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, o 1000 mg/kg de peso corporal/día o más, pero la dosis no se limita a las mismas.

20 En algunas realizaciones, la dosis administrada a un sujeto es suficiente para prevenir la enfermedad (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, cáncer), retrasar su inicio, o ralentizar o detener su progresión. Un experto
25 en la materia reconocerá que la dosis dependerá de una variedad de factores que incluyen la concentración del compuesto concreto utilizado, así como la edad, especie, dolencia, y peso corporal, del sujeto. El tamaño de la dosis se determinará también según la vía, calendario, y
30 frecuencia de administración, así como la existencia, naturaleza y la extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que podrían acompañar a la

administración de un compuesto concreto y el efecto fisiológico deseado.

Las dosis y regímenes de dosificación adecuados se pueden determinar mediante técnicas convencionales de
5 investigación del intervalo conocidas por las personas normalmente expertas en la materia. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, por debajo de la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, se aumenta la dosis en incrementos pequeños hasta que se
10 alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. Una dosificación eficaz y un protocolo de tratamiento se pueden determinar por medios rutinarios y convencionales, partiendo, por ejemplo, de una dosis baja en animales de laboratorio y después aumentando la dosis vigilando los
15 efectos, y también variando sistemáticamente el régimen de dosificación, análogamente. Se utilizan habitualmente estudios con animales para determinar la dosis tolerable máxima ("MTD") del agente bioactivo por kilogramo de peso. Los expertos en la materia extrapolan habitualmente las
20 dosis para conseguir la eficacia, evitando la toxicidad al mismo tiempo, en otras especies, incluyendo seres humanos.

De acuerdo con lo anterior, en aplicaciones terapéuticas, las dosificaciones de los principios activos utilizados de acuerdo con la invención variarán dependiendo
25 del principio activo, la edad, peso, y estado clínico del paciente receptor, y la experiencia clínica y criterio médico del médico o experiencia sanitario que administra la terapia, entre otros factores que afectan a la dosificación seleccionada. En general, la dosis deberá ser suficiente
30 para dar como resultado una ralentización y, preferentemente, una regresión, en el crecimiento de los tumores y, lo más preferentemente, producir una regresión

completa del cáncer.

Administraciones independientes pueden incluir cualquier número de dos o más administraciones, incluidas dos, tres, cuatro, cinco o seis administraciones. El
5 experto en la técnica puede determinar fácilmente el número de administraciones para realizar, o la deseabilidad de realizar, una o más administraciones adicionales de acuerdo con métodos conocidos en la materia para supervisar los métodos terapéuticos y otros métodos de supervisión
10 proporcionados en el presente documento. Por consiguiente, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen métodos para proporcionar al sujeto una o más administraciones de una composición farmacéutica, donde el número de administraciones se puede determinar realizando
15 una supervisión del sujeto, y, basándose en los resultados de la supervisión, determinar si se proporcionan o no una o más administraciones adicionales. La decisión de si proporcionar o no administraciones adicionales se puede basar en una amplia variedad de resultados de supervisión.

20 El período de tiempo entre las administraciones puede ser cualquiera de una gran variedad de los periodos de tiempo. El período de tiempo entre administraciones puede ser función de cualquiera de una gran variedad de factores, incluidas las etapas de supervisión, tal como se describe
25 con respecto al número de administraciones, el período de tiempo para que un sujeto desencadene una respuesta inmunitaria y/o el período de tiempo para que un sujeto aclare la VE del tejido normal. En un ejemplo, el periodo de tiempo puede depender del periodo de tiempo para que el
30 sujeto desencadene una respuesta inmunitaria; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que el período de tiempo para que un sujeto desencadene una respuesta

inmunitaria, tal como más de aproximadamente una semana, más de aproximadamente diez días, más de aproximadamente dos semanas, o más de aproximadamente un mes; en otro ejemplo, el período de tiempo puede ser menor que el

5 período de tiempo para que un sujeto desencadene una respuesta inmunitaria, tal como menos de aproximadamente una semana, menos de aproximadamente diez días, menos de aproximadamente dos semanas, o menos de aproximadamente un mes. En otro ejemplo, el periodo de tiempo puede depender

10 del periodo de tiempo para que el sujeto aclare la VE del tejido normal; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que el período de tiempo para que un sujeto aclare la VE del tejido normal, tal como más de aproximadamente día, más de aproximadamente dos días, más de aproximadamente

15 tres días, más de aproximadamente cinco días, o más de aproximadamente una semana.

En algunas realizaciones, la administración de un compuesto terapéutico adicional junto con la composición farmacéutica descrita en el presente documento reduce los

20 efectos adversos y/o mejora la eficacia del compuesto terapéutico adicional.

La dosis eficaz de un compuesto terapéutico adicional descrito en el presente documento es la cantidad del agente terapéutico que es eficaz para conseguir la respuesta

25 terapéutica deseada para un paciente en particular, la composición y el modo de administración, con la mínima toxicidad para el paciente. El nivel de dosificación eficaz se puede identificar usando los métodos descritos en el presente documento y dependerá de una variedad de factores

30 farmacocinéticos entre los que se incluyen la actividad de las composiciones concretas administradas, de la vía de administración, del tiempo de administración, la tasa de

excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con el antagonista particular empleado, la edad, el sexo, peso, afección, estado de salud general y
5 antecedentes médicos del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las prácticas médicas. En general, una dosis eficaz de un compuesto terapéutico adicional será la cantidad del agente terapéutico que sea la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico.
10 Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores anteriormente descritos.

La toxicidad de un compuesto terapéutico adicional es el nivel de efectos adversos experimentados por el sujeto durante y después del tratamiento. Los eventos adversos
15 asociados con la toxicidad del compuesto terapéutico adicional incluyen, aunque no de forma limitativa, dolor abdominal, indigestión ácida, reflujo ácido, reacciones alérgicas, alopecia, anafilaxia, anemia, ansiedad, falta de apetito, artralgias, astenia, ataxia, azotemia, pérdida de equilibrio, dolor de huesos, hemorragia, coágulos
20 sanguíneos, tensión arterial baja, tensión arterial alta, problemas respiratorios, bronquitis, aparición de hematomas, recuento bajo de glóbulos blancos, recuento bajo de glóbulos rojos, recuento bajo de plaquetas, cardiotoxicidad, cistitis, cistitis hemorrágica, arritmias, valvulopatía cardíaca, cardiomiopatía, cardiopatía de coronarias, cataratas, neurotoxicidad central, deterioro cognitivo, confusión, conjuntivitis, estreñimiento, tos, calambres, cistitis, trombosis venosa profunda,
25 deshidratación, depresión, diarrea, mareos, boca seca, piel seca, dispepsia, disnea, edema, desequilibrio electrolítico, esofagitis, cansancio, falta de fertilidad,

fiebre, flatulencia, enrojecimiento, reflujo gástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, dolor genital, granulocitopenia, ginecomastia, glaucoma, caída del cabello, síndrome de la mano y el pie, cefalea, pérdida de
5 audición, insuficiencia cardíaca, palpitaciones cardíacas, ardor de estómago, hematoma, cistitis hemorrágica, hepatotoxicidad, hiperamilasemia, hipercalcemia, hipercloremia, hiperglucemia, hiperpotasemia, hiperlipasemia, hipermagnesemia, hipernatremia,
10 hiperfosfatemia, hiperpigmentación, hipertrigliceridemia, hiperuricemia, hipoalbuminemia, hipocalcemia, hipocloremia, hipoglucemia, hipopotasemia, hipomagnesemia, hiponatremia, hipofosfatemia, impotencia, infección, reacciones en el lugar de la inyección, insomnio, deficiencia de hierro,
15 picor, dolor articular, insuficiencia renal, leucopenia, disfunción hepática, pérdida de memoria, menopausia, llagas bucales, mucositis, dolor muscular, mialgias, mielosupresión, miocarditis, fiebre neutropénica, náuseas, nefrotoxicidad, neutropenia, hemorragia nasal, mareos,
20 ototoxicidad, dolor, eritrodiseptesia palmar-plantar, pancitopenia, pericarditis, neuropatía periférica, faringitis, fotofobia, fotosensibilidad, neumonía, neumonitis, proteinuria, embolia pulmonar, fibrosis pulmonar, toxicidad pulmonar, exantema, frecuencia cardíaca
25 elevada, hemorragia rectal, intranquilidad, rinitis, convulsiones, dificultad para respirar, sinusitis, trombocitopenia, tinnitus, infección del tracto urinario, hemorragia vaginal, sequedad vaginal, vértigo, retención de líquidos, debilidad, pérdida de peso, aumento de peso, y
30 xerostomia. En general, la toxicidad es aceptable si los beneficios que el sujeto consigue mediante la terapia superan los efectos adversos que el sujeto experimenta

debido a la terapia.

Trastornos inmunitarios

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren al tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado a una respuesta inmunitaria patológica, tal como una enfermedad autoinmunitaria, una reacción alérgica y/o una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es la enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cualquier sujeto que lo necesite. Tal como se usa en el presente documento, un "*sujeto que lo necesite*" incluye cualquier sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a una respuesta inmunitaria patológica (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria del intestino), así como cualquier sujeto que tenga mayor probabilidad de adquirir dicha enfermedad o trastorno.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar, por ejemplo, como una composición farmacéutica para prevenir o tratar (reducir, parcial o completamente, los efectos adversos de) una enfermedad autoinmunitaria, tal como una enfermedad inflamatoria del intestino crónica, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, síndrome de Muckle-Wells, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, o enfermedad de Hashimoto; una enfermedad alérgica, tal como una alergia alimentaria, polinosis, o asma; una enfermedad infecciosa, tal como una infección por *Clostridium difficile*; una enfermedad inflamatoria tal como una enfermedad inflamatoria mediada por TNF (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal,

tal como puquitis, una dolencia inflamatoria cardiovascular, tal como aterosclerosis, o una enfermedad inflamatoria pulmonar, tal como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica); una composición farmacéutica para
5 suprimir el rechazo en el trasplante de órganos u otras situaciones en las que puede producir el rechazo de tejido; un complemento, alimento, o bebida para mejorar las funciones inmunitarias; o un reactivo para suprimir la proliferación o la función de las células inmunitarias.

10 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento son útiles para el tratamiento de la inflamación. En determinadas realizaciones, la inflamación del cualquier tejido y órganos del cuerpo, incluida la inflamación del musculoesquelético, inflamación
15 vascular, inflamación neural, inflamación del sistema digestivo, inflamación ocular, inflamación del sistema reproductor, y otras inflamaciones, tal como se analiza más adelante.

Los trastornos inmunitarios del sistema
20 musculoesquelético incluyen, aunque no de forma limitativa, aquellas dolencias que afectan las articulaciones esqueléticas, incluidas las articulaciones de la mano, muñeca, codo, hombro, mandíbula, columna vertebral, cuello, cadera, rodilla, tobillo y el pie, y las dolencias que
25 afectan a los tejidos que conectan los músculos a los huesos tales como los tendones. Los ejemplos de dichos trastornos inmunitarios, que se pueden tratar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, artritis
30 (incluida, por ejemplo, artrosis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis infecciosa aguda y crónica, artritis asociada con la gota y

la pseudogota, y artritis idiopática juvenil), tendinitis, sinovitis, tenosinovitis, bursitis, fibrositis (fibromialgia), epicondilitis, miositis, y osteítis (incluidos, por ejemplo, enfermedad de Paget, osteítis del pubis, y osteítis fibrosa quística).

Los trastornos inmunitarios oculares se refieren a un trastornos inmunitarios que afectan a cualquier estructura del ojo, incluidos los párpados. Los ejemplos de trastornos inmunitarios oculares que se pueden tratar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, blefaritis, blefarocalasis, conjuntivitis, dacrioadenitis, queratitis, queratoconjuntivitis seca (sequedad del ojo), escleritis, triquiasis, y uveítis

Los ejemplos de trastornos inmunitarios del sistema nervioso que se pueden tratar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, encefalitis, síndrome de Guillain-Barre, meningitis, neuromiotonía, narcolepsia, esclerosis múltiple, mielitis y esquizofrenia. Los ejemplos de inflamación de la vasculatura o del sistema linfático que se pueden tratar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, arteroesclerosis, artritis, flebitis, vasculitis, y linfangitis.

Los ejemplos de trastornos inmunitarios del sistema digestivo que se pueden tratar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, colangitis, colecistitis, enteritis, enterocolitis, gastritis, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria del intestino, ileitis, y proctitis. Las enfermedades inflamatorias del intestino

incluyen, por ejemplo, determinadas formas reconocidas en la técnica de un grupo de dolencias relacionadas. Se conocen varias formas importantes de enfermedades inflamatorias del intestino, donde la enfermedad de Crohn
5 (enfermedad regional del intestino (por ejemplo,, formas inactivas y activas) y colitis ulcerosa (por ejemplo, formas inactivas y activas) son los más frecuentes de estos trastornos. Además, la enfermedad inflamatoria del intestino abarca el síndrome del intestino irritable,
10 colitis microscópica, enteritis linfocítica-plasmocítica, enfermedad celiaca, colitis colágena, colitis linfocítica, y enterocolitis eosinófila. Otras formas menos comunes de IBD incluyen la colitis indeterminada, colitis pseudomembranosa (colitis necrosante), enfermedad
15 inflamatoria del intestino isquémica, enfermedad de Behcet, sarcoidosis, esclerodermia, displasia asociada a IBD, masas o lesiones asociadas a displasia, y colangitis esclerosante primaria.

Los ejemplos de trastornos inmunitarios del sistema
20 reproductivo que se pueden tratar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, cervicitis, corioamnionitis, endometritis, epididimitis, onfalitis, ooforitis, orquitis, salpingitis, abscesos del canal ovárico, uretritis,
25 vaginitis, vulvitis, y vulvodinia.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para tratar dolencias autoinmunitarias que tienen un componente inflamatorio. Dichas afecciones incluyen, aunque no de forma limitativa,
30 alopecia universalizada diseminada aguda, enfermedad de Behcet, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, disautonomía, encefalomiелitis, espondilitis anquilosante,

anemia aplásica, hidradenitis supurativa, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus de tipo 1, arteritis de células gigantes, síndrome de Goodpasture, 5 enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso, colitis microscópica, poliarteritis microscópica, enfermedad del tejido conectivo mixto, síndrome de Muckle-Wells, esclerosis múltiple, 10 miastenia grave, síndrome de opsoclonía-mioclónia, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, poliarteritis nodosa, polimialgia, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, granulomatosis de Wegener, anemia hemolítica autoinmunitaria por anticuerpos 15 calientes, cistitis intersticial, enfermedad de Lyme, morfea, psoriasis, sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa y vitíligo.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para tratar enfermedades de 20 hipersensibilidad mediadas por linfocitos T que tienen un componente inflamatorio. Dichas afecciones incluyen, aunque no de forma limitativa, hipersensibilidad por contacto, dermatitis de contacto (incluida la debida a la hiedra venenosa), urticaria, alergias cutáneas, alergias 25 respiratorias (fiebre del heno, rinitis alérgica, alergia a los ácaros del polvo doméstico) y enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca).

Otros trastornos inmunitarios que se pueden tratar con los métodos y composiciones incluyen, por ejemplo, 30 apendicitis, dermatitis, dermatomiositis, endocarditis, fibrositis, gingivitis, glositis, hepatitis, hidradenitis supurativa, iritis, laringitis, mastitis, miocarditis,

nefritis, otitis, pancreatitis, parotiditis, pericarditis, periodontitis, faringitis, pleuritis, neumonitis, prostatitis, pielonefritis y estomatitis, rechazo de trasplantes (incluyendo órganos tales como riñón, hígado, el corazón, pulmón, páncreas (por ejemplo, células de islote), médula ósea, córnea, intestino delgado, aloinjertos de piel, homoinjertos de piel y xenoinjertos de válvulas cardíacas, enfermedad del suero y enfermedad de injerto contra hospedador), pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, síndrome de Sezary, hiperplasia adrenal congénita, tiroiditis no supurativa, hipercalcemia asociada con el cáncer, pénfigo, dermatitis bullosa herpetiforme, eritema multiforme grave, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, rinitis alérgica estacional o perenne, asma bronquial, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, reacciones de hipersensibilidad a fármacos, conjuntivitis alérgica, queratitis, herpes zóster oftálmico, iritis y oiridociclitis, corioretinitis, neuritis óptica, sarcoidosis sintomática, quimioterapia para la tuberculosis pulmonar fulminante o diseminada, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, trombocitopenia secundaria en adultos, anemia hemolítica (autoinmunitaria) adquirida, leucemia y linfomas en adultos, leucemia aguda de la infancia, enteritis regional, vasculitis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rechazo al trasplante de órganos sólidos, septicemia. Los tratamientos preferidos incluyen el tratamiento del rechazo de trasplante, artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, psoriasis,

enfermedad pulmonar obstructiva crónica, e inflamación que acompaña dolencias infecciosas (por ejemplo, septicemia).

Trastornos metabólicos

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para tratar trastornos metabólicos y síndromes metabólicos. Dichas afecciones incluyen, aunque no de forma limitativa, diabetes de tipo II, encefalopatía, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Krabbe, galactosemia, fenilcetonuria (FC), y enfermedad del jarabe de arce en la orina. Por consiguiente, en determinadas realizaciones proporcionadas en el presente documento hay métodos para tratar enfermedades metabólicas que comprenden administrar a un sujeto una composición que se proporciona en el presente documento. En determinadas realizaciones, la enfermedad metabólica es la diabetes de tipo II, encefalopatía, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Krabbe, galactosemia, fenilcetonuria (FC), o enfermedad del jarabe de arce en la orina.

Cáncer

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren al tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, cualquier cáncer se puede tratar usando los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar según los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinal, intestino, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua, o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no

se limita estos: neoplasia, maligno; carcinoma; carcinoma, no diferenciado; carcinoma de células gigantes y en husillo; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial;

5 carcinoma de células basales; carcinoma de matriz pilosa; carcinoma de células transicionales; carcinoma de células transicionales papilares; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados;

10 adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoideo quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis familiar del colon; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromofobo; carcinoma

15 acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células transparentes; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma de la corteza suprarrenal;

20 carcinoma endometroide; carcinoma del apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma papilar seroso; cistadenocarcinoma

25 mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma del conducto de infiltración; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamario; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; de

30 adenocarcinoma con metaplasia de células escamosas; timoma, maligno; tumor estromal ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células granulosas, maligno; y roblastoma,

maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células
de Leydig, maligno; tumor de lipocitos, maligno;
paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario,
maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma
5 maligno; melanoma amelanocítico; melanoma de diseminación
superficial; melanoma maligno en nevus pigmentado gigante;
melanoma de células epitelioides; nevus azul, maligno;
sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno;
mixosarcoma; liposarcoma; leiomiosarcoma; rabdomiosarcoma;
10 rabdomiosarcoma embriónico; rabdomiosarcoma alveolar;
sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor misto
mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma;
mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor
filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno;
15 disgerminoma; carcinoma embriónico; teratoma, maligno;
tumor estromal ovárico, maligno; coriocarcinoma;
mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma,
maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno;
linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical;
20 condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma
mesenquimal; tumor de células gigantes del hueso; sarcoma
de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma
amelobástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma
amelobástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno;
25 ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico;
astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma;
oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodermo
primitivo; sarcoma cerebelar; ganglioneuroblastoma;
neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo;
30 meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma,
maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma
maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin;

paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoides; otros linfomas no de Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; 5 sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia de basófilos; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de 10 mastocitos; leucemia megacariocítica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento se refieren al tratamiento de una leucemia. El término "leucemia" se 15 refiere ampliamente a enfermedades neoplásicas progresivas malignas de los órganos hematopoyéticos y se caracteriza, de manera general, por una proliferación y desarrollo anómalo de leucocitos y de sus precursores en la sangre y médula ósea. Entre los ejemplos no limitantes de 20 enfermedades leucémicas se incluyen, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, leucemia aleucémica, leucemia 25 leucocitémica, leucemia de basófilos, leucemia de citoblastos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embriónica, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia blastocítica, leucemia subleucémica, 30 leucemia de células no diferenciadas, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia blastocítica, leucemia

monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia mieloide granulocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, y leucemia promielocítica.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento se refieren al tratamiento de un carcinoma. El término "carcinoma" se refiere a un crecimiento nuevo maligno desarrollado a partir de células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos que lo rodean y/o resiste las señales de muerte celular fisiológicas y no fisiológicas y da lugar a metástasis. Los ejemplos no limitativos de tipos de carcinomas incluyen, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenocístico, carcinoma adenoideo quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza adrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloidal, comedocarcinoma, carcinoma endométrico, carcinoma cerebriforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epienoide, carcinoma epitelial adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma ex

ulcere, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma microcítico, carcinoma solanoide, carcinoma de
5 células esferoideas, carcinoma de células en husillo, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma ganglionar, carcinoma telangiectáltico, carcinoma telangiectodes, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberoso,
10 carcinoma tuberoso, carcinoma verrucoso, carcinoma vellosa, carcinoma de células gigantes, carcinoma glandular, carcinoma de células granulosa, carcinoma de matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino,
15 carcinoma hipernefroide, carcinoma embriónico infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma macrocítico, carcinoma lenticular, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso,
20 carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma molle, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoso, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoso, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatodes, carcinoma nasofaríngeo,
25 carcinoma de células en avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales del riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma
30 sarcomatoides, carcinoma schneideriano, carcinoma escirroso, y carcinoma del escroto.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones

proporcionados en el presente documento se refieren al tratamiento de un sarcoma. El término "sarcoma" se refiere de forma general a un tumor que está compuesto por una sustancia análoga al tejido conectivo embrionario y que generalmente está compuesto de células bien empaquetadas incluidas en una sustancia fibrilar, heterogénea u homogénea. Los sarcomas incluyen, aunque no de forma limitativa, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de las partes blandas, sarcoma amelobástico, sarcoma botrioide, cloroma sarcoma, carcinoma coriónico, sarcoma embriónico, sarcoma del tumor de Wilms, sarcoma granulocítico, sarcoma Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de linfocitos B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de linfocitos T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma cerocístico, sarcoma sinovial sarcoma, y sarcoma telangiectáltico.

Las neoplasias ilustrativas adicionales que se pueden tratar usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen la enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón microcíticos, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon,

insulinoma pancreático maligno, carcinoma maligno, lesiones cutáneas precancerosas, cáncer de testículos, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, 5 cáncer de cuello uterino, cáncer del endometrio, plasmacitoma, cáncer colorrectal, cáncer de recto, y cáncer de la corteza suprarrenal.

En algunas realizaciones, el cáncer tratado es un melanoma. Se entiende que término "melanoma" significa un 10 tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los ejemplos no limitativos de melanomas son el melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, léntigo, melanoma maligno, melanoma maligno, melanoma acral-lentiginoso, melanoma amelanocítico, melanoma juvenil 15 benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma nodular, melanoma subungueal, o melanoma de diseminación superficial.

Las categorías concretas de tumores que se pueden tratar usando los métodos y composiciones descritos en el 20 presente documento incluyen trastornos linfoproliferativos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer del endometrio, cáncer de hueso, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, cáncer de 25 cabeza y cuello, cáncer del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de piel, cáncer de riñón, así como metástasis de todos los anteriores. Los tipos de tumores particulares incluyen carcinoma hepatocelular, hepatoma, hepatoblastoma, 30 rabdomiosarcoma, carcinoma esofágico, carcinoma de tiroides, ganglioblastoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma,

angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdoteliosarcoma, carcinoma ductal invasivo, adenocarcinoma papilar, melanoma, carcinoma pulmonar de células escamosas, carcinoma de células
5 basales, adenocarcinoma (bien diferenciado, moderadamente diferenciado, poco diferenciado o no diferenciado), carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma de células renales, hipernefroma, adenocarcinoma hipernefroide, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma
10 embriónico, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma de pulmón, incluido el microcítico, carcinoma de pulmón macrocítico y carcinoma de pulmón de células grandes, carcinoma de vejiga, glioma, astrocioma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, retinoblastoma,
15 neuroblastoma, carcinoma de colon, carcinoma rectal, neoplasias malignas hematopoyéticas incluidos todos los tipos de leucemia y linfoma que incluyen: leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia
20 linfocítica crónica, leucemia de mastocitos, mieloma múltiple, linfoma mielóide, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, plasmacitoma, cáncer colorrectal, y cáncer rectal.

Los cánceres tratados en determinadas realizaciones
25 también incluyen las lesiones precancerosas, *por ejemplo*, queratosis actínica (queratosis solar), lunares (nevos displásicos), quelitis actínica (labio de granjero), durezas cutáneas, esófago de Barrett, gastritis atrófica, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, líquen
30 plano, fibrosis de la submucosa bucal, elastosis actínica (solar) y displasia de cuello de útero.

Los cánceres tratados en algunas realizaciones

incluyen tumores no cancerosos o benignos, *por ejemplo*, de origen endodérmico, ectodérmico, o mesenquimal, que incluyen, aunque no de forma limitativa, colangioma, pólipos del colon, adenoma, papiloma, cistadenoma, adenoma
5 de células hepáticas, lunar hidatidiforme, adenoma renal tubular, papiloma escamocelular, pólipo gástrico, hemangioma, osteoma, condroma, lipoma, fibroma, linfangioma, leiomioma, rabdomioma, astrocitoma, nevus, meningioma, y ganglioneuroma.

10 Otras enfermedades y trastornos

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren al tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

15 En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren al tratamiento de enfermedades hepáticas. Dichas enfermedades incluyen, aunque no de forma limitativa, síndrome de Alagille, enfermedad hepática relacionada con alcohol,
20 Deficiencia de alfa-1 antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, tumores hepáticos benignos, Atresia biliar, Cirrosis, galactosemia, síndrome de Gilbert, Hemocromatosis, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Encefalopatía hepática, Colestasis intrahepática del
25 embarazo (CIE), Deficiencia en la lipasa ácida lisosómica (LAL-D), Quistes hepáticos, Cáncer de hígado, Ictericia del recién nacido, Enfermedad del hígado graso no alcohólico, Colangitis biliar primaria (PBC), Colangitis esclerosante primaria (PSC), síndrome de Reye, Enfermedad de
30 almacenamiento de glucógeno de Tipo I, y enfermedad de Wilson.

Los métodos descritos en el presente documento se

pueden usar para tratar enfermedades neurodegenerativas y neurológicas. En determinadas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa y/o neurológica es la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad priónica, enfermedad de Huntington, enfermedades de las neuronas motoras (MND), ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, distonía, hipertensión idiopaticintracraneal, epilepsia, enfermedad del sistema nervioso, enfermedad del sistema nervioso central, trastornos del movimiento, esclerosis múltiple, encefalopatía, neuropatía periférica, o disfunción cognitiva posterior a cirugía.

Métodos para fabricar bacterias mejoradas

En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos para fabricar bacterias diseñadas mediante ingeniería genética para la producción de las VE descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la bacteria genomanipulada está modificada para mejorar algunas propiedades deseables. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria genomanipulada está modificada para aumentar la producción de VE por las bacterias. En algunas realizaciones, la bacteria está genomanipulada para producir VE que tienen una mejor administración oral (por ejemplo, por mejora de la resistencia a ácidos y/o resistencia a ácidos biliares), para potenciar el efecto inmunomodulador y/o terapéutico de las VE que producen (por ejemplo, tanto solas como junto con otro agente terapéutico), para potenciar la inmunoactivación mediante las VE que producen y/o mejorar la fabricación de bacterias y/o de VE (por ejemplo, mayor tolerancia al oxígeno, mejor tolerancia a la congelación-descongelación, tiempos de generación más cortos). La bacteria diseñada mediante ingeniería genética se puede

producir usando cualquier técnica conocida en la materia, incluida, aunque no de forma limitativa, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por trasposón, desactivaciones genéticas, activaciones genéticas, 5 mutagénesis mediante la reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis química, mutagénesis mediante irradiación con luz ultravioleta, transformación (química o mediante electroporación), transducción de fagos, evolución dirigida, CRISPR/Cas9, o cualquier combinación de los 10 mismos.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la bacteria se modifica mediante evolución dirigida. En algunas realizaciones, la evolución dirigida comprende exponer la bacteria a una condición 15 ambiental y seleccionar la bacteria con una supervivencia o crecimiento mejorados en la condición ambiental. En algunas realizaciones, el método comprende un cribado de las bacterias mutagenizadas usando un ensayo que identifica la bacteria mejorada. En algunas realizaciones, el comprende 20 además mutagenizar las bacterias (por ejemplo, por exposición a mutágenos químicos y/o radiación UV) seguido por un ensayo para detectar las bacterias que tienen el fenotipo deseado (por ejemplo, un ensayo *in vivo*, un ensayo *ex vivo*, o un ensayo *in vitro*).

En algunas realizaciones, la bacteria proporcionada en el presente documento se modifica por exposición a un ambiente inductor de estrés (por ejemplo, un ambiente que induce estrés de la envoltura). En algunas realizaciones, el crecimiento en estas condiciones de crecimiento aumentan 25 la producción de VE por la bacteria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria se hace crecer en presencia de concentraciones inferiores a las inhibidoras 30

de un antibiótico descrito en el presente documento (por ejemplo, 0.1-1 µg/ml de cloranfenicol, o 0.1-0.3 µg/ml de gentamicina). En algunas realizaciones, los péptidos antimicrobianos del hospedador (por ejemplo, lisozimas, defensinas, y proteínas Reg) se utilizan en lugar de o junto con antibióticos. En algunas realizaciones, se utilizan péptidos antimicrobianos producidos por bacterias (por ejemplo, bacteriocinas y microcinas). En algunas realizaciones, el estrés es un estrés por temperatura (por ejemplo, crecimiento a 37-50°C). En algunas realizaciones, el estrés es un estrés por limitación de carbono (por ejemplo, crecimiento en un medio que comprende fuentes de carbono limitadas, tal como un medio con la fuente de carbono restringida a menos del 1% (p/v)). En algunas realizaciones, el estrés es un estrés salino (por ejemplo, crecimiento en un medio que contiene NaCl 0.5 M). En algunas realizaciones, el estrés es estrés por UV (por ejemplo, crecimiento con una lámpara UV, bien durante la totalidad del periodo de cultivo o solamente durante una parte del periodo de cultivo). En algunas realizaciones, el estrés es un estrés por oxígeno reactivo (por ejemplo, crecimiento en medio que contiene concentraciones inferiores a las inhibidoras de peróxido, tal como 250-1.000 µM de peróxido de hidrógeno). En algunas realizaciones, se aplica a la bacteria una combinación de los estrés divulgados en el presente documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación y purificación de VE procedentes de bacterias.

Las vesículas extracelulares (VE) se prepararon a partir de cultivos bacterianos usando métodos conocidos de los expertos en la materia (S. Bin Park, et al. PLoS ONE.

6(3):e17629 (2011)).

Por ejemplo, los cultivos de bacterias se centrifugaron a 11.000 x g durante 20-40 min a 4°C para aglomerar las bacterias. Los sobrenadantes del cultivo se
5 hicieron pasar a continuación por un filtro de 0.22 µm para excluir las células bacterianas intactas. A continuación, los sobrenadantes filtrados se concentraron usando métodos que pueden incluir, aunque no de forma limitativa, precipitación en sulfato amónico, ultracentrifugación, o
10 filtración. En resumen, para la precipitación con sulfato de amonio, se añadió sulfato de amonio 1.5-3 M para filtrar el sobrenadante lentamente, con agitación a 4°C. Las precipitaciones se incubaron a 4°C durante 8-48 horas y después centrifugarse a 11.000 x g durante 20-40 min a 4°C.
15 Los aglomerados contienen las VE bacterianas y otros residuos. En resumen, mediante ultracentrifugación, los sobrenadantes filtrados se centrifugaron a 100.000-200.000 x g durante 1-16 horas a 4°C. El aglomerado de esta centrifugación contiene las VE y otros residuos. En
20 resumen, usando una técnica de filtración, usando una centrifugación con filtro Amicon Ultra o mediante filtración en flujo tangencial, los sobrenadantes se filtraron para retener especies de peso molecular > 50 o 100 kDa.

25 Como alternativa, las VE se obtuvieron a partir de cultivos bacterianos continuamente durante el crecimiento, o en puntos temporales seleccionados durante el crecimiento, conectando un biorreactor a un sistema de flujo tangencial alternante (ATF) (por ejemplo, XCell ATF
30 de Repligen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema ATF retiene células intactas (>0.22 µm) en el biorreactor, y permite que los componentes de

menor tamaño (por ejemplo, las VE, proteínas libres) atraviesen el filtro para su recogida. Por ejemplo, el sistema se puede configurar para que el filtrado <0.22 μ m se pase a un segundo filtro de 100 kDa, permitiendo que especies como las VE entre 0.22 μ m y 100 kDa se recojan, y las especies menores de 100 kDa se devuelvan al biorreactor. Como alternativa, el sistema se puede configurar para permitir que el medio del biorreactor se rellene y/o modifique durante el crecimiento del cultivo. Las VE recogidas por este método se puede purificar y/o concentrar mediante ultracentrifugación o centrifugación, como se ha descrito anteriormente para los sobrenadantes filtrados.

Las VE obtenidas por los métodos anteriormente descritos se pueden purificar adicionalmente mediante ultracentrifugación en gradiente, usando métodos que pueden incluir, aunque no de forma limitativa, el uso de un gradiente de sacarosa o un gradiente Optiprep. En resumen, el uso de un método con gradiente de sacarosa, si se usó precipitación en sulfato amónico o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, los aglomerados se resuspenden en sacarosa al 60%, Tris 30 mM, pH 8.0. Si se usó filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se intercambia con tampón en sacarosa al 60%, Tris 30 mM, pH 8.0, con una columna Amicon Ultra. Las muestras se aplicaron a un gradiente de sacarosa discontinuo al 35-60% y se centrifugaron a 200.000 x g durante 3-24 horas a 4 °C. En resumen, usando un método en gradiente Optiprep, si se usó precipitación en sulfato amónico o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, los aglomerados se resuspenden en Optiprep al 35% en PBS. Si se usó filtración para

concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se diluye con Optiprep al 60% hasta una concentración final del 35% en Optiprep. Las muestras se aplicaron a un gradiente de sacarosa discontinuo al 35-60% y se
5 centrifugaron a 200.000 x g durante 3-24 horas a 4 °C.

Para confirmar la esterilidad y aislamiento de las preparaciones de VE, las VE se diluyen en serie en medio de agar usado para el cultivo rutinario de las bacterias a analizar, y se incuban en condiciones rutinarias. Las
10 preparaciones no estériles se hacen pasar por un filtro de 0.22 um para excluir las células intactas. Para aumentar adicionalmente la pureza, las VE aisladas se pueden tratar con DNasa o proteinasa K.

Como alternativa, para la preparación de la VE usadas
15 en inyecciones *in vivo*, las VE purificadas se procesan como se ha descrito anteriormente (G. Norheim, et al. *PLoS ONE*. 10(9): e0134353 (2015)). En resumen, después de la centrifugación en gradiente de sacarosa, las bandas que contienen las VE se resuspenden hasta una concentración
20 final de 50 µg/ml en una solución que contiene sacarosa al 3% u otra solución adecuada para su inyección *in vivo* conocida del experto en la técnica. Esta solución también puede contener adyuvantes, por ejemplo, hidróxido de aluminio a una concentración de 0-0.5% (p/v).

25 Para preparar muestras adecuadas para ensayos adicionales (por ejemplo, para eliminar la sacarosa antes de la obtención de imágenes TEM o ensayos *in vitro*), las muestras se intercambiaron con tampón en PBS o Tris 30 mM, pH 8.0 usando filtración (por ejemplo, columnas Amicon
30 Ultra), diálisis, o ultracentrifugación (200.000 x g, ≥ 3 horas, 4°C) y resuspensión.

Ejemplo 2: Marcado de las VE bacterianas

Para rastrear su biodistribución *in vivo* y cuantificarlas y localizarlas *in vitro* en las diferentes preparaciones y ensayos realizados con células de mamífero, las VE marcadas como se ha descrito anteriormente (N. Kesty, et al. *EMBO Journal*. 23: 4538-4549 (2004)).

Por ejemplo, las VE purificadas se incubaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), Cy7, o cualquier otro fluorocromo adecuado para citometría de flujo, 1:1 durante 1 hora a 25°C. La etapa de incubación se puede extender a la noche a 4°C. Para eliminar el fluorocromo adicional, las VE bien (1) se aglomeraron mediante centrifugación a 200.000 x g durante 3 h- durante la noche, se lavaron y se resuspendieron en PBS u otro tampón adecuado para aplicaciones posteriores; o (2) tampón intercambiado a PBS u otro tampón adecuado para aplicaciones posteriores mediante diálisis o mediante filtración (por ejemplo, usando una columna Amicon Ultra).

Como alternativa, las VE se obtienen de bacterias cultivadas en un medio que contiene 3-azido-D-alanina o HADA 0.8 mM. Las VE se resuspendieron o se intercambiaron con tampón en PBS y una parte se marcó adicionalmente con colorante fluorescente Dibenzo-aza-ciclooctino 10 uM (DIBAC en BSA al 1% en PBS (los colorantes incluyen Cy5, TAMRA, verde de rodamina, y Cy7) si se hacen crecer en 3-azido-D-alanina. El colorante no incorporado se elimina como se ha descrito anteriormente, mediante (1) ultracentrifugación, lavado, y resuspensión; o (2) tampón intercambiado mediante diálisis o filtración.

Las VE marcadas también se pueden generar a partir de bacterias que expresan la proteína fluorescente verde (GFP), o cualquier otra proteína fluorescente. Para las

bacterias Gram negativas, las secuencias de direccionamiento periplásmicas se añaden a las proteínas fluorescentes, de forma que se localizan adecuadamente para internalizarse en las VE a medida que se forman.

5 Se pueden usar puntos cuánticos para marcar las VE estudios no invasivos *in vivo* de obtención de imágenes (K. Kikushima, et al. *Scientific Reports*. 3(1913) (2013)). Los puntos cuánticos se conjugaron con un anticuerpo de presencia confirmada en la membrana de la VE. Las VE
10 aisladas se incubaron con conjugados de puntos cuánticos, y se eliminaron los conjugados adicionales como se ha descrito anteriormente, mediante (1) ultracentrifugación, lavado, y resuspensión; o (2) tampón intercambiado mediante diálisis o filtración.

15 Las VE marcadas de forma fluorescente se detectaron en muestras *in vitro* y *ex vivo* mediante microscopía confocal, análisis de rastreo de nanopartículas, y/o citometría de flujo. Además, las VE marcadas de forma fluorescente se detectaron en animales completos y/u órganos y tejidos
20 resecados usando un instrumento tal como un TC de espectro IVIS (Perkin Elmer), como en H-I. Choi, et al. *Experimental & Molecular Medicine*. 49: e330 (2017).

Además, las VE se pueden radiomarcas como se ha descrito anteriormente (Z. Varga et al., *Cancer Biother Radiopharm*. 2016 Jun;31(5):168-73).
25

Por ejemplo, las VE purificadas se radiomarcaron con el complejo ^{99m}Tc -tricarbonilo [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ usando un kit comercial (Isolink®; Mallinckrodt Medical B.V.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 **Ejemplo 3:** Microscopía de transmisión electrónica para visualizar la producción de bacterias de VE y VE purificadas de bacterias

Se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (TEM) para visualizar las bacterias a medida que produce VE o VE bacterianas (S. Bin Park, et al. PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011). Las VE se prepararon a partir de los cultivos bacterianos discontinuos descrito en el Ejemplo 1. Las VE se montaron en rejillas de cobre revestidas de carbono de malla 300 o 400 (Electron Microscopy Sciences, USA) durante 2 min y se lavaron con agua desionizada. Las VE se tiñeron negativamente usando acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 20 s - 1 min. Las rejillas de cobre se lavaron con agua estéril y se secaron. Se adquirieron imágenes usando un microscopio electrónico de transmisión con una tensión de aceleración de 100-120 kV. Las VE teñidas parecen de 20-250 nm de diámetro son densas en electrones. Se cribaron 10-50 campos de cada rejilla.

Ejemplo 4: Perfilado de la composición de VE y contenido

Las VE se pueden caracterizar por uno cualquiera de los diversos métodos incluidos, aunque no de forma limitativa, caracterización NanoSight, electroforesis en gel SDS-PAGE, la transferencia Western, ELISA, cromatografía líquida-espectrometría de masas y espectrometría de masas, dispersión de luz dinámica, niveles de lípidos, proteína total, relación de lípidos a proteínas, análisis de ácido nucleico y potencial zeta.

Caracterización NanoSight de las VE

El análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) se utiliza para caracterizar la distribución de tamaños de las VE bacterianas purificadas. Las preparaciones de VE purificadas se analizan en una máquina NanoSight (Malvern Instruments) para evaluar el tamaño y la concentración de las VE.

Electroforesis en gel SDS-PAGE

Para identificar los componentes de la proteína de las VE purificadas (Ejemplo 1), las muestras se analizaron en un gel Bolt Bis-Tris Plus 4-12% (Thermo-Fisher Scientific) usando técnicas convencionales. Las muestras se hirvieron en 1x tampón de muestra SDS durante 10 min, se enfriaron a 4°C, y después se centrifugaron a 16.000 x g durante 1 min. Las muestras se analizaron después en un gel SDS-PAGE y se tiñeron usando una de varias técnicas convencionales (por ejemplo, tinción de plata, azul de Coomassie, Gel Code Blue) para visualización de las bandas.

Análisis de transferencia de Western

Para identificar y cuantificar componentes de proteína específicos de las VE, las proteínas VE se separaron mediante SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente y se sometieron a análisis por transferencia Western (Cvjetkovic et al., *Sci. Rep.* **6**, 36338 (2016) y se cuantificaron mediante ELISA.

Espectrometría de masas/cromatografía líquida (CL-EM/EM) y espectrometría de masas

Las proteínas presentes en las VE se identificaron y cuantificaron por técnicas de espectrometría de masas. Además, el contenido metabólico se dilucidó usando técnicas de cromatografía líquida combinadas con espectrometría de masas. Existe una variedad de técnicas para determinar el contenido metabolónico de diferentes muestras, y son conocidas del expertos en la materia que implican extracción con disolventes, separación cromatográfica y una variedad de técnicas de ionización acopladas con la determinación de la masa (Roberts et al 2012 Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 30: 1-24; Dettmer et al 2007, *Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev.* 26(1):51-78). Como ejemplo no limitativo, un sistema

CL-EM incluye un espectrómetro de masas 4000 QTRAP triple cuadrupolo (AB SCIEX) combinada con una bomba 1100 Series (Agilent) y un automuestreador HTS PAL (Leap Technologies). Muestras de medio u otras mezclas metabólicas complejas (~10 µl) se extrajeron usando nueve volúmenes de 74.9:24.9:0.2 (v/v/v) de acetonitrilo/metanol/ácido fórmico que contienen patrones internos marcados con isótopos estables (valina-d8, Isotec; y fenilalanina-d8, Cambridge Isotope Laboratories). Los patrones se pueden ajustar o modificar dependiendo de los metabolitos de interés. Las muestras se centrifugaron (10 min, 9.000g, 4 °C), y los sobrenadantes (10 µl) se enviaron al CLEM por inyección de la solución en una columna HILIC (150 × 2.1 mm, tamaño de partícula de 3 µm). La columna se eluye haciendo fluir una fase móvil al 5% [formiato de amonio 10 mM, ácido fórmico al 0.1% en agua] durante 1 min a un caudal de 250 µl/min seguido por un gradiente lineal durante 10 min hasta una solución de 40% de fase móvil [acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%]. La tensión del pulverizador de iones se ajustó a 4.5 kV y la temperatura de la fuente es de 450 °C.

Los datos se analizaron usando un programa informático comercialmente disponible tal como Multiquant 1.2 de AB SCIEX para la integración de los picos del espectro de masas. Los picos de interés deben extraerse manualmente y compararse con patrones para confirmar la identidad del pico. Se realiza la cuantificación con patrones adecuados para determinar el número de los metabolitos presentes en el medio inicial, después del acondicionado de las bacterias, y después del crecimiento de células tumorales.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

Las mediciones de DLS, incluida la distribución de las partículas de diferentes tamaños en diferentes

preparaciones de VE se realiza usando instrumentos tales como el DynaPro NanoStar (Wyatt Technology) y el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Niveles de lípidos

5 Los niveles de lípidos se cuantificaron usando FM4-64 (Life Technologies), por métodos similares a los descritos en A.J. McBroom *et al.* *J Bacteriol* 188:5385-5392. y A. Frias, *et al.* *Microb Ecol.* 59:476-486 (2010). Las muestras se incubaron con FM4-64 (3.3 µg/ml en PBS durante 10 min a 10 37°C en la oscuridad). Tras la excitación a 515 nm, se mide la emisión a 635 nm usando un lector de placas Spectramax M5 (Molecular Devices). Las concentraciones absolutas se determinaron por comparación de las muestras desconocidas con patrones (tales como vesículas de 15 palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG)) de concentraciones conocidas.

Proteína total

 Los niveles de proteínas se cuantificaron por ensayos convencionales tales como los ensayos Bradford y BCA. El 20 ensayo Bradford se realiza usando el reactivo Quick Start Bradford 1x Dye (Bio-Rad), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los ensayos BCA se realizaron usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo-Fisher Scientific). Las concentraciones absolutas se determinaron 25 por comparación con una curva patrón generada a partir de BSA de concentraciones conocidas.

Relaciones lípido:proteína

 Las relaciones lípido:proteína se generan dividiendo las concentraciones de lípido por las concentraciones de 30 proteína. Esto proporciona una medida de la pureza de las vesículas, en comparación con la proteína libre, para cada preparación.

Análisis de ácido nucleico

Los ácidos nucleicos se extrajeron de las VE y se cuantificaron utilizando un fluorímetro Qubit. La distribución de tamaños se evaluó con un BioAnalyzer y el material se secuenció.

Potencial zeta

El potencial zeta de diferentes preparaciones se midió usando instrumentos tales como el Zetasizer ZS (Malvern Instruments).

10 **Ejemplo 5:** Manipulación de las bacterias mediante estrés para producir diferentes cantidades de las VE y/o para variar el contenido de las VE

El estrés, y especialmente, el estrés de la envoltura, ha mostrado aumentar la producción de las VE en algunas cepas bacterianas (I. MacDonald, M. Kuehn. *J Bacteriol* 195(13): doi: 10/1128/JB.02267-12). Para variar la producción de las VE por las bacterias, las bacterias se estresan usando diferentes métodos.

Las bacterias se pueden someter a estresores individuales o estresores combinados. Los efectos de los diferentes estresores sobre las diferentes bacterias se determina empíricamente variando la condición de estrés y determinando el valor de la CI50 (las condiciones necesarias para inhibir el crecimiento celular en un 50%).

25 La purificación, cuantificación, y caracterización se realiza como se detalla en los Ejemplos 1-4. La producción de VE se cuantificó (1) en muestras complejas de bacterias y VE mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) o microscopio electrónico de transmisión (TEM); o (2)

30 siguiendo la purificación de VE por NTA, cuantificación de lípidos, o cuantificación de proteínas. El contenido de VE se evaluó después de la purificación por los métodos

anteriormente descritos.

Estrés por antibióticos

Las bacterias se cultivaron en condiciones de crecimiento normalizadas con la adición de concentraciones de antibióticos inferiores a las inhibidoras. Estas pueden incluir 0.1-1 µg/ml de cloranfenicol, o 0.1-0.3 µg/ml de gentamicina, o concentraciones similares de otros antibióticos (por ejemplo, ampicilina, polimixina B). Los productos antimicrobianos del hospedador tales como lisozimas, defensinas, y proteínas Reg se pueden utilizar en lugar de los antibióticos. Los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, incluidas las bacteriocinas y las microcinas también se pueden utilizar.

Estrés por temperatura

Las bacterias se cultivaron en condiciones de crecimiento normalizadas, pero a temperaturas mayores o menores de las habituales para su crecimiento. Como alternativa, las bacterias se hacen crecer en condiciones normalizadas, y después se someten a choque térmico por frío o calor mediante incubación durante un corto periodo de tiempo a temperaturas altas o bajas, respectivamente. Por ejemplo, una bacteria que crece a 37°C se incuba durante 1 hora a 4°C-18°C para choque por frío o 42°C-50°C para choque por calor.

Privación y limitación de nutrientes

Para inducir estrés nutricional, las bacterias se cultivan en condiciones en las que uno o más nutrientes están limitados. Las bacterias se pueden someter a estrés nutricional durante el crecimiento o cambiarse de un medio rico a un medio pobre. Algunos ejemplos de componentes del medio que están limitados son el carbono, nitrógeno, hierro, y azufre. Un medio ilustrativo es el medio mínimo

M9 (Sigma-Aldrich), que contiene baja concentración de glucosa como única fuente de carbono. Especialmente para *Prevotella spp.*, la disponibilidad de hierro se varía alterando la concentración e hemina en el medio y/o
5 variando el tipo de porfirina u otro transportador de hierro presente en el medio, ya que se ha descubierto que las células que crecen en condiciones con bajo contenido de hemina producen más cantidad de VE (S. Stubbs et al. *Letters in Applied Microbiology*. 29:31-36 (1999). Los
10 componentes del medio también se manipulan mediante la adición de quelantes tales como EDTA y deferoxamina.

Saturación

Las bacterias crecen hasta la saturación y se incubaron más allá del punto de saturación para diferentes
15 períodos de tiempo. Como alternativa, se usa medio condicionado para imitar los entornos de saturación durante el crecimiento exponencial. El medio condicionado se prepara retirando las células intactas de los cultivos saturados mediante centrifugación y filtración, como se
20 describe en el Ejemplo 1, y el medio condicionado se puede tratar adicionalmente para concentrar o eliminar componentes específicos.

Estrés salino

Las bacterias se cultivan o se exponen durante
25 periodos de tiempo cortos a medio que contiene NaCl, sales biliares, u otras sales.

Estrés por UV

El estrés por UV se consigue cultivando las bacterias bajo una lámpara UV o exponiendo las bacterias a un
30 instrumento como el Stratalinker (Agilent). La UV se puede administrar durante la totalidad del periodo de cultivo, en ráfagas cortas, o durante un único periodo definido después

del crecimiento.

Estrés por especies reactivas de oxígeno

Las bacterias se cultivan en presencia de concentraciones de peróxido de hidrógeno inferiores a las
5 inhibidoras (250-1.000 μM) para inducir estrés en forma especies de oxígeno reactivas. Las bacterias anaerobias se cultivan o se exponen a concentraciones de oxígeno que son tóxicas para ellas.

Estrés por detergente

10 Las bacterias se cultivan o se exponen a un detergente, tal como dodecil sulfato de sodio (SDS) o desoxicolato.

Estrés por pH

Las bacterias se cultivan o se exponen durante un
15 tiempo limitado a medios de diferentes pH.

Ejemplo 6: Preparación de bacterias exentas de VE

Se prepararon muestras de bacterias que contenían cantidades mínimas de VE. La producción de VE se cuantificó
(1) en muestras complejas de bacterias y componentes
20 extracelulares mediante NTA o TEM; o (2) siguiendo la purificación de VE de las muestras bacterianas, por NTA, cuantificación de lípidos, o cuantificación de proteínas.

a. Centrifugación y lavado: Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 11.000 x g para separar las células
25 intactas del sobrenadante (incluidas proteínas libres y vesículas). El aglomerado se lava con tampón, tal como PBS, y se almacena de forma estable (por ejemplo, mezclado con glicerol, congelación ultrarrápida, y se almacenaron a -80°C).

30 b. ATF: Las bacterias y las VE se separaron por conexión de un biorreactor a un sistema ATF. Las bacterias exentas de VE quedan retenidas dentro del biorreactor, y se

pueden separar adicionalmente de las VE residuales mediante centrifugación y lavado, como se ha descrito anteriormente.

- c. Las bacterias se hacen crecer en condiciones en las que se ha descubierto que se limita la producción de VE.
- 5 Las condiciones que se pueden variar incluyen las relacionadas para el Ejemplo 5.

Ejemplo 7: Cribado *in vitro* de las VE para una mayor activación de las células dendríticas

- La capacidad de las VE de *Vibrio cholerae* para activar
- 10 indirectamente las células dendríticas mediante células epiteliales es un mecanismo no limitativo mediante el cual estimulan una respuesta inmunitaria en hospedadores mamíferos (D. Chatterjee, K. Chadhuri. *J Biol Chem.* 288(6):4299-309. (2013)). Como esta actividad VE es
- 15 probable que se comparta con otras bacterias que estimulan cascadas proinflamatorias *in vivo*, se divulgan en el presente documento métodos *in vitro* para estudiar la activación de las DC mediante las VE bacterianas. En resumen, las PBMC se aislaron de sangre venosa heparinizada
- 20 de CM por centrifugación en gradiente usando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) o de bazo de ratón o médula ósea de ratón usando el kit de aislamiento de células dendríticas de sangre humana basado en perlas (Miltenyi Biotech, Cambridge, MA). Mediante un mAb dirigido contra
- 25 CD14 humano, los monocitos se purificaron mediante Moflo y se cultivaron en cRPMI a una densidad celular de 5e5 células/ml en una placa de 96 pocillos (Costar Corp) durante 7 días a 37°C. Para la maduración de las células dendríticas, el cultivo se estimuló con 0.2 ng/ml de IL-4 y
- 30 1000 U/ml GM-CSF a 37°C durante una semana. Como alternativa, la maduración se consigue mediante incubación con GM-CSF recombinante solo durante una semana. Las DC de

ratón se pueden recoger directamente de bazo usando enriquecimiento con perlas o diferenciarse de los citoblastos hematopoyéticos. En resumen, se obtuvo médula ósea de los fémures de ratones. Se recuperaron las células y se lisaron los glóbulos rojos. Los citoblastos se cultivaron en un medio de cultivo celular junto con 20 ng/ml de GM-CSF de ratón durante 4 días. Se añadió más medio que contenía 20 ng/ml de GM-CSF de ratón. En el día 6, el medio y las células no adherentes se eliminaron y se sustituyeron por medio de cultivo celular nuevo que contenía 20 ng/ml de GM-CSF. Una adición final de medio de cultivo celular con 20 ng/ml de GM-CSF se realizó el día 7. El día 10, las células no adherentes se recogieron y se sembraron en placas de cultivo celular durante la noche y se estimularon según necesidad. A continuación, las células dendríticas se trataron con 25-75 ug/ml de VE durante 24 horas con antibióticos. Las composiciones de VE analizadas pueden incluir VE de una sola especie o cepa bacteriana. Las composiciones de VE analizadas también pueden incluir una mezcla de VE de géneros bacterianos, de especies dentro de un género, o de cepas dentro de una especie. El PBS y las VE de *Lactobacillus* se incluyeron como controles negativos y LPS, anticuerpos dirigidos contra CD40 y las VE de *Bifidobacterium* spp. se utilizaron como controles positivos. Tras la incubación, Las DC se tiñeron con anti CD11b, CD11c, CD103, CD8a, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC I y MHC II, y se analizaron mediante citometría de flujo. Las DC que aumentaron significativamente en CD40, CD80, CD83, y CD86 en comparación con los controles negativos se consideran activadas por la composición de VE bacteriana asociada. Estos experimentos se repitieron tres veces como mínimo.

Para seleccionar la capacidad de las células epiteliales activadas por VE para estimular las DC, el protocolo anterior fue seguido por la adición de un cultivo simultáneo de VE de células epiteliales de 24 horas antes de la incubación con DC. Las células epiteliales se lavaron después de la incubación con las VE y a continuación se cultivaron simultáneamente con las DC en ausencia de las VE durante 24 horas antes del procesamiento que se ha descrito anteriormente. Las líneas de células epiteliales pueden incluir Int407, HEL293, HT29, T84 y CACO2.

Como medida adicional de la activación de DC, 100 µl de sobrenadante del cultivo se retiraron de los pocillos después de 24 horas de incubación de las DC con las VE o las células epiteliales tratadas con VE y se analizaron para determinar las citoquinas secretadas, las quimioquinas, y los factores de crecimiento usando el kit Luminex Magpix multiplexado (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen, los pocillos se prehumedecieron con tampón, y se añadieron 25 µl de 1x perlas magnéticas revestidas de anticuerpo y 2x 200 µl de tampón de lavado se realizaron en cada pocillo usando el imán. 50 µl de tampón de incubación, 50 µl de diluyente y 50 µl de muestras se añadieron y se mezclaron con agitación durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las perlas se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de 1X anticuerpo detector biotinilado, y la suspensión se incubó durante 1 h con agitación en la oscuridad. Dos, lavados de 200 µl se realizaron a continuación con el tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de reactivo 1x SAV-RPE a cada pocillo y se incubó durante 30 Minutos a TA en la oscuridad. Se realizaron tres lavados con 200 µl y se añadieron 125 µl de tampón de lavado con 2-3 min de

agitación. A continuación, los pocillos se enviaron para su análisis en el sistema Luminex xMAP.

Los patrones permiten una cuantificación detallada de las citoquinas, incluidas GM-CSF, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-12 (p40/p70), IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 IL-23, IL-25, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1 α , TNF α , y VEGF. Estas citoquinas se evaluaron en muestra de origen tanto humano como de ratón. Los aumentos de estas citoquinas en las muestras tratadas bacterianas indican una mayor producción de proteínas y citoquinas en el hospedador. Otras variaciones de este ensayo relativas a la capacidad de tipos celulares específicos para liberar citoquinas se evaluaron adquiriendo estas células por métodos de clasificación, y son conocidos de la persona normalmente experta en la materia. Además, la citoquina del ARNm también se evaluó para abordar la liberación de citoquinas en respuesta a una composición de VE. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria de forma similar a una respuesta *in vivo* en un microentorno de cáncer.

Este protocolo de simulación con DC se puede repetir usando combinaciones de VE purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunitaria.

Ejemplo 8: Cribado *in vitro* de las VE para una mayor activación de linfocitos T CD8+ destructores cuando se incuban con células tumorales

Se describen métodos *in vitro* para cribar VE que puedan activar la destrucción de células tumorales mediante linfocitos T CD8+. En resumen, las DC se aislaron de PBMC humana o bazos de ratón y se incubaron con VE de una sola

cepa, mezclas de VE, y los controles adecuados como se describe en el Ejemplo 12. Además, los linfocitos T CD8+ se obtuvieron de PBMC humana o bazo de ratón usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD8+ de ratón basado en perlas magnéticas, y el kit de aislamiento de linfocitos T CD8+ de ser humano basado en perlas magnéticas (ambos de Miltenyi Biotech, Cambridge, MA). Después de las 24 horas de incubación de las DC con VE, o las DC con células epiteliales estimuladas con VE (se detalla en el Ejemplo 12), las VE se retiraron de las células por lavados con PBS, 100 μ l de medio reciente con antibióticos se añadieron a cada pocillo, y se añadieron 200.000 linfocitos T a cada pocillo experimental de la placa de 96 pocillos. Se añadió un anticuerpo dirigido contra CD3 a una concentración final de 2 mg/ml. Se dejó que los cultivos simultáneos se incubaran a 37°C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

72 horas después de la incubación del cultivo simultáneo, 50.000 células tumorales/pocillo se sembraron por pocillo en placas de 96 pocillos nuevas. Las líneas de células tumorales usadas incluyen B16.F10, SIY+ B16.F10, y otras. Las líneas de células tumorales se emparejaron según HLA con el donante, y pueden incluir las líneas de células PANC-1, UNKPC960/961, UNKC, y HELA. Después de la finalización del cultivo simultáneo de 96 horas, 100 μ l de la mezcla de linfocitos T CD8+, y DC se transfirieron a los pocillos que contenían células tumorales. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones normales de oxígeno. Se usó estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte de las células.

Después de esta incubación, se usó la citometría de flujo para medir la muerte de las células tumorales y

caracterizar el fenotipo de las células inmunitarias. En resumen, las células tumorales se tiñeron con tinte de viabilidad. Se usó el análisis FACS para clasificar específicamente respecto a células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (destruidas). Los datos también se presentan como la cantidad absoluta de células tumorales muertas por pocillo. El fenotipo de linfocitos T CD8+ citotóxicos se puede caracterizar por los siguientes métodos: a) concentración de granzyme B en el sobrenadante, IFN γ y TNF α en el sobrenadante del cultivo como se describe a continuación, b) expresión en la superficie de los linfocitos T CD8+ de marcadores de activación tales como DC69, CD25, CD154, PD-1, gamma/delta TCR, Foxp3, T-bet, granzyme B, c) tinción de citoquinas intracelulares para IFN γ , granzyme B, TNF α en linfocitos T CD8+. El fenotipo de los linfocitos T CD4+ también se puede evaluar mediante tinción de citoquinas intracelulares además de la concentración de citoquinas en el sobrenadante incluidos IFN γ , TNF α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, quimioquinas, etc.

Como medida adicional de la activación de linfocitos T CD8+, 100 μ l de sobrenadante del cultivo se retiraron de los pocillos después de 96 horas de incubación de los linfocitos T con las DT y se analizaron par determinar las citoquinas secretadas, las quimioquinas, y los factores de crecimiento usando el kit Luminex Magpix multiplexado (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen, los pocillos se prehumedecieron con tampón, y se añadieron 25 μ l de 1x perlas magnéticas revestidas de anticuerpo y 2x 200 μ l de tampón de lavado se realizaron en cada pocillo usando el imán. 50 μ l de tampón de incubación, 50 μ l de diluyente y 50 μ l de muestras se añadieron y se mezclaron con agitación

durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las perlas se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de 1X anticuerpo detector biotinilado, y la suspensión se incubó durante 1 h con agitación en la oscuridad. Dos, lavados de 200 µl se realizaron a continuación con el tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de reactivo 1x SAV-RPE a cada pocillo y se incubó durante 30 Minutos a TA en la oscuridad. Se realizaron tres lavados con 200 µl y se añadieron 125 µl de tampón de lavado con 2-3 min de agitación. A continuación, los pocillos se enviaron para su análisis en el sistema Luminex xMAP.

Los patrones permiten una cuantificación detallada de las citoquinas, incluidas GM-CSF, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-12 (p40/p70), IL-17, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1α, TNFα, y VEGF. Estas citoquinas se evaluaron en muestra de origen tanto humano como de ratón. Los aumentos de estas citoquinas en las muestras tratadas bacterianas indican una mayor producción de proteínas y citoquinas en el hospedador. Otras variaciones de este ensayo relativas a la capacidad de tipos celulares específicos para liberar citoquinas se evaluaron adquiriendo estas células por métodos de clasificación, y son conocidos de la persona normalmente experta en la materia. Además, la citoquina del ARNm también se evaluó para abordar la liberación de citoquinas en respuesta a una composición de VE. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria de forma similar a una respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

Este protocolo de simulación con linfocitos T CD8+ se puede repetir usando combinaciones de VE purificadas y

cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunitaria.

Ejemplo 9: Cribado *in vitro* de las VE para una mayor destrucción de células tumorales mediante PBMC

5 Se incluyen métodos para cribar las VE por su capacidad para estimular las PBMC, que a su vez activan los linfocitos T CD8+ para destruir células tumorales. Las PBMC se aislaron de sangre venosa heparinizada de las CM mediante centrifugación en gradiente de ficoll-Paque para
10 la sangre de ratón o ser humano, o con el Lympholyte Cell Separation Media (Cedarlane Labs, Ontario, Canadá) para la sangre de ratón. Las PBMC se incubaron con VE de una sola cepa, mezclas de VE, y los controles adecuados como se describe en el Ejemplo 12. Además, los linfocitos T CD8+ se
15 obtuvieron de PBMC humana o bazos de ratón como en el Ejemplo 12. Después de las 24 horas de incubación de las PBMC con VE, las VE se retiraron de las células por lavados con PBS, 100 μ l de medio reciente con antibióticos se añadieron a cada pocillo, y se añadieron 200.000 linfocitos
20 T a cada pocillo experimental de la placa de 96 pocillos. Se añadió un anticuerpo dirigido contra CD3 a una concentración final de 2 mg/ml. Se dejó que los cultivos simultáneos se incubaran a 37°C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

25 72 horas después de la incubación del cultivo simultáneo, 50.000 células tumorales/pocillo se sembraron por pocillo en placas de 96 pocillos nuevas. Las líneas de células tumorales usadas incluyen B16.F10, SIY+ B16.F10, y otras. Las líneas de células tumorales se emparejaron según
30 HLA con el donante, y pueden incluir las líneas de células PANC-1, UNKPC960/961, UNKC, y HELA. Después de la finalización del cultivo simultáneo de 96 horas, 100 μ l de

la mezcla de linfocitos T CD8+, y PBMC se transfirieron a los pocillos que contenían células tumorales. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones normales de oxígeno. Se usó estaurosporina como control negativo
5 para tener en cuenta la muerte de las células.

Después de esta incubación, se usó la citometría de flujo para medir la muerte de las células tumorales y caracterizar el fenotipo de las células inmunitarias. En resumen, las células tumorales se tiñeron con tinte de
10 viabilidad. Se usó el análisis FACS para clasificar específicamente respecto a células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (destruidas). Los datos también se presentan como la cantidad absoluta de células tumorales muertas por pocillo. El fenotipo de
15 linfocitos T CD8+ citotóxicos se puede caracterizar por los siguientes métodos: a) concentración de granzyme B en el sobrenadante, IFN γ y TNF α en el sobrenadante del cultivo como se describe a continuación, b) expresión en la superficie de los linfocitos T CD8+ de marcadores de
20 activación tales como DC69, CD25, CD154, PD-1, gamma/delta TCR, Foxp3, T-bet, granzyme B, c) tinción de citoquinas intracelulares para IFN γ , granzyme B, TNF α en linfocitos T CD8+. El fenotipo de los linfocitos T CD4+ también se puede evaluar mediante tinción de citoquinas intracelulares
25 además de la concentración de citoquinas en el sobrenadante incluidos INF γ , TNF α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, quimioquinas, etc.

Como medida adicional de la activación de linfocitos T CD8+, 100 μ l de sobrenadante del cultivo se retiraron de
30 los pocillos después de 96 horas de incubación de los linfocitos T con las DT y se analizaron par determinar las citoquinas secretadas, las quimioquinas, y los factores de

crecimiento usando el kit Luminex Magpix multiplexado (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen, los pocillos se prehumedecieron con tampón, y se añadieron 25 µl de 1x perlas magnéticas revestidas de anticuerpo y 2x 200 µl de tampón de lavado se realizaron en cada pocillo usando el imán. 50 µl de tampón de incubación, 50 µl de diluyente y 50 µl de muestras se añadieron y se mezclaron con agitación durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las perlas se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de 1X anticuerpo detector biotinilado, y la suspensión se incubó durante 1 h con agitación en la oscuridad. Dos, lavados de 200 µl se realizaron a continuación con el tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de reactivo 1x SAV-RPE a cada pocillo y se incubó durante 30 Minutos a TA en la oscuridad. Se realizaron tres lavados con 200 µl y se añadieron 125 µl de tampón de lavado con 2-3 min de agitación. A continuación, los pocillos se enviaron para su análisis en el sistema Luminex xMAP.

Los patrones permiten una cuantificación detallada de las citoquinas, incluidas GM-CSF, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-12 (p40/p70), IL-17, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1α, TNFα, y VEGF. Estas citoquinas se evaluaron en muestra de origen tanto humano como de ratón. Los aumentos de estas citoquinas en las muestras tratadas bacterianas indican una mayor producción de proteínas y citoquinas en el hospedador. Otras variaciones de este ensayo relativas a la capacidad de tipos celulares específicos para liberar citoquinas se evaluaron adquiriendo estas células por métodos de clasificación, y son conocidos de la persona normalmente experta en la materia. Además, la citoquina del

ARNm también se evaluó para abordar la liberación de citoquinas en respuesta a una composición de VE. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria de forma similar a una respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

Este protocolo de simulación con PBMC se puede repetir usando combinaciones de VE purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunitaria.

10 **Ejemplo 10. Detección de VE *in vitro* en células presentadoras de antígenos**

Las células dendríticas de la lámina propia muestran constantemente muestras de bacterias vivas, bacterias muertas, y productos microbianos en la luz intestinal, extendiendo sus dendritas a lo largo de la epitelio intestinal, que es una forma mediante la cual las VE producidas por las bacterias de la luz intestinal pueden estimular directamente las células dendríticas. Los siguientes métodos representan una forma para evaluar la captación diferencial de VE por las células presentadoras de antígenos. Opcionalmente, estos métodos se puede aplicar para evaluar el comportamiento inmunomodulador de las VE administradas a un paciente.

Las células dendríticas (DC) se aislaron de médula ósea humana o de ratón, la sangre, o los bazo, de acuerdo con métodos convencionales o protocolos en kit (por ejemplo, Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, 2001. Isolation of dendritic cells. Current Protocols in Immunology. Capítulo 3:Unidad 3.7) y como se analiza en el Ejemplo 12.

Para evaluar la entrada de VE en y/o en presencia de las DC, 250.000 DC se sembraron en un cubreobjetos redondo

en medio RPMI-1640 completo y a continuación se incubaron con las VE procedentes de cepas bacterianas únicas o combinaciones de VE a una multiplicidad de infección (MOI) entre 1:1 y 1:10. Las VE purificadas se han marcado con fluorocromos o proteínas fluorescentes como se describe en el Ejemplo 2. Después de 1 hora de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo, se separaron de la placa usando tripsina. Las células bien se dejaron intactas o se lisaron. A continuación las muestras se procesaron mediante citometría de flujo. Las VE internalizadas totales se cuantificaron a partir de las muestras lisadas, y el porcentaje de células que habían capturado las VE se midió contando las células fluorescentes. Los métodos descritos anteriormente también se pueden llevar a cabo de la misma forma usando macrófagos o líneas de células epiteliales (obtenidas de la ATCC) en lugar de con las DC.

Ejemplo 11: Cribado in vitro de las VE con mayor capacidad de activar los linfocitos NK citolíticos cuando se incuban con células diana

Para demostrar la capacidad de las composiciones de VE seleccionadas para suscitar una potente citotoxicidad de los linfocitos NK respecto a las células tumorales cuando se incuban con las células tumorales, se usó el siguiente ensayo *in vitro*. En resumen, células mononucleares de sangre heparinizada se obtuvieron de donantes humanos sanos. Opcionalmente, se llevó a cabo una etapa de expansión para aumentar el número de linfocitos NK como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, véase Somanschi et al 2011 J Vis Exp.). Se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 que contenía suero humano al 5%. A continuación, las células PMNC se marcaron con los

anticuerpos adecuados y los linfocitos NK se aislaron mediante FACS como linfocitos CD3-/CD56+ y listos para el ensayo de citotoxicidad posterior. Como alternativa, los linfocitos NK se aíslan con el instrumento autoMACs y el
5 kit de aislamiento para linfocitos NK según las instrucciones del fabricante (Miltenyl Biotec).

Los linfocitos NK se contaron, y se sembraron en un formato de 96 pocillos con 5000 células por pocillo, y se incubaron con VE de una sola cepa, VE de mezclas de cepas
10 bacterianas, y los controles adecuados como se describe en el Ejemplo 12. Como control negativo adicional, este ensayo se realiza con VE de *Fusobacterium nucleatum*. Se sabe que *F. nucleatum* es un inhibidor de la actividad de los linfocitos NK (véase por ejemplo Gur et al 2005 Immunity
15 42:1-12). Después de 5-24 horas de incubación de los linfocitos NK con las VE, las VE se retiraron de las células por lavados con PBS, los linfocitos NK se resuspendieron en 10 de medio reciente con antibióticos, y se añadieron a placas de 96 pocillos que contenían 50.000
20 células tumorales diana/pocillo. Las líneas de células tumorales usadas incluyen B16.F10, SIY+ B16.F10, y otras. Las líneas de células tumorales se emparejaron según HLA con el donante, y pueden incluir las líneas de células PANC-1, UNKPC960/961, UNKC, y HELA. Las placas se incubaron
25 durante 24 horas a 37°C en condiciones normales de oxígeno. Se usó estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte de las células.

Después de esta incubación, se usó la citometría de flujo para medir la muerte de las células tumorales. En
30 resumen, las células tumorales se tiñeron con tinte de viabilidad. Se usó el análisis FACS para clasificar específicamente respecto a células tumorales y medir el

porcentaje de células tumorales muertas (destruidas). Los datos también se presentan como la cantidad absoluta de células tumorales muertas por pocillo.

Este protocolo de simulación con linfocitos NK se puede repetir usando combinaciones de VE purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunitaria.

Ejemplo 12: Uso de ensayos de activación inmunitaria *in vitro* para predecir la eficacia de la inmunoterapia *in vivo* contra el cáncer de las composiciones de VE

Los ensayos de activación inmunitaria *in vitro* identifican las VE que son capaces de estimular las células dendríticas, que a su vez activan los linfocitos T CD8+ destructores de células. El trabajo de A. Sivan, et al, *Science* 350(6264): 1084-1089 (2015) ha sugerido que la mejora de la destrucción de las células tumorales por los linfocitos T CD8+ en respuesta a la ingestión oral de *Bifidobacterium* spp. es una inmunoterapia eficaz contra el cáncer en ratones. Por lo tanto, los ensayos *in vitro* descritos anteriormente se usan como un cribado rápido predictivo de una gran cantidad de VE candidatos para determinar su potencial actividad en inmunoterapia. Las VE que muestran una mayor estimulación de células dendríticas, mayor estimulación de la destrucción mediante linfocitos T CD8+, mayor estimulación de la destrucción mediante PBMC, y/o mayor estimulación de la destrucción mediante linfocitos NK, se seleccionan preferentemente para estudios *in vivo* de eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer.

Ejemplo 13: Determinación de la biodistribución de las VE cuando se administran por vía oral a ratones

Ratones de tipo natural (por ejemplo, C57BL/6 o BALB/c) se inocularon por vía oral con la composición de VE

de interés para determinar el perfil de biodistribución *in vivo* de las VE purificadas (Ejemplo 1). Las VE se marcaron como en Ejemplo 2 como ayuda en el análisis posterior.

Los ratones pueden recibir una sola dosis de VE (25-
5 100 µg) o varias dosis durante un ciclo temporal definido (25-100 µg). Los ratones se alojaron en condiciones específicas exentas de patógenos siguiendo protocolos aprobados. Como alternativa, los ratones se pueden reproducir y mantenerse en condiciones estériles exentas de
10 gérmenes. Se pueden tomar muestras de sangre y heces en los puntos temporales adecuados.

Los ratones se sacrificaron humanitariamente en diferentes puntos temporales (es decir, horas a días) después de la inoculación con las composiciones de VE y se
15 realizó una necropsia completa en condiciones estériles. Siguiendo protocolos normalizados, los ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, hígado, colon, intestino delgado, ciego, estómago, bazo, riñones, vejiga, páncreas, corazón, piel, pulmones, cerebro y otro tejido de interés se
20 recogieron y se usaron directamente o se congelaron rápidamente para análisis posterior. Las muestras de tejido se diseccionaron y homogeneizaron para preparar suspensiones de células individuales siguiendo protocolos normalizados conocidos del experto en la materia. El número
25 de VE presentes en la muestra se cuantifica a continuación mediante citometría de flujo (Ejemplo 17). La cuantificación también puede realizarse mediante el uso del microscopio de fluorescencia tras el procesamiento adecuado del tejido de ratón completo (Vankelecom H., Fixation and
30 paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2009). Como alternativa, los animales se pueden analizar usando obtención de imágenes en

vivo según la técnica de marcado de VE.

Ejemplo 14: Administración de composiciones de VE con mayor activación inmunitaria *in vitro* para tratar modelos de tumor en ratones singénicos

5 Se generó un modelo de cáncer en ratón mediante inyección subcutánea de una línea de células tumorales o una muestra de tumor derivado de un paciente y se dejó injertar en ratones hembra C57BL/6, de una edad de 6-8 semanas. Los métodos proporcionados en el presente
10 documento se replicaron usando diferentes líneas de células tumorales, que incluyen: células B16-F10 o B16-F10-SIY como modelo ortotópico de melanoma, células Panc02 como modelo ortotópico de cáncer pancreático, inyectadas a una concentración de 1×10^6 células en el flanco derecho
15 (Maletzki et al 2008. Gut 57:483-491), células LLC1 como modelo ortotópico de cáncer de pulmón, células CT-26 como modelo ortotópico de cáncer colorrectal, y células RM-1 como modelo ortotópico de cáncer de próstata. Como ejemplo, se proporcionan detalladamente los métodos del modelo B16-
20 F10.

 Se usó un modelo de melanoma espontáneo de elevada frecuencia metastásica en ratones singénicos para estudiar la capacidad de las bacterias para reducir el crecimiento tumoral y la diseminación de la metástasis. Las VE
25 seleccionadas para este ensayo son composiciones que muestran una activación mejorada de los subconjuntos de células inmunitarias y estimulan la destrucción mejorada de células tumorales *in vitro* (Ejemplos 12-16). La línea de células de melanoma de ratón B16-F10 se obtuvo de la ATCC.
30 Las células se cultivaron *in vitro* como monocapa en medio RPMI, suplementado con suero de feto bovino térmicamente inactivado al 10% y penicilina/estreptomicina, al 1% a 37°C

en una atmósfera de aire con 5% de CO₂. Las células tumorales en crecimiento exponencial se recogieron mediante tripsinización, se lavaron tres veces con 1x PBS frío, y se preparó una suspensión de 5E6 células/ml para su administración. En este experimento se usaron ratones C57BL/6 hembra. Los ratones tenían 6-8 semanas de edad, y pesaban aproximadamente 16-20 g. Para el desarrollo del tumor, cada ratón recibió una inyección SC en el costado con 100 µl de la suspensión de células B16-F10. Los ratones se anestesiaron con ketamina y xilazina antes del trasplante de células. Los animales usando en el experimento pueden iniciar un tratamiento con antibióticos mediante instilación de un cóctel de kanamicina (0.4 mg/ml), gentamicina, (0.035 mg/ml), colistina (850 U/ml), metronidazol (0.215 mg/ml) y vancomicina (0.045 mg/ml) en el agua de bebida desde el día 2 al 5 y una inyección intraperitoneal de clindamicina (10 mg/kg) el día 7 después de la inyección del tumor.

El tamaño del tumor primario del costado se midió con un calibre cada 2-3 días y el volumen del tumor se calculó mediante la siguiente fórmula: volumen del tumor = anchura del tumor² × longitud del tumor × 0.5. Una vez que el tumor primario alcanza aproximadamente 100 mm³, los animales se clasificaron en varios grupos en función de su peso corporal. Los ratones se tomaron aleatoriamente de cada grupo y se asignaron a un grupo de tratamiento. Las composiciones de VE se prepara como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones se inocularon por vía oral mediante sonda nasogástrica con 25-100 µg de VE a ensayar, 25-100 µg de VE de *Lactobacillus* (control negativo), PBS, o 25-100 µg de VE de *Bifidobacterium* spp. (control positivo). Los ratones recibieron la misma cantidad de VE por sonda

nasogástrica diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente, o cualquier otro calendario de dosificación durante el periodo de tratamiento. Los ratones recibieron una inyección IV en la vena de la cola o
5 recibieron directamente una inyección en el tumor. Los ratones pueden recibir una inyección de 10 ng-1 ug de VE, bacterias y VE, o bacterias inactivadas y VE. Los ratones pueden recibir inyecciones semanales o una vez al mes. Los ratones pueden también recibir combinaciones de VE
10 purificadas y bacterias vivas para maximizar el potencial de destrucción del tumor. Todos los ratones se alojaron en condiciones específicas exentas de patógenos siguiendo protocolos aprobados. El tamaño del tumor, el peso del ratón, y la temperatura corporal se vigilaron cada 3-4
15 días, y los ratones se sacrificaron humanitariamente 6 semanas después de la inyección de células de melanoma de ratón B16-F10 o cuando el volumen del tumor primario alcanza 1000 mm³. Se extrajo sangre semanalmente y se realizó una necropsia completa en condiciones estériles a
20 la finalización del protocolo.

Las células de cáncer se pueden visualizar fácilmente en el modelo de melanoma B16-F10 de ratón debido a su producción de melanina. Siguiendo protocolos normalizados, muestras de tejido de ganglios linfáticos y órganos de la
25 región del cuello y el tórax y la presencia de micrometástasis y macrometástasis se analizó según la siguiente regla de clasificación. Se clasifica un órgano como positivo para metástasis si se descubren al menos dos lesiones micrometastásicas y una lesión macrometastásica
30 por ganglio linfático u órgano. Las micrometástasis se detectaron mediante tinción de secciones de tejido linfóide incluido en parafina con hematoxilina-eosina siguiendo

protocolos normalizados conocidas por un experto en la materia. El número total de metástasis está correlacionado con el volumen del tumor primario y se ha descubierto que el volumen del tumor se correlaciona significativamente con el tiempo de crecimiento del tumor y el número de micrometástasis y macrometástasis en los ganglios linfáticos y los órganos viscerales y también con la suma de todas las metástasis observadas. Se identificaron veinticinco sitios metastásicos diferentes como se ha descrito anteriormente (Bobek V., et al., Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma, Clin. Exp. Metastasis, 2004;21(8):705-8).

Las muestras de tejido tumoral se analizaron adicionalmente para ver los linfocitos infiltrantes en el tumor. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos se pueden aislar mediante FACS (véase el Ejemplo 17) y se pueden analizar posteriormente en detalle con micromatrices personalizadas p/MHC de clase I para revelar su especificidad de antígeno (véase por ejemplo Deviren G., et al., Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays, J. Mol. Recognit., 2007 Ene-Feb;20(1):32-8). Los linfocitos T CD4+ se pueden analizar usando micromatrices personalizadas p/MHC de clase II.

Se realiza el mismo experimento también con un modelo de metástasis múltiples de melanoma pulmonar de ratón. La línea de células de melanoma de ratón B16-BL6 se obtuvo de la ATCC y las células se cultivaron in vitro como se ha descrito anteriormente. En este experimento se usaron ratones C57BL/6 hembra. Los ratones tenían 6-8 semanas de edad, y pesaban aproximadamente 16-20 g. Para el desarrollo del tumor, cada ratón recibió una inyección en la vena de la

cola con 100 µl de 2e6 células/ml de suspensión de células B16-BL6. Las células tumorales que se injertaron mediante inyección IV terminaron en los pulmones.

Los ratones se sacrificaron humanitariamente 9 días después. Los pulmones se pesaron y se analizaron para determinar la presencia de nódulos pulmonares en la superficie del pulmón. Los pulmones extraídos se blanquearon con solución de Fekete, que no blanquea los nódulos tumorales debido a la melanina de las células B16, aunque una pequeña fracción de los nódulos es amelanótica (es decir, de color blanco). El número de nódulos tumorales se contó cuidadosamente para determinar la carga tumoral en el ratón. Típicamente, se descubrieron 200-250 nódulos pulmonares en los pulmones de los ratones del grupo de control (es decir, sonda nasogástrica con PBS).

El porcentaje de carga tumoral se calculó para los tres grupos de tratamiento. Esta medida se define como el número medio de nódulos pulmonares sobre las superficies de los pulmones de los ratones que pertenecen a un grupo de tratamiento dividido por el número medio de nódulos pulmonares en las superficies de los pulmones de los ratones del grupo del control.

Determinación del contenido metabólico con RMN 1H

Muestras biológicas por triplicado de medio y medio agotado después del condicionamiento de las bacterias y después del crecimiento tumoral se desproteínaron usando filtros Sartorius Centriscart I (corte 10 kDa). Antes del uso, el filtro se lavó dos veces mediante centrifugación de agua para eliminar el glicerol y un pequeño volumen (20 µl) de ácido trimetilsilil-2,2,3,3-tetradeuteropropiónico 20.2 mM (TSP, sal sódica) en D2O se añadió a 700 µl del ultrafiltrado, proporcionando una referencia de

desplazamiento químico (0.00 ppm) y una señal de búsqueda del deuterio. 650 ul de la muestra se introdujeron en un tubo de RMN de 5 mm. Se obtuvieron espectros de RMN ¹H de un solo pulso (500 MHz) en un espectrómetro Bruker DMX-500 o instrumento equivalente como se ha descrito anteriormente (por Engelke et al. 2006 NMR spectroscopic studies on the late onset form of 3-methylglutaconic aciduria type I and other defects in leucine metabolism. NMR Biomed. 19: 271-278). La fase y la línea de base se corrigieron manualmente. Todos los espectros se escalaron al TSP y las señales de los metabolitos se ajustaron semiautomáticamente a una forma de línea lorenciana. Las concentraciones de metabolitos en el medio agotado se calcularon con respecto a la concentración conocida del medio patrón y se expresaron correspondientemente en unidades de mM. La concentración de un metabolito concreto se calculó por el área del correspondiente pico respecto al área del doblete de la valina a 1.04 ppm o un patrón adecuado.

Determinación del contenido metabólico con CLEM

El contenido metabólico de una muestra se dilucidó usando técnicas de cromatografía líquida combinadas con espectrometría de masas. Existe una variedad de técnicas para determinar el contenido metabólico de diferentes muestras, y son conocidas del expertos en la materia que implican extracción con disolventes, separación cromatográfica y una variedad de técnicas de ionización acopladas con la determinación de la masa (Roberts et al 2012 Targeted Metabolomics. Curr Protoc Mol Biol. 30: 1-24; Dettmer et al 2007, Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev. 26(1):51-78). Como ejemplo no limitativo, un sistema CL-EM incluye un espectrómetro de masas 4000 QTRAP triple cuadrupolo (AB SCIEX) combinada con

una bomba 1100 Series (Agilent) y un automuestreador HTS PAL (Leap Technologies). Muestras de medio u otras mezclas metabólicas complejas (~10 µl) se extrajeron usando nueve volúmenes de 74.9:24.9:0.2 (v/v/v) de acetoneitrilo/metanol/ácido fórmico que contienen patrones internos marcados con isótopos estables (valina-d8, Isotec; y fenilalanina-d8, Cambridge Isotope Laboratories). Los patrones se pueden ajustar o modificar dependiendo de los metabolitos de interés. Las muestras se centrifugaron (10 min, 9.000g, 4 °C), y los sobrenadantes (10 µl) se enviaron al CLEM por inyección de la solución en una columna HILIC (150 × 2.1 mm, tamaño de partícula de 3 µm). La columna se eluye haciendo fluir una fase móvil al 5% [formiato de amonio 10 mM, ácido fórmico al 0.1% en agua] durante 1 min a un caudal de 250 µl/min seguido por un gradiente lineal durante 10 min hasta una solución de 40% de fase móvil [acetoneitrilo con ácido fórmico al 0.1%]. La tensión del pulverizador de iones se ajustó a 4.5 kV y la temperatura de la fuente es de 450 °C.

Los datos se analizaron usando un programa informático comercialmente disponible tal como Multiquant 1.2 de AB SCIEX para la integración de los picos del espectro de masas. Los picos de interés se extrajeron manualmente y compararse con patrones para confirmar la identidad del pico. Se realiza la cuantificación con patrones adecuados para determinar el número de metabolitos presentes en el medio inicial, después del acondicionado de las bacterias, y después del crecimiento de células tumorales.

Las biopsias tumorales y las muestras de sangre se enviaron para su análisis metabólico según las técnicas CLEM descritas en el presente documento. Los niveles diferenciales de aminoácidos, azúcares, lactato, entre

otros metabolitos, entre los grupos de ensayo demuestran la capacidad de la composición microbiana para alterar el estado metabólico del tumor.

Sec. de ARN para determinar el mecanismo de acción

- 5 Las células dendríticas se purificaron de tumores, placas de Peyer, y ganglios linfáticos mesentéricos, como se describe en el Ejemplo 12. El análisis de la secuencia de ARN se lleva a cabo y se analiza según las técnicas convencionales conocidas del experto en la materia (Z. Hou. *Scientific Reports*. 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015)).
- 10 En el análisis, se debe prestar atención especial a los genes de la ruta inflamatoria innata incluidos TLR, CLR, NLR, y STING, citoquinas, quimiocinas, procesamiento de antígenos y rutas de presentación, presentación cruzada, y
- 15 coestimulación de linfocitos T.

Ejemplo 15: Administración de VE con activación inmunitaria mejorada *in vitro* para tratar modelos de tumor en ratones singénicos junto con la inhibición de PD-1 o PD-L1

- 20 Para determinar la eficacia de las VE en modelos de tumor singénico de ratón, se usó el cáncer colorrectal (CT-26). En resumen, Células tumorales CT-26 (n.º CAT CRL-2638) se cultivaron *in vitro* como monocapa en RPMI-1640 o DMEM suplementado con suero de feto bovino térmicamente inactivado al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en
- 25 aire. Las células en crecimiento exponencial se recogieron y se contaron antes de la inoculación del tumor. En este experimento se usaron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad. Para el desarrollo del tumor, cada ratón recibió una inyección subcutánea en uno o ambos flancos traseros de
- 30 5x10⁵ células tumorales CT-26 en 0.1 ml de 1x PBS. Algunos ratones recibieron un pretratamiento con antibióticos. El tamaño del tumor, y el peso del ratón se supervisaron al

menos tres veces a la semana en días no consecutivos.

Las VE se analizaron para determinar su eficacia en el modelo de tumor de ratón, tanto solas como junto con células bacterianas completas y con o sin anticuerpo dirigido contra PD-1 o contra PD-L1. Las VE, células bacterianas, y/o anticuerpos contra PD-1 o contra PD-L1 se administraron en diferentes puntos temporales y a diferentes dosis. Por ejemplo, en el día 10 después de la inyección del tumor, o una vez que el volumen alcanza 100 mm³, los ratones se trataron con las VE solas o junto con un anticuerpo contra PD-1 o contra PD-L1. La cantidad de dosificación se administró de acuerdo con la Tabla 3. El grupo de *Blautia massiliensis* mostró una inhibición del crecimiento tumoral comparable al observado en el grupo del anticuerpo dirigido contra PD-1 (**Figs. 1 y 2**).

Tabla 3. Cantidad de dosificación.

Grupo	Tratamiento	Dosis, ruta, calendario
1 (n = 10)	Vehículo IV (PBS)	N/A, IV, Q3Dx4
2 (n = 10)	Anti-PD-1	200 ug, IP, Q4Dx3
3 (n = 10)	VE (IV) <i>Blautia massiliensis</i>	5 ug, IV, Q3Dx4

Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos

(por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración. Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., o inyección por vía nasal. Algunos grupos de ratones también reciben inyecciones con dosis eficaces de un inhibidor del punto de control. Por ejemplo, los ratones reciben 100 μ g de anticuerpo mAB dirigido contra PD-L1 (clon 10f.9g2, BioXCell) u otro mAB contra PD-1 o contra PD-L1, en 100 μ l de PBS, y algunos ratones reciben vehículo u otro control adecuado (por ejemplo, anticuerpo de control). Los ratones recibieron inyecciones con los mAB 3, 6, y 9 días después de la inyección inicial. Para evaluar si la inhibición del punto de control y la inmunoterapia con VE tienen un efecto antitumoral aditivo, los ratones de control que recibieron mAB contra PD-1 o contra PD-L1 se incluyen en el panel de control convencional. Los criterios de valoración primarios (tamaño del tumor) y secundarios (linfocitos infiltrantes en el tumor y análisis de citoquinas) se evaluaron, y algunos grupos de ratones se volvieron a estimular con una inoculación de células tumorales posterior para evaluar el efecto del tratamiento sobre la respuesta de la memoria.

Ejemplo 16: Las VE en un modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratón

EAE es un modelo animal bien estudiado de la esclerosis múltiple, como han revisado Constantinescu et al. (Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br J Pharmacol. 2011 Oct; 164(4): 1079-1106). Se puede inducir en una variedad de cepas de ratas y ratones usando diferentes péptidos asociados a mielina, mediante transferencia adoptiva de linfocitos T activados encefalitogénicos, o el uso de ratones transgénicos susceptibles a la EAE, como se analiza en Mangalam et al. (Two discrete subsets of CD8+ T cells modulate PLP₉₁₋₁₁₀ induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. J Autoimmun. 2012 Jun; 38(4): 344-353).

Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en el modelo de la EAE en roedores, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, ratones C57Bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Taconic (Germantown, NY). Los grupos de ratones recibieron dos inyecciones subcutáneas (s.c.) en dos sitios de la espalda (superior e inferior) con 0.1 ml de la glicoproteína de oligodendrocito de mielina 35-55 (MOG35-55; 100 ug por inyección; 200 ug por ratón (total 0.2 ml por ratón)), emulsionado en Adyuvante completo de Freund (CFA; 2-5 mg de Mycobacterium tuberculosis H37Ra destruidos/ml emulsión). Aproximadamente 1-2 horas después de la anterior, los ratones recibieron una inyección por vía intraperitoneal (i.p.) con 200 ng de toxina de la tosferina (PTx) en 0.1 ml de PBS (2 ug/ml). Se administró una inyección IP adicional de PTx en el día 2. Como

alternativa, se usó una cantidad adecuada de un péptido de mielina alternativo (por ejemplo, proteína proteolípida (PLP)) para inducir EAE. Algunos animales sirvieron como controles no expuestos. La gravedad de la EAE se evaluó y se asignó una puntuación de discapacidad diariamente a partir del día 4 de acuerdo con los métodos conocidos en la materia (Mangalam et al. 2012).

El tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien cerca del momento de la inmunización o después de la inmunización de EAE. Por ejemplo, las VE se pueden administrar al mismo tiempo que la inmunización (día 1), o bien se pueden administrar cuando aparecen los primeros signos de discapacidad (por ejemplo, cola lacia), o durante la EAE grave. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la
5 administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., inyección subcutánea (s.c.), o administración por vía nasal.

10 Algunos grupos de ratones se pueden tratar con uno o más agentes antiinflamatorios adicionales, o uno o varios compuestos terapéuticos contra la EAR (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD154, bloqueo de miembros de la familia del TNF, vitamina D, u otro tratamiento), y/o un
15 control adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpos de control) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l),
20 ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir
25 antibióticos.

En diferentes puntos temporales, los ratones se sacrificaron, y los sitios de inflamación (por ejemplo, cerebro y médula espinal), ganglios linfáticos, u otros tejidos, se pueden retirar para un análisis histológico ex
30 vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tejidos se disociaron usando enzimas de disociación de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNF α , IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el sistema nervioso central (SNC) CD45+ obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en varias secciones de tejido para medir los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas de moléculas de punto de control.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se volvieron a estimular con un disparador de la enfermedad (por ejemplo, linfocitos T encefalitogénicos u otra inyección de péptidos inductores de la EAE). Los ratones se analizaron para determinar la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad de la EAE después del nuevo estímulo.

Ejemplo 17: Las VE en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratón (ACI)

La artritis inducida por colágeno (ACI) es un modelo animal habitualmente usado para estudiar la artritis reumatoide (AR), como se describe en Caplazi et al. (Mouse models of rheumatoid arthritis. Veterinary Pathology. Sept. 1, 2015. 52(5): 819-826) (véanse también Brand et al. Collagen-induced arthritis. Nature Protocols. 2007. 2: 1269-1275; Pietrosimone et al. Collagen-induced arthritis: a model for murine autoimmune arthritis. Bio Protoc. 20 Oct. 2015; 5(20): e1626).

Entre otras versiones del modelo de ACI en roedores, un modelo implica inmunizar ratones HLA-DQ8 Tg con colágeno de pollo de tipo II, como se describe en Taneja et al. (J. Immunology. 2007. 56: 69-78; véanse también Taneja et al. J. Immunology 2008. 181: 2869-2877; y Taneja et al. Arthritis Rheum., 2007. 56: 69-78). La purificación de CII de pollo se ha descrito en Taneja et al. (Arthritis Rheum., 2007. 56: 69-78). Los ratones se supervisaron para determinar el inicio de la enfermedad ACI y su progresión después de la inmunización, y la gravedad de la enfermedad se evaluó y se "calificó" como se describe en Wooley, J. Exp. Med. 1981. 154: 688-700.

Los ratones se inmunizaron para la inducción de ACI y se separaron en varios grupos de tratamiento. Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en la ACI, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

El tratamiento con las VE se inició cerca del momento de la inmunización con colágeno o después de la inmunización. Por ejemplo, en algunos grupos, las VE se pueden administrar al mismo tiempo que la inmunización (día

1), o bien las VE se pueden administrar cuando aparecen los primeros signos de la enfermedad o tras el inicio de los síntomas graves. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos.

5 Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros grupos de ratones pueden recibir las VE mediante
10 inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos
15 alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o
20 congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

 Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la
25 administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica
30 (i.s.), o administración por vía nasal.

 Algunos grupos de ratones se pueden tratar con uno o más agentes antiinflamatorios adicionales, o uno o varios

compuestos terapéuticos contra la ACI (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD154, bloqueo de miembros de la familia del TNF, vitamina D, u otro tratamiento), y/o un control adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpos de control) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir antibióticos.

En diferentes puntos temporales, se obtuvieron muestras de suero para evaluar los niveles de anticuerpos IgG contra CII de pollo y de ratón usando un ensayo ELISA convencional (Batsalova et al. Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains. Arthritis Res Ther. 2012. 14(6): R237). Asimismo, algunos ratones se sacrificaron, y los sitios de inflamación (por ejemplo, sinovia), ganglios linfáticos, u otros tejidos, se pueden retirar para un análisis histológico ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. El sinovio y fluido sinovial se analizaron para determinar la infiltración de células del plasma y la presencia de anticuerpos usando técnicas conocidas en la materia. Además, los tejidos se disociaron usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante para examinar los perfiles de los infiltrados celulares. La

células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, 5 anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de 10 macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, 15 M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el sinovio CD45+ obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a 20 cabo la inmunohistoquímica en varias secciones de tejido para medir los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas de moléculas de punto de control.

Para examinar el impacto y la longevidad de la 25 protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se volvieron a estimular con un disparador de la enfermedad (por ejemplo, otra inyección de péptidos inductores de la ACI). Los ratones se analizaron para determinar la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad 30 de la ACI después del nuevo estímulo.

Ejemplo 18: Las VE en un modelo de colitis en ratón

La colitis inducida por dextrano sulfato de sodio

(DSS) es un modelo animal de colitis bien estudiado, según se revisa en Randhawa et al. (A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. Korean J Physiol Pharmacol. 2014. 18(4): 279-288; véase también 5 Chassaing et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 4 Feb 2014; 104: Unidad 15.25).

Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en el modelo de la colitis inducida por DSS en 10 ratón, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otros agentes antiinflamatorios.

Los grupos de ratones se trataron con DSS para inducir colitis como es bien conocido en la técnica (Randhawa et 15 al. 2014; Chassaing et al. 2014; véase también Kim et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. J Vis Exp. 2012. 60: 3678). Por ejemplo, ratones C57Bl/6 macho de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Labs, Taconic, u otro proveedor. Se indujo 20 colitis por adición de DSS al 3% (MP Biomedicals, n.º de Cat. 0260110) al agua de bebida. Algunos ratones no recibieron DSS en el agua de bebida y sirvieron como controles no expuestos al tratamiento. Algunos ratones recibieron agua durante cinco (5) días. Algunos ratones 25 pueden recibir DSS durante un periodo más corto o más largo de cinco (5) días. Los ratones se supervisaron y se puntuaron usando un índice de actividad con discapacidad conocido en la materia basado en la pérdida de peso (por ejemplo, sin pérdida de peso (puntuación 0); pérdida de 30 peso 1-5% (puntuación 1); pérdida de peso 5-10% (puntuación 2); consistencia de las heces (por ejemplo, normal (puntuación 0); heces sueltas (puntuación 2); diarrea

(puntuación 4)); y sangrado (por ejemplo, sin sangre (puntuación 0), hemocultivo positivo (puntuación 1); hemocultivo positivo y sangrado visual en los grumos (puntuación 2); sangre alrededor del ano, hemorragia importante (puntuación 4).

El tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien el día 1 de la administración de DSS, o algún tiempo después. Por ejemplo, las VE se pueden administrar al mismo tiempo que se inició el DSS (día 1), o bien se pueden administrar cuando aparecen los primeros signos de enfermedad (por ejemplo, pérdida de peso o diarrea), o durante las etapas de la colitis grave. Los ratones se observaron diariamente para determinar el peso, morbilidad, supervivencia, presencia de diarrea y/o heces sanguinolentas.

Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden

irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una
5 administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección
10 i.p., o administración por vía nasal.

Algunos grupos de ratones se pueden tratar con uno o más agentes antiinflamatorios adicionales (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD154, bloqueo de miembros de la familia del TNF, u otro tratamiento), y/o un control
15 adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpos de control) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina
20 B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones recibieron DSS sin recibir antibióticos previamente.

25 En diferentes puntos temporales, los ratones se sometieron a videoendoscopia usando un pequeño endoscopio para animales (Karl Storz Endoskope, Alemania) bajo anestesia con isoflurano. Se registraron imágenes estáticas y de vídeo para evaluar la extensión de la colitis y la
30 respuesta al tratamiento. La colitis se puntuó usando los criterios conocidos en la materia. La materia fecal se recogió para su estudio.

En diferentes puntos temporales, los ratones, sacrificaron y el colon, intestino delgado, bazo, y ganglios linfáticos (por ejemplo, los ganglios linfáticos mesentéricos) se recogieron. Además, se extrajo sangre en
5 tubos de separación de suero. El daño tisular se evaluó mediante los estudios histológicos que evaluaron, aunque no de forma limitativa, la arquitectura de la cripta, grado de infiltración de células inflamatorias, y agotamiento de células de globo.

10 El tracto gastrointestinal (GI), ganglios linfáticos, y/u otros tejidos, se pueden retirar para un análisis histológico ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tejidos se recogieron y se pueden disociar
15 usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas),
20 anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-
25 4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-
30 1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios

linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el tracto GI CD45+ obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en varias secciones de tejido para medir los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas de moléculas de punto de control.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se pueden volver a estimular con un disparador de la enfermedad. Los ratones se analizaron para determinar la susceptibilidad a colitis de gravedad después del nuevo estímulo.

Ejemplo 19: Las VE en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en ratón

La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es un modelo animal de la dermatitis atópica (o la dermatitis alérgica de contacto), como han revisado Petersen et al. (In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. Basic & Clinical Pharm & Toxicology. 2006. 99(2): 104-115; véase también Irving C. Allen (ed.) Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2013. vol. 1031, DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13). Se puede inducir en una variedad de cepas de ratas y ratones usando diferentes haptenos o antígenos, por ejemplo, un antígeno emulsionado con un adyuvante. DTH se caracteriza por la sensibilización y también por una reacción mediada por linfocitos T específicos de antígeno que da como resultado un eritema, edema, e inmunitaria celular -especialmente la infiltración de células presentadoras de antígenos (APC), eosinófilos, linfocitos T CD4+ activados, y linfocitos Th2 que expresan citoquinas.

En general, los ratones se ceban con un antígeno administrado en el contexto de un adyuvante (por ejemplo, Adyuvante completo de Freund) para inducir una respuesta inmunitaria secundaria (o de memoria) medida por la hinchazón y los títulos de anticuerpos específicos de antígeno.

Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en el modelo de la DTH en ratón, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, ratones C57Bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor. Los grupos de ratones recibieron cuatro inyecciones subcutáneas (s.c.) en cuatro sitios de la espalda (superior e inferior) de antígeno (por ejemplo, ovoalbúmina (OVA)) en una dosis eficaz (50 ul de volumen total por sitio). Para una respuesta de DTH, los animales recibieron una inyección intradérmica (i.i.) en las orejas bajo anestesia de ketamina/xilazina (aproximadamente 50 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente). Algunos ratones sirven como animales de control. Algunos grupos de ratones se estimularon con 10 ul por oreja (control de vehículo (0.01% de DMSO en solución salina) en la oreja izquierda y antígeno (21.2 ug (12 nmol) en la oreja derecha) el día 8. Para medir la inflamación de la oreja, el espesor de la oreja de animales sujetos manualmente se midió con un micrómetro Mitutoyo. El espesor de la oreja se midió antes del estímulo intradérmico como nivel inicial de cada animal individual. Posteriormente, el espesor de la oreja se midió dos veces después del estímulo intradérmico, a aproximadamente 24 horas y 48 horas (es decir, los días 9 y 10).

El tratamiento con las VE se inició en algún momento,

bien cerca del momento del cebado o cerca del momento del estímulo con DTH. Por ejemplo, Las VE se pueden administrar al mismo tiempo que las inyecciones subcutáneas (día 0), o bien se pueden administrar antes de, o después de, la inyección intradérmica. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, administración tópica, inyección intradérmica (i.i.), u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 0), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., inyección i.d., administración tópica, o

administración por vía nasal.

Los ratones recibieron una inyección de KLH y CFA i.d en 4 sitios a lo largo de la espalda (50 ug por ratón de KLH preparado en una relación 1:1 con CFA en un volumen
5 total de 50 ul por sitio). Los ratones recibieron dosis durante 9 días de la siguiente forma; 1) administración oral de PBS anaerobio PBS (vehículo); 2) administración oral de 10 mg de *Prevotella histicola*; 3) administración oral de 100 ug de VE derivadas de *P. histicola*; 4)
10 administración i.p. de PBS; 5) administración i.p. de dexametasona (control positivo); y 6) administración i.p. de 10 ug de VE derivadas de *Prevotella histicola*. Para las VE, la proteína total se midió usando ensayos Bio-rad (n.º Cat. 5000205) realizados según las instrucciones del
15 fabricante. A las 24 y 48 horas después del estímulo con 10 ug de KLH (10 ul de volumen), los grupos recibieron *Prevotella histicola* (células vivas) o VE derivadas de *Prevotella histicola*, tanto en el grupo oral como en el de administración i.p, mostraron menos inflamación que en los
20 grupos con vehículo (**Figs. 3A y 3B**). Se observó una respuesta a DTH después de la inyección i.p. de VE derivadas de *Prevotella histicola* a 10 µg, 3 µg, 1 µg, y 0.1 µg en la reducción de la hinchazón de la oreja específica de antígeno (espesor de la oreja) 48 horas
25 después de un estímulo con antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado en ratón basado en KLH. (**Fig. 3C**).

Los ratones recibieron una inyección de KLH y CFA i.d en 4 sitios a lo largo de la espalda (50 ug por ratón de
30 KLH preparado en una relación 1:1 con CFA en un volumen total de 50 ul por sitio). Los ratones recibieron dosis durante 9 días de la siguiente forma; 1) administración

oral de PBS anaerobio PBS (vehículo); 2) administración oral de 10 mg de *Prevotella histicola*; 3) administración oral de 1×10^9 UFC de biomasa de *Prevotella histicola*; 4) administración oral de 2.09×10^8 UFC de biomasa de *Prevotella melanogenica*; 5) administración oral de 100 ug de VE derivadas de *P. histicola*; 6) administración oral de 100 ug de VE derivadas de *P. melanogenica*; y 7) administración i.p. de dexametasona (control positivo). Para las VE, la proteína total se midió usando ensayos Bio-rad (n.º Cat. 5000205) realizados según las instrucciones del fabricante. A las 24 y 48 horas después del estímulo con 10 ug de KLH (10 ul de volumen), los grupos recibieron *Prevotella histicola* (células vivas) o VE derivadas de *Prevotella histicola* mostraron menos inflamación que los grupos del vehículo (**Figs. 8A y 8B**). A las 24 y 48 horas después del estímulo con 10 ug de KLH (10 ul de volumen), el grupo que recibió VE derivadas de *Prevotella histicola* mostraron menos inflamación que los grupos del vehículo y que el grupo que recibió *Prevotella melanogenica* (células vivas) (**Figs. 8A y 8B**).

Se prepararon formulaciones de ensayo para el modelo de hipersensibilidad de tipo retardado basado en KLH. El modelo DTH proporciona un mecanismo in vivo para estudiar la respuesta inmunitaria mediada por células, y la inflamación resultante, después de la exposición a un antígeno específico contra el que el ratón se ha sensibilizado. Se han utilizado diversas variaciones del modelo DTH y son bien conocidos en la técnica (Irving C. Allen (ed.). *Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Vol. 1031, DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13, Springer Science + Business Media, LLC 2013). Por ejemplo, la emulsión de la

hemocianina de lapa californiana (KLH) y el Adyuvante completo de Freund (CFA) se repararon recientemente en el día de la inmunización (día 0). Para este fin, 8 mg de KLH en polvo se pesaron y se resuspendieron completamente en 16
5 ml de solución salina. Se preparó una emulsión mezclando la KLH/solución salina con un volumen igual de solución de CFA (por ejemplo, 10 ml de KLH/solución salina + 10 ml de solución de CFA) usando jeringas y un conector Luer Lock. KLH y CFA se mezclaron intensamente durante varios minutos
10 para formar una emulsión de color blanco para obtener una estabilidad máxima. Se realizó un ensayo de gota para comprobar si se había obtenido una emulsión homogénea, el mezclado se continúa hasta que una gota intacta permanece visible en el agua.

15 En el día 0, ratones C57Bl/6J hembra, de aproximadamente 7 semanas de edad, se cebaron con antígeno de KLH en CFA mediante inmunización subcutánea (4 sitios, 50 µl por sitio).

Dexametasona, un corticoesteroide, es un
20 antiinflamatorio conocido que mejora las reacciones de DTH en ratones, y sirve como control positivo para suprimir la inflamación en este modelo (Taube and Carlsten, Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice. Inflamm Res.
25 2000. 49(10): 548-52). Para el grupo de control positivo, se preparó una solución madre de 17 mg/ml de dexametasona en el Día 0 por dilución de 6.8 mg de dexametasona en 400 µl de etanol al 96%. Para cada día de dosificación, se preparó una solución de trabajo diluyendo la solución madre
30 100x en PBS estéril para obtener una concentración final de 0.17 mg/ml en un vial con septo para dosificación intraperitoneal. Los ratones tratados con dexametasona

recibieron 100 μ l de dexametasona i.p. (5 ml/kg de una solución de 0.17 mg/ml). Sacarosa congelada sirvió como el control negativo (vehículo). Cepas de *Veillonella* se dosificaron a 1×10^{10} UFC p.o. diariamente. dexametasona
5 (control positivo), vehículo (control negativo) y *Bifidobacterium animalis lactis* (10 mg de polvo) se administraron diariamente.

En el día 8, Los ratones se estimularon por vía intradérmica (i.d.) con 10 μ g de KLH en solución salina (en
10 un volumen de 10 μ l) en la oreja izquierda. Las respuestas inflamatorias se midieron usando métodos conocidos en la técnica. El espesor de la oreja se midió a las 24 horas del estímulo con antígeno (**Fig. 11**). Según se determina para el espesor de la oreja, las cepas de *Veillonella* fueron
15 eficaces para suprimir la inflamación, en comparación con los ratones que recibieron vehículo solamente (comparable al tratamiento con dexametasona).

La eficacia de las cepas de *Veillonella* se puede estudiar adicionalmente usando varias temporalizaciones y
20 diferentes dosis. Por ejemplo, el tratamiento con una composición bacteriana de *Veillonella* se puede iniciar en algún punto, bien cerca del momento del cebado o cerca del momento del estímulo con DTH. Por ejemplo, *Veillonella* (1×10^9 UFC por ratón y día) se puede administrar al mismo
25 tiempo que las inyecciones subcutáneas (día 0), o administrarse antes de, o después de, la inyección intradérmica. Las cepas de *Veillonella* se pueden administrar a diferentes dosis y en intervalos definidos, y en diversas combinaciones. Por ejemplo, algunos ratones
30 reciben inyecciones intravenosas de *Veillonella* en un intervalo entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas por ratón. Algunos ratones recibieron una mezcla de cepas.

Aunque algunos ratones recibirán *Veillonella* mediante inyección i.v., otros ratones pueden recibir *Veillonella* mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, administración tópica, inyección intradérmica (i.i.), u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir una *Veillonella* diariamente (por ejemplo, desde el día 0), mientras que otros pueden recibir una *Veillonella* en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

Algunos grupos de ratones se pueden tratar con uno o más agentes antiinflamatorios (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD154, bloqueo de miembros de la familia del TNF, u otro tratamiento), y/o un control adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpos de control) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir antibióticos.

En diferentes puntos temporales, se tomaron muestras de suero. Otros grupos de ratones se sacrificaron, y los ganglios linfáticos, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), el intestino delgado, colon, y otros tejidos, se

pueden retirar para estudios histológicos, estudio histológico ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Se extrajo la sangre de algunos ratones desde el plexo orbital con anestesia con O2/CO2 y se realizaron ensayos ELISA.

Los tejidos se pueden disociar usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas CD45+ purificadas obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en varias secciones de tejido para medir los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas de moléculas de punto de control.

Los ratones se cebaron y estimularon con KLH como se

ha descrito anteriormente y, tras la medición de la hinchazón de la oreja a las 48 horas, los ratones se sacrificaron.

Se retiraron las orejas de los animales sacrificados y se introdujeron en EDTA frío exento de cóctel inhibidor de la proteasa (Roche). Las orejas se homogeneizaron mediante perturbación con perlas, y los sobrenadantes se analizaron para determinar la IL-1 β con el kit Luminex (EMD Millipore) según las instrucciones del fabricante. Los ratones tratados con 10 μ g de VE de *P. histicola* (i.p.) mostraron niveles de IL-1 β comparables a los observados en el grupo de la dexametasona (control positivo). (**Fig. 3D**). Las VE derivadas de *P. histicola* son capaces de suprimir las citoquinas proinflamatorias.

Además, los ganglios linfáticos cervicales se disociaron mediante un filtro celular, se lavaron, y se tiñeron para determinar FoxP3 (PE-FJK-16s) y CD25 (FITC-PC61.5) usando métodos conocidos en la técnica (**Fig. 3E**). Los ratones que se trataron con 10 μ g de VE derivadas de *P. histicola* mostraron un aumento de los Tregs en los ganglios linfáticos cervicales con respecto a los ratones no tratados (control negativo), y comparable al grupo de la dexametasona (control positivo). Las VE derivadas de *P. histicola* son capaces de inducir Tregs en los ganglios linfáticos de los ratones estimulados.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la DTH, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se pueden volver a estimular con el antígeno de estímulo (por ejemplo, OVA). Los ratones se analizaron para determinar la susceptibilidad a DTH y la gravedad de la respuesta.

Ejemplo 20: Las VE en un modelo de Diabetes de tipo 1 (T1D) en ratón

La diabetes Tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario se dirige a los islotes de Langerhans del páncreas, destruyendo de esta forma la capacidad del cuerpo para producir insulina.

Hay varios modelos de modelos animales de la T1D, como revisaron Belle et al. (Mouse models for type 1 diabetes. Drug Discov Today Dis Models. 2009; 6(2): 41-45; véase también Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012 Jun; 166(3): 877-894. Hay modelos de la T1D químicamente inducida, T1D inducida por patógenos, así como modelos en los que los ratones desarrollan T1D espontáneamente.

Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en un modelo de la de T1D en ratón, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

Dependiendo el método de inducción de la T1D y/o de si el desarrollo de la T1D es espontáneo, el tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien alrededor del tiempo de inducción o después de la inducción, o antes del inicio (o después del inicio) de la T1D que aparece espontáneamente. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos

ratones pueden recibir las VE todos los días, mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna
5 proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

10 Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la
15 ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., o administración por vía nasal.

Algunos grupos de ratones se pueden tratar con tratamientos adicionales y/o un control adecuado (por
20 ejemplo, vehículo o anticuerpo de control) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina
25 B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir antibióticos.

30 La glucosa en sangre se vigila quincenalmente antes del inicio del experimento. En diferentes puntos temporales posteriores, se mide la glucosa en sangre no en ayunas. En

diferentes puntos temporales, los ratones se sacrificaron y el sitio del páncreas, ganglios linfáticos, u otros tejidos, se pueden retirar para un análisis histológico ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tejidos se disociaron usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFNy, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en tejido purificadas obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en varias secciones de tejido para medir los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas de moléculas de punto de control. La producción de anticuerpos también se puede evaluar mediante ELISA.

Para examinar el impacto y la longevidad de la

protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se pueden volver a estimular con un disparador de la enfermedad, o se evaluaron para determinar la susceptibilidad a la recaída. Los ratones se analizaron para determinar la susceptibilidad al inicio de la diabetes y la gravedad después del segundo estímulo (o recaída que se produce espontáneamente).

Ejemplo 21: Las VE en un modelo de la colangitis esclerosante primaria (PSC) en ratón

La colangitis esclerosante primaria (PSC) es una enfermedad hepática crónica que daña lentamente los conductos biliares y conduce a cirrosis terminal. Está asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD).

Hay varios modelos de modelos animales de la PSC, como revisaron Fickert et al. (Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). J Hepatol. 2014 Jun. 60(6): 1290-1303; véase también Pollheimer and Fickert. Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2015 Jun. 48(2-3): 207-17). La inducción de la enfermedad en modelos de la PSC incluye la inducción química (por ejemplo, colangitis inducida por 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC)), inducida por patógenos (por ejemplo, *Cryptosporidium parvum*), obstrucción biliar experimental (por ejemplo, ligadura común del conducto biliar (CBDL)), y modelo de ratón transgénico de lesión biliar producida por antígeno (por ejemplo, ratones transgénicos Ova-Bil). Por ejemplo, la ligadura del conducto biliar se realiza como se describe en Georgiev et al. (Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. Br J Surg. 2008. 95(5):

646-56), o la enfermedad se induce mediante exposición a DCC como se describe en Fickert et al. (A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. Am J Path. Vol 171(2): 525-536.

- 5 Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en un modelo de la PSC en ratón, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de algún otro agente terapéutico.

Colangitis inducida por DCC

- 10 Por ejemplo, ratones C57bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Taconic u otro proveedor. Los ratones se alimentaron con dieta DCC al 0.1% durante varios periodos de tiempo. Algunos grupos recibieron pienso suplementado con DCC durante 1 semana, otros durante 4
- 15 semanas, otros durante 8 semanas. Algunos grupos de ratones pueden recibir una dieta suplementada con DCC durante un tiempo más prolongado y posteriormente dejarse recuperar, recibiendo posteriormente una dieta normal. Estos ratones se pueden estudiar para determinar su capacidad de
- 20 recuperarse de la enfermedad y/o su susceptibilidad a la recaída tras la posterior exposición a DCC. El tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien cerca del momento de la alimentación con DCC o después de la exposición inicial a DCC. Por ejemplo, las VE se pueden
- 25 administrar el día 1, o bien se pueden administrar algún tiempo después. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, 100 mg de VE
- 30 por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección i.p., inyección subcutánea (s.c.),

administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas), y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración. Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., o administración por vía nasal. Algunos grupos de ratones se pueden tratar con agentes adicionales y/o un control adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpo) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir antibióticos. En diferentes puntos temporales, muestras de suero y se analizaron para determinar ALT, AP, bilirrubina, y niveles de ácidos biliares (BA).

En diferentes puntos temporales, los ratones se sacrificaron, se registraron los pesos tanto corporal como del hígado, y los sitios de inflamación (por ejemplo, el hígado, intestino grueso y delgado, bazo), ganglios linfáticos, u otros tejidos, se pueden retirar para un caracterización histomorfológica ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica (véase Fickert et al. Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)). J Hepatol. 2014. 60(6): 1290-1303). Por ejemplo, los conductos biliares se tiñeron para determinar la expresión de ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1. Algunos tejidos se tiñeron para el examen histológico, mientras que otros se disociaron usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80), así como la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNF α , IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células

inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el conducto biliar CD45+ obtenidas ex vivo.

El tejido hepático se preparó para el análisis
5 histológico, por ejemplo, usando tinción con rojo Sirio seguido por cuantificación de la zona fibrótica. Al finalizar el tratamiento, se extrajo sangre para análisis de enzimas hepáticas en plasma, por ejemplo, AST o ALT, y para determinar los niveles de bilirrubina. El contenido
10 hepático de hidroxiprolina se puede medir según protocolos establecidos. El análisis de la expresión génica hepática de la inflamación y marcadores de fibrosis se puede realizar mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, aunque no de forma limitativa,
15 MCP-1, alfa-SMA, Coll1a1, y TIMP. Las mediciones de metabolitos se pueden realizar en plasma, tejido y muestras fecales usando métodos metabolómicos establecidos. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en secciones de hígado para medir los neutrófilos, linfocitos
20 T, macrófagos, células dendríticas, u otros infiltrados de células inmunitarias.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se volvieron a estimular con DCC en un
25 momento posterior. Los ratones se analizaron para determinar la susceptibilidad a la colangitis y la gravedad de la colangitis después del nuevo estímulo.

Colangitis inducida por BDL

Como alternativa, las VE se sometieron a ensayo para
30 determinar su eficacia en la colangitis inducida por BDL. Por ejemplo, ratones C57Bl/6J de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Taconic u otro proveedor. Después de un

periodo de aclimatación, los ratones se sometieron a un procedimiento quirúrgico para realizar la ligadura del conducto biliar (BDL). Algunos animales de control se sometieron a cirugía simulada. El procedimiento BDL produce
5 lesión hepática, inflamación y fibrosis en 7-21 días.

El tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien cerca del momento de la cirugía o algún tiempo después de la cirugía. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones
10 recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v., otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección i.p., inyección subcutánea (s.c.),
15 administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones recibieron las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días).
20 Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas), y administrarse, o se pueden irradiar o
25 destruir térmicamente antes de la administración. Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células
30 bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., o

administración por vía nasal. Algunos grupos de ratones se pueden tratar con agentes adicionales y/o un control adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpo) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

5 Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el
10 tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir antibióticos. En diferentes puntos temporales, muestras de suero y se analizaron para determinar ALT, AP, bilirrubina, y niveles de ácidos biliares (BA).

15 En diferentes puntos temporales, los ratones se sacrificaron, se registraron los pesos tanto corporal como del hígado, y los sitios de inflamación (por ejemplo, el hígado, intestino grueso y delgado, bazo), ganglios linfáticos, u otros tejidos, se pueden retirar para un
20 caracterización histomorfológica ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica (véase Fickert et al. Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)). J Hepatol. 2014. 60(6): 1290-1303). Por
25 ejemplo, los conductos biliares se tiñeron para determinar la expresión de ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1. Algunos tejidos se tiñeron para el examen histológico, mientras que otros se disociaron usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La células se tiñeron
30 para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células

dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, 5 CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80), así como la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1). Además del inmunofenotipado, se analizaron las 10 citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNF α , IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células 15 inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el conducto biliar CD45+ obtenidas ex vivo.

El tejido hepático se preparó para el análisis histológico, por ejemplo, usando tinción con rojo Sirio 20 seguido por cuantificación de la zona fibrótica. Al finalizar el tratamiento, se extrajo sangre para análisis de enzimas hepáticas en plasma, por ejemplo, AST o ALT, y para determinar los niveles de bilirrubina. El contenido hepático de hidroxiprolina se puede medir según protocolos 25 establecidos. El análisis de la expresión génica hepática de la inflamación y marcadores de fibrosis se puede realizar mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, aunque no de forma limitativa, MCP-1, alfa-SMA, Col1a1, y TIMP. Las mediciones de 30 metabolitos se pueden realizar en plasma, tejido y muestras fecales usando métodos metabolómicos establecidos. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en

secciones de hígado para medir los neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, u otros infiltrados de células inmunitarias.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se pueden analizar para determinar la recuperación.

Ejemplo 22: Las VE en un modelo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en ratón

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una forma grave de la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), donde la acumulación de la grasa hepática (esteatosis) y la inflamación producen lesión hepática y muerte de los hepatocitos (balonización).

Hay varios modelos de modelos animales de la NASH, como revisaron Ibrahim et al. (Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflamm. Dig Dis Sci. 2016 May. 61(5): 1325-1336; véase también Lau et al. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances 2017 Jan. 241(1): 36-44).

Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en un modelo de la NASH en ratón, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otro agente terapéutico. Por ejemplo, ratones C57Bl/6J de 8-10 semanas de edad, obtenidos de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor, se introdujeron en una dieta deficiente en metionina colina (MCD) durante un periodo de 4-8 semanas durante las cuales se desarrollaron las características de la NASH, incluida la esteatosis, inflamación, balonización y fibrosis.

Células bacterianas de *Prevotella histicola* y VE

derivadas de *P. histicola* se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en un modelo de la NASH en ratón, ya sean solas o en combinación unas con otras, en proporciones variables, con o sin la adición de otro agente terapéutico.

5 Por ejemplo, ratones C57Bl/6J de 8 semanas de edad, obtenidos de Charles River (Francia), u otro proveedor, se aclimataron durante un periodo de 5 días, se aleatorizaron en grupos de 10 ratones según el peso corporal, y se alimentaron con una dieta deficiente en metionina colina

10 (MCD), por ejemplo A02082002B de Research Diets (EE.UU.), durante un periodo de 4 semanas durante las que se desarrollan las características de NASH, incluida la esteatosis, inflamación, balonización y fibrosis. Los ratones con pienso de control recibieron pienso normal para

15 mascotas, por ejemplo RM1 (E) 801492 de SDS Diets (Reino Unido). El pienso de control, la dieta MCD, y el agua, se proporcionaron *ad libitum*.

El tratamiento con *P. histicola* viva congelada se inició el día 1 de MCD para algunos ratones y se continuó

20 durante 28 días consecutivos. Algunos ratones con dieta MCD recibieron células bacterianas mediante sonda nasogástrica oral diariamente con 100 µl de una suspensión que contenía 1.47×10^9 células bacterianas. Los ratones con pienso de control y algunos ratones con dieta MCD se dejaron sin

25 tratar, aunque algunos ratones con dieta MCD recibieron diariamente solución de vehículo, mediante sonda nasogástrica oral, durante 28 días. Algunos ratones con dieta MCD recibieron el compuesto de referencia y un agonista de FXR, ácido obeticólico (OCA; control positivo),

30 a una dosis de 30 mg/kg, mediante sonda nasogástrica oral, durante 28 días. Al finalizar el tratamiento (día 28), los ratones se sacrificaron, y el hígado, intestino delgado,

contenido luminal, sangre, y heces, se retiraron para análisis ex vivo histológico, bioquímico, molecular o de citoquinas y/o análisis mediante citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, muestras de hígado de 0.5 cm³ se almacenaron en formalina durante 24 horas y después en etanol a 4°C, antes de tinción con hematoxilina/eosina (H&E) y rojo Sirio, y la determinación de la puntuación de actividad (NAS). El análisis histológico y la puntuación se realizaron en Histalim (Montpellier, Francia) de forma enmascarada. Los portas que contenían la sección de lóbulo hepático teñida con H&E o rojo Sirio se digitalizaron usando NanoZoomer y se visualizaron con un visor NDP, ambos de Hamamatsu (Japón). Cada sección se evaluó y se puntuó individualmente. Un sistema de puntuación NAS adaptado de Kleiner et al. (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun. 41(6): 1313-1321) se usó para determinar el grado de esteatosis (puntuación 0-3), inflamación lobular (puntuación 0-3), balonización de los hepatocitos (puntuación 0-3), y fibrosis (puntuación 0-4). Se calculó una puntuación NAS individual en ratones sumando la puntuación de la esteatosis, inflamación, balonización, y fibrosis (puntuación 0-13). Además, los niveles de AST y ALT en plasma se determinaron usando un instrumento Pentra 400 de Horiba (USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de colesterol total hepático, triglicéridos, ácidos grasos, alanina aminotransferasa, y aspartato aminotransferasa también se determinaron usando métodos conocidos en la técnica.

En ratones que recibieron dieta MCD (inductora de NASH), *P. histicola* administrada por vía oral fue eficaz

para reducir la puntuación NAS en comparación con el vehículo y los grupos sin tratamiento (controles negativos) (**Fig. 4**). *P. histicola* redujo la esteatosis (**Fig. 5A**), la inflamación (**Fig. 5B y Fig. 5C**), y la balonización (**Fig. 5D**), así como el colesterol total hepático (**Fig. 6**). *P. histicola* también redujo la puntuación de fibrosis en los ratones tratados (**Fig. 7A y Fig. 7B**).

La **Fig. 9A** muestra el efecto de *P. histicola* sobre los ácidos grasos libres hepáticos en ratones alimentados con una dieta MCD, la **Fig. 9B** muestra el efecto de *P. histicola* sobre el colesterol total hepático en ratones alimentados con una dieta MCD, la **Fig. 9C** muestra el efecto de *P. histicola* sobre los triacilglicéridos hepáticos en ratones alimentados con una dieta MCD, la **Fig. 9D** muestra el efecto de *P. histicola* y *P. melanogenica* sobre la alanina aminotransferasa en ratones alimentados con una dieta MCD, la **Fig. 9E** muestra el efecto de *P. histicola* y *P. melanogenica* sobre la aspartato aminotransferasa en ratones alimentados con una dieta MCD.

En ratones que recibieron dieta MCD (inductora de NASH), *P. histicola* y *P. melanogenica* administrados por vía oral fueron eficaces para reducir la puntuación NAS en comparación con el vehículo y grupos sin tratamiento (controles negativos) (**Figs. 10A y 10B**).

En otros estudios, el análisis de la expresión génica hepática de la inflamación, fibrosis, esteatosis, marcadores de estrés ER o de estrés oxidativo se pueden realizar mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, aunque no de forma limitativa, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, α -SMA, Coll1a1, CHOP, y NRF2.

El tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien al principio de la dieta, o en algún momento después

de comenzar la dieta (por ejemplo, una semana después). Por ejemplo, las VE se pueden administrar desde el mismo día que se inicia la dieta MCD. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15, 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 1), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., o administración por vía nasal. Algunos grupos de ratones se pueden tratar con uno o más compuestos terapéuticos NASH adicionales (por ejemplo, agonistas de FXR, agonistas de PPAR, agonistas de CCR2/5 u otro

tratamiento) y/o un control adecuado en diferentes puntos temporales y dosis eficaces.

En diferentes puntos temporales, y/o al finalizar el tratamiento, los ratones se sacrificaron, y el hígado, intestino, sangre, heces, u otros tejidos, se pueden retirar para análisis ex vivo histológico, bioquímico, molecular o de citoquinas y/o análisis mediante citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tejidos hepáticos se prepararon para análisis histológico, que puede comprender una tinción con H&E, rojo Sirio, y la determinación de la puntuación de actividad NASH (NAS). En diferentes puntos temporales, se extrajo sangre para análisis de enzimas hepáticas en plasma, por ejemplo, AST o ALT, mediante ensayos normalizados. Además, el contenido hepático de colesterol, triacilglicéridos, o ácidos grasos, se puede medir usando protocolos establecidos. El análisis de la expresión génica hepática de la inflamación, fibrosis, esteatosis, marcadores de estrés ER o de estrés oxidativo se pueden realizar mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, aunque no de forma limitativa, IL-6, MCP-1, alfa-SMA, Col1a1, CHOP, y NRF2. Las mediciones de metabolitos se pueden realizar en plasma, tejido y muestras fecales usando métodos metabolómicos bioquímicos y de espectrometría de masas establecidos. Se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFNy, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el

conducto biliar CD45+ obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en secciones de hígado o intestino para medir los neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, u otros infiltrados de células inmunitarias.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones se pueden analizar para determinar la recuperación.

10 **Ejemplo 23: Las VE en un modelo de psoriasis en ratón**

La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica mediada por linfocitos T. La denominada psoriasis "en placas" es la forma más habitual de psoriasis y se tipifica por placas secas, placas rojas, y engrosamiento de la piel debido a la infiltración de células inmunitarias en la dermis y epidermis. Varios modelos animales han contribuido a la comprensión de esta enfermedad, como revisaron Gudjonsson et al. (Mouse models of psoriasis. J Invest Derm. 2007. 127: 1292-1308; véase también van der Fits et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J. Immunol. 2009 May 1. 182(9): 5836-45).

La psoriasis se puede inducir en una amplia variedad de modelos de ratón, incluidos los que utilizan modelos transgénicos, de inactivación genética, o de xenoinjerto, así como la aplicación tópica de imiquimod (IMQ), un ligando de TLR7/8.

Las VE se sometieron a ensayo para determinar su eficacia en el modelo de la psoriasis en ratón, bien solas o junto con células bacterianas completas, con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, ratones C57Bl/6 hembra o Balb/c de 6-8 semanas de

edad se obtuvieron de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor. Se afeitó la espalda y la oreja derecha de los ratones. Grupos de ratones recibieron una dosis tópica diaria de 62.5 mg de crema IMQ comercialmente disponible
5 (5%) (Aldara; 3M Pharmaceuticals). La dosis se aplicó a las zonas afeitadas durante 5 o 6 días consecutivos. En intervalos regulares, los ratones se puntúan para el eritema, aparición de placas, y engrosamiento de las placas de 0 a 4, como describen van der Fits et al. (2009). El
10 espesor de la oreja de los ratones se controló con un micrómetro Mitutoyo.

El tratamiento con las VE se inició en algún momento, bien cerca del momento de la primera aplicación de IMQ, o algún tiempo después. Por ejemplo, Las VE se pueden
15 administrar al mismo tiempo que las inyecciones subcutáneas (día 0), o bien se pueden administrar antes de, o después de, la aplicación. Las VE se administraron en diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron inyecciones intravenosas con VE a 15,
20 20, o 15 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50, o 100 mg de VE por ratón. Aunque algunos ratones recibieron las VE mediante inyección i.v, otros ratones pueden recibir las VE mediante inyección intraperitoneal (i.p.), administración por vía nasal, sonda nasogástrica,
25 administración tópica, inyección intradérmica (i.d.), inyección subcutánea (s.c.), u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir las VE diariamente (por ejemplo, desde el día 0), mientras que otros pueden recibir las VE en intervalos alternativos (por
30 ejemplo, en días alternos, o una vez cada tres días). Grupos adicionales de ratones pueden recibir alguna proporción de células bacterianas a VE. Las células

bacterianas pueden estar vivas, muertas, o debilitadas. Las células bacterianas se pueden recoger frescas (o congeladas) y administrarse, o se pueden irradiar o destruir térmicamente antes de la administración.

5 Por ejemplo, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración independiente, o conjunta con, la administración de VE. Como en el caso de las VE, la administración de células bacterianas puede variar según la
10 ruta de administración, la dosis, y el calendario. Esto puede incluir sonda nasogástrica, inyección i.v., inyección i.p., inyección i.d., inyección s.c., administración tópica, o administración por vía nasal.

 Algunos grupos de ratones se pueden tratar con uno o
15 más agentes antiinflamatorios (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD154, bloqueo de miembros de la familia del TNF, u otro tratamiento), y/o un control adecuado (por ejemplo, vehículo o anticuerpos de control) en diferentes puntos temporales y a dosis eficaces.

20 Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del
25 tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones inmunizados se trataron sin recibir antibióticos.

 En diferentes puntos temporales, se tomaron muestras de la piel de la espalda y las orejas para análisis por
30 tinción de las criosecciones usando métodos conocidos en la técnica. Otros grupos de ratones se sacrificaron, y los ganglios linfáticos, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos

(MLN), el intestino delgado, colon, y otros tejidos, se pueden retirar para estudios histológicos, estudio histológico ex vivo, análisis de citoquinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica.

5 Algunos tejidos se pueden disociar usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de criosecciones, las muestras de tejido, o las células obtenidas ex vivo se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas

10 en la materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluye el marcador de células paninmunitario

15 CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además del inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas

20 incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios

25 linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en la piel CD45+ purificadas obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en varias secciones de tejido para medir los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas

30 de moléculas de punto de control.

Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la psoriasis, en lugar de ser sacrificados,

algunos ratones se pueden volver a estimular para evaluar la recuperación, o bien se pueden volver a estimular con IMQ. Los grupos de ratones vueltos a estimular se analizaron para determinar la susceptibilidad a la psoriasis y la gravedad de la respuesta.

Ejemplo 24: Condiciones de fabricación

Se usó medio enriquecido para hacer crecer y preparar las bacterias para su uso in vitro e in vivo. Por ejemplo, el medio puede contener azúcar, extractos de levaduras, peptonas de tipo vegetal, tampones, sales, oligoelementos, tensioactivos, agentes antiespumantes, y vitaminas. La composición de los componentes complejos como los extractos de levaduras y peptonas pueden estar indefinidos o definidos parcialmente (incluidas las concentraciones aproximadas de aminoácidos, azúcares etc.). El metabolismo microbiano puede depender de la disponibilidad de recursos tales como carbono y nitrógeno. Se pueden estudiar diferentes azúcares u otras fuentes de carbono. Como alternativa, el medio se puede preparar, y la bacteria seleccionada crecer como se muestra en Saarela et al., *J. Applied Microbiology*. 2005. 99: 1330-1339, que se incorpora por referencia en el presente documento. La influencia del tiempo de fermentación, la crioprotección y la neutralización del concentrado de células sobre la supervivencia de la liofilización, la capacidad de almacenamiento y la exposición a ácidos biliares de la bacteria seleccionada producida sin ingredientes de tipo lácteo.

A gran escala, se esterilizó el medio. La esterilización puede ser un procesamiento a temperatura ultra alta (UHT). El procesamiento UHT se lleva a cabo a temperatura muy alta durante cortos periodos de tiempo. El

intervalo UHT puede ser de 135-180°C. Por ejemplo, el medio puede esterilizarse desde entre 10 a 30 segundos a 135°C.

Se puede preparar inóculo en matraces o en biorreactores más pequeños y se vigila el crecimiento. Por ejemplo, el tamaño del inóculo puede ser entre aproximadamente 0.5 y 3% del volumen total del biorreactor. Dependiendo de la aplicación y de la necesidad de material, el volumen del biorreactor puede ser al menos de 2 l, 10 l, 80 l, 100 l, 250 l, 1000 l, 2500 l, 5000 l, 10.000 l.

Antes de la inoculación, el biorreactor se preparó con medio al pH deseado, temperatura, y concentración de oxígeno. El pH inicial del medio de cultivo puede ser diferente del punto de consigna del proceso. El estrés por pH puede ser perjudicial a baja concentración de células; el pH inicial podría estar entre pH 7.5 y el punto de consigna del proceso. Por ejemplo, se puede configurar el pH entre 4.5 y 8.0. Durante la fermentación, el pH se puede controlar mediante el uso de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, o hidróxido de amonio. La temperatura puede controlarse desde 25°C a 45°C, por ejemplo, a 37°C. Se crean condiciones anaerobias reduciendo el nivel de oxígeno en el caldo de cultivo desde alrededor de 8 mg/l a 0 mg/l. Por ejemplo, se pueden usar mezclas de nitrógeno o gas (N₂, CO₂, y H₂) a fin de establecer condiciones anaerobias. Como alternativa, no se usan gases y las células establecen condiciones anaerobias consumiendo el oxígeno restante procedente del medio. Dependiendo de la cepa y del tamaño del inóculo, puede variar el tiempo de fermentación en el biorreactor. Por ejemplo, el tiempo de fermentación puede variar desde aproximadamente 5 horas a 48 horas.

Revivir microorganismos desde un estado congelado puede requerir consideraciones especiales. El medio de

producción puede estresar a las células después de la descongelación; puede ser necesario un medio de descongelación especial para iniciar sistemáticamente un tren de semillas a partir de material descongelado. La
5 cinética de transferencia o paso del material de semilla a medio nuevo, con el fin de aumentar el volumen de semillas o mantener el estado de crecimiento microbiano, puede verse afectado por el estado actual de los microorganismos (ej. crecimiento exponencial, crecimiento estacionario, sin
10 estrés, con estrés).

La inoculación del uno o más fermentadores de producción puede alterar la cinética de crecimiento y la actividad celular. El estado inicial del sistema biorreactor debe optimizarse para facilitar un producción
15 correcta y sólida. La fracción de cultivo de siembra al medio total (por ejemplo, un porcentaje) tiene un efecto drástico sobre la cinética de crecimiento. El intervalo puede ser 1-5% del volumen de trabajo del fermentador. El pH inicial del medio de cultivo puede ser diferente del
20 punto de consigna del proceso. El estrés por pH puede ser perjudicial a baja concentración de células; el pH inicial podría estar entre pH 7.5 y el punto de consigna del proceso. La agitación y la entrada de gas al sistema durante la inoculación puede ser diferente de los puntos de
25 consigna del proceso. Los estreses físicos y químicos debido a ambas condiciones pueden ser perjudiciales a baja concentración de células.

Las condiciones del proceso y las configuraciones de control pueden alterar la cinética del crecimiento
30 microbiano y la actividad celular. Los cambios en las condiciones del proceso pueden cambiar la composición de la membrana, la producción de metabolitos, la velocidad de

crecimiento, el estrés celular, etc. El intervalo de temperatura óptimo para el crecimiento puede variar para cada cepa. EL intervalo puede ser 20-40 °C. El pH óptimo para el crecimiento celular y el rendimiento de la actividad posterior puede variar para cada cepa. El intervalo puede pH 5-8. Las células pueden utilizar el gas disuelto en el medio para su metabolismo. Puede ser necesario ajustar las concentraciones de O₂, CO₂, y N₂ a lo largo del proceso. La disponibilidad de nutrientes puede desplazar el crecimiento celular. Los microorganismos pueden tener cinéticas alternativas cuando está disponible un exceso de nutrientes.

El estado de los microorganismos al finalizar una fermentación y durante la recogida puede alterar la supervivencia y la actividad celular. Los microorganismos se pueden preacondicionar poco antes de recogerlos para prepararlos para los estreses físicos y químicos implicados en la separación y procesamiento posterior. Un cambio en la temperatura (frecuentemente reduciendo a 20-5 °C) puede reducir el metabolismo celular, ralentizando el crecimiento (y/o la muerte) y el cambio fisiológico cuando se extraen del fermentador. La eficacia de la concentración por centrifugación puede alterarse por el pH del cultivo. Un aumento del pH en 1-2 puntos puede mejorar la eficacia de la concentración, pero también puede ser perjudicial para las células. Los microorganismos se pueden someter a estrés poco antes de recogerlos aumentando la concentración de sales y/o azúcares del medio. Las células estresadas de esta forma pueden sobrevivir mejor a la congelación y liofilización en etapas posteriores.

Los métodos y tecnologías de separación pueden alterar la eficacia con la que los microorganismos se separan del

medio de cultivo. Los sólidos se pueden eliminar usando técnicas de centrifugación. La eficacia de la concentración por centrifugación puede alterarse por el pH del cultivo o mediante el uso de agentes floculantes. Un aumento del pH
5 en 1-2 puntos puede mejorar la eficacia de la concentración, pero también puede ser perjudicial para las células. Los microorganismos se pueden someter a estrés poco antes de recogerlos aumentando la concentración de sales y/o azúcares del medio. Las células estresadas de
10 esta forma pueden sobrevivir mejor a la congelación y liofilización en etapas posteriores. Además, Los microorganismos también se pueden separar por filtración. La filtración es superior a las técnicas de centrifugación para su purificación si las células requieren demasiados g-
15 minutos para una centrifugación correcta. Se pueden añadir excipientes antes o después de la separación. Se pueden añadir excipientes para la crioprotección o para la protección durante la liofilización. Los excipientes pueden incluir, aunque no de forma limitativa, sacarosa,
20 trehalosa, o lactosa, y estos pueden mezclarse alternativamente con tampón y antioxidantes. Antes de la liofilización, las gotículas de aglomerados celulares mezcladas con excipientes se sumergen en nitrógeno líquido.

La recogida se puede llevar a cabo mediante
25 centrifugación continua. El producto se puede resuspender con varios excipientes hasta una concentración final deseada. Se pueden añadir excipientes para la crioprotección o para la protección durante la liofilización. Los excipientes pueden incluir, aunque no de
30 forma limitativa, sacarosa, trehalosa, o lactosa, y estos pueden mezclarse alternativamente con tampón y antioxidantes. Antes de la liofilización, las gotículas de

aglomerados celulares mezcladas con excipientes se sumergen en nitrógeno líquido.

La liofilización del material, incluyendo bacterias vivas, comienza con el secado primario. Durante la fase de
5 secado primario, se retira el hielo. Aquí, se genera un vacío y se suministra una cantidad adecuada de calor al material para que se sublime el hielo. Durante la fase de secado secundario, se eliminan las moléculas de agua unidas al producto. Aquí, se aumenta la temperatura por encima de
10 la dela fase del secado primario para romper cualquier interacción fisicoquímica formada entre las moléculas de agua y el material del producto. Puede disminuirse también la presión adicionalmente para potenciar la desorción durante esta etapa. Después que se ha completado el proceso
15 de liofilización, La cámara puede rellenarse con un gas inerte, tal como nitrógeno. El producto puede precintarse en el liofilizador en condiciones secas, evitando la exposición al agua y a los contaminantes atmosféricos.

Ejemplo 25: Un modelo de melanoma de ratón

20 Ratones C57Bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Taconic (Germantown, NY). 100.000 células tumorales B16-F10 (ATCC CRL-6475) se resuspendieron en PBS estéril que contenía Matrigel al 50% y se inocularon en un volumen final de 100 μ l en un flanco posterior (el primer
25 flanco) de cada ratón. El tratamiento con cepas de Veillonella se inició en algún punto temporal después de la inoculación de células tumorales a diferentes dosis y en intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones recibieron entre $1-5 \times 10^9$ UFC (100 μ l de volumen final) por
30 dosis. Las posibles rutas de administración incluyen sonda nasogástrica (p.o.), inyección intravenosa, inyección intratumoral (IT) o inyección peritumoral o subtumoral o

subcutánea. Para ayudar en los efectos sistémicos antitumorales del tratamiento con Veillonella, ratones adicionales se inocularon con células tumorales en el flanco del lado opuesto (sin tratar, secundario, antes del
5 tratamiento IT, peritumoral o subtumoral con Veillonella en el primer flanco.

Algunos ratones pueden recibir Veillonella (p.o.) en el día 1 (el día siguiente a la inyección de células tumorales). Otros ratones pueden recibir siete (7) dosis
10 consecutivas de una cepa bacteriana (una dosis al día los días 14-21). Otros ratones recibieron una dosificación diaria o, como alternativa, algunos ratones recibieron dosis en días alternos. Como alternativa, los ratones se aleatorizaron a varios grupos de tratamiento en puntos
15 temporales definidos (por ejemplo el día 13) o cuando los tumores alcanzaron un determinado tamaño (por ejemplo 100 mm³) y el tratamiento se inició posteriormente en consecuencia. Por ejemplo, cuando los volúmenes tumorales alcanzaron un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12
20 días después de la inoculación de células tumorales), los animales se distribuyeron en grupos y se trataron bien con vehículo o con una cepa bacteriana (p.o. o IT). Algunos grupos adicionales de ratones se pueden tratar con un compuesto terapéutico contra el cáncer adicional, o un
25 anticuerpo de control adecuado. Un ejemplo de un compuesto terapéutico contra el cáncer que se puede administrar es un inhibidor de un punto de control inmunitario, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra PD-1, contra PD-L1, u otro
tratamiento que bloquee la unión de un punto de control
30 inmunitario a uno o varios de sus ligandos. Los inhibidores del punto de control dirigidos contra PD-1 y contra PD-L1 se pueden formular en PBS y administrarse por vía

intraperitoneal (i.p.) en dosis eficaces. Por ejemplo, los ratones recibieron 100 ug de anticuerpo dirigido contra PD-1 (i.p.) cada cuatro días a partir del día 1, y se continuó la totalidad de la duración del estudio.

5 Además, algunos ratones se trataron con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) se añadieron al agua de bebida, y el tratamiento con antibióticos se detuvo en el momento del
10 tratamiento o unos pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones se inocularon con células tumorales sin recibir tratamiento previo con antibióticos.

 En diferentes puntos temporales, los ratones se sacrificaron, y los tumores, ganglios linfáticos, u otros
15 tejidos se pueden retirar para un análisis por citometría de flujo ex vivo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tumores se disociaron usando un cóctel enzimático para disociación de tumores Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se registraron los
20 pesos tumorales, y los tumores se trocearon y después se introdujeron en tubos de 15 ml que contenían el cóctel enzimático y se colocaron sobre hielo. A continuación, las muestras se colocaron sobre un agitador suave a 37° C durante 45 minutos y se inactivaron rápidamente con 15 ml
25 de RPMI completo. Cada suspensión celular se hizo pasar a través de un filtro de 70 µm en un tubo falcon de 50 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en tampón FACS y se lavaron para retirar los residuos remanentes. Si es necesario, las muestras se
30 volvieron a hacer pasar a través de un segundo filtro de 70 µm en un tubo nuevo. La células se tiñeron para su análisis por citometría de flujo usando técnicas conocidas en la

materia. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anticuerpo dirigido contra CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4, y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden
5 analizar incluye el marcador de células paninmunitario CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzyme B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1). Además del
10 inmunofenotipado, se analizaron las citoquinas séricas incluidas, aunque no de forma limitativa, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFNy, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citoquinas se puede llevar a cabo
15 sobre las células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas en el tumor CD45+ purificadas obtenidas ex vivo. Finalmente, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en secciones de tejido para medir los linfocitos T,
20 macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteínas de moléculas de punto de control.

En lugar de ser sacrificados, algunos ratones se pueden volver a estimular con una inyección de células tumorales en el flanco contralateral (u otra zona) para
25 determinar el impacto sobre la respuesta de memoria del sistema inmunitario al crecimiento tumoral.

En ratones que recibieron dieta MCD (inductora de NASH), Veillonella administrada por vía oral fue eficaz para reducir la puntuación NAS en comparación con el
30 vehículo y los grupos sin tratamiento (controles negativos) (**Fig. 16**). Veillonella redujo la puntuación de fibrosis en ratones tratados (**Fig. 17**). Veillonella redujo el

colesterol total hepático (**Fig. 18**) y los triacilglicéridos hepáticos (**Fig. 19**).

Ejemplo 26: Un modelo de carcinoma colorrectal

Ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad se
5 obtuvieron de Taconic (Germantown, NY). 100.000 células del
tumor colorrectal CT-26 (ATCC CRL-2638) se resuspendieron
en PBS estéril y se inocularon en la presencia de Matrigel
al 50%. Las células tumorales CT-26 se inyectaron por vía
subcutánea en un flanco posterior de cada ratón. Cuando los
10 volúmenes tumorales alcanzaron un promedio de 100 mm³
(aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de
células tumorales), los animales se distribuyeron en los
siguientes grupos: 1) Vehículo; 2) Cepas de *Veillonella* 3)
anticuerpo dirigido contra PD-1. Los anticuerpos se
15 administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a 200 µg/ratón
(100 µl de volumen final) cada cuatro días, desde el día 1,
para un total de 3 veces (Q4Dx3) y las VE de *Veillonella* (5
µg) se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) cada tercer
día, desde el día 1 para un total de 4 veces (Q3Dx4). Ambos
20 grupos de *Veillonella* mostraron inhibición del crecimiento
tumoral mayor que el observado en el grupo del anticuerpo
contra PD-1 (**Figs. 12 y 13**).

Otro ejemplo, cuando los volúmenes tumorales
alcanzaron un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12
25 días después de la inoculación de células tumorales), los
animales se distribuyeron en los siguientes grupos: 1)
Vehículo; 2) *Burkholderia pseudomallei*; y 3) anticuerpo
dirigido contra PD-1. Los anticuerpos se administraron por
vía intraperitoneal (i.p.) a 200 µg/ratón (100 µl de
30 volumen final) cada cuatro días, desde el día 1, y las VE
de *Burkholderia pseudomallei* (5 µg) se inyectaron por vía
intravenosa (i.v.) diariamente, desde el día 1 hasta la

conclusión del estudio. El grupo de *Burkholderia pseudomallei* mostró inhibición del crecimiento tumoral mayor que el observado en el grupo del anticuerpo dirigido contra PD-1 (**Figuras 20, y 21**).

5 Otro ejemplo, cuando los volúmenes tumorales alcanzaron un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de células tumorales), los animales se distribuyeron en los siguientes grupos: 1) Vehículo; 2) VE de *Neisseria Meningitidis* aislado de la
10 vacuna Bexsero®; y 3) anticuerpo dirigido contra PD-1. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a 200 ug/ratón (100 µl de volumen final) cada cuatro días, desde el día 1, y bacterias *Neisseria Meningitidis* (aproximadamente 1.1x10²) se administraron por vía
15 intraperitoneal (i.p.) diariamente, desde el día 1 hasta la conclusión del estudio. El grupo de *Neisseria Meningitidis* mostró inhibición del crecimiento tumoral mayor que el observado en el grupo del anticuerpo dirigido contra PD-1 (**Figs. 22, y 23**).

20 Tabla 4. Prueba de significancia que compara el volumen tumoral en grupos de tratamiento vs. grupos de control en el día 11. Prueba de la T (bilateral, no emparejada, corregida según Welch) calculada en GraphPad.

Comparación	Valor de <i>p</i>	Sumario
25 Vehículo IP vs. VE de <i>Neisseria</i> <i>Meningitidis</i> .	0.0004	***

Ejemplo 27: La eficacia de las VE varía dependiendo del microorganismo de origen, dosis, y vía de administración

30 Ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Taconic (Germantown, NY). 100.000 células del tumor colorrectal CT-26 (ATCC CRL-2638) se resuspendieron

en PBS estéril y se inocularon en la presencia de Matrigel al 50%. Las células tumorales CT-26 se inyectaron por vía subcutánea en un flanco posterior de cada ratón. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de células tumorales), los animales se distribuyeron en los siguientes grupos, como se destaca en la Tabla 5.

Tabla 5: Grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis/Vía/Calendario
1	Vehículo IV (PBS)	N/A / IV / Q3Dx4
2	PO Vehículo (sacarosa)	N/A / PO / QD
3	Anti-PD-1	200 µg / IP / Q4Dx3
4	VE de <i>Veillonella parvula</i>	10 µg / IV / Q3Dx4
5	VE de <i>Veillonella parvula</i>	5 µg / IV / Q3Dx4
6	VE de <i>Veillonella parvula</i>	2 µg / IV / Q3Dx4
7	VE de <i>Veillonella tobetsuensis</i>	75 µg / PO. QD
8	VE de <i>Veillonella tobetsuensis</i>	5 µg / IV / Q3Dx4

Como se ha indicado en la tabla, los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a 200 µg/ratón (100 µl de volumen final) cada cuatro días, desde el día 1, para un total de 3 veces (Q4Dx3) y las VE cuando se administran por vía intravenosa (i.v.) se inyectaron cada tercer día, desde el día 1 para un total de 4 veces (Q3Dx4). Los grupos de tratamiento administrados por boca (p.o.) se administran diariamente (QD). La eficacia de las VE de *Veillonella* varía dependiendo del microorganismo de origen, la dosis, y la vía de administración (**Figs. 14 y 15**).

Incorporación por referencia

Todas las publicaciones de solicitudes de patente

mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad al presente documento como si cada publicación o solicitud de patente individual se hubiera citado específica e individualmente para su
5 incorporación como referencia. En caso de conflicto, la presente solicitud, incluidas las definiciones del presente documento, prevalecerá.

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces
10 de determinar, usando nada más que la experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes sean abarcados por las siguientes reivindicaciones.

15 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

20

25

30