

Vesículas extracelulares microbianas procesadas

SOLICITUDES RELACIONADAS

[1] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud provisoria de patente de los EE. UU. N.º 62/860,029, presentada el 11 de junio de 2019; la Solicitud provisoria de patente de los EE. UU. N.º 62/860,049, presentada el 11 de junio de 2019; la Solicitud provisoria de patente de los EE. UU. N.º 62/979,545, presentada el 21 de febrero de 2020; y la Solicitud provisoria de patente de los EE. UU. N.º 62/991,767, presentada el 19 de marzo de 2020, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

SUMARIO

[2] Como se divulga en el presente documento, determinados tipos de vesículas extracelulares microbianas (mEV), tales como vesículas extracelulares microbianas procesadas (pmEV) obtenidas a partir de microbios (tales como bacterias) tienen efectos terapéuticos y son útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades y/o trastornos de la salud.

[3] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento puede contener mEV (tales como pmEV) de una o más fuentes de microbio, p. ej., una o más cepas bacterianas. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento puede contener las mEV de una fuente de microbio, p. ej., una cepa bacteriana. Las cepas bacterianas usadas como una fuente de mEV se pueden seleccionar según las propiedades de las bacterias (p. ej., características de crecimiento, rendimiento, capacidad de modular una respuesta inmunitaria en un ensayo o en un sujeto). Una composición farmacéutica que comprende mEV

puede contener pmEV. La composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[4] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV (tales como pmEV) se puede usar para el tratamiento o prevención de una enfermedad y/o un trastorno de salud, p. ej., en un sujeto (p. ej., ser humano).

[5] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV (tales como pmEV) se puede preparar como un polvo (p. ej., **para** la resuspensión) o como una forma farmacéutica sólida, tales como un comprimido, un minicomprimido, una cápsula, una píldora o un polvo; o una combinación de estas formas (p. ej., minicomprimidos comprendidos en una cápsula). La forma farmacéutica sólida puede comprender un recubrimiento (p. ej., recubrimiento entérico).

[6] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento puede comprender mEV liofilizadas (tales como pmEV). Las mEV liofilizadas (tales como pmEV) se pueden formular en una forma farmacéutica sólida, tal como un comprimido, un minicomprimido, una cápsula, una píldora o un polvo; o se pueden volver a suspender en una solución.

[7] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento puede comprender mEV irradiadas con rayos gamma (tales como pmEV). Las mEV irradiadas con rayos gamma (tales como pmEV) se pueden formular en una forma farmacéutica sólida, tales como un comprimido, un minicomprimido, una cápsula, una píldora o un polvo; o se pueden volver a suspender en una solución.

[8] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que

comprende mEV (tales como pmEV) se puede administrar por vía oral.

[9] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV (tales como pmEV) se puede administrar por vía intravenosa.

[10] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV (tales como pmEV) se puede administrar por vía intratumoral o subtumoral, p. ej., a un sujeto que tiene un tumor.

[11] En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden mEV (tales como pmEV) útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o un trastorno de salud (p. ej., trastornos adversos de la salud) (p. ej., un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una disbiosis o una enfermedad metabólica), así como métodos para crear y/o identificar dichas mEV y métodos para usar dichas composiciones farmacéuticas (p. ej., para el tratamiento de un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una disbiosis o una enfermedad metabólica, ya sea solo o en combinación con otras terapéuticas). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tanto mEV como microbios completos a partir de los cuales se obtienen, tales como bacterias, (p. ej., bacterias vivas, bacterias destruidas, bacterias atenuadas). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden mEV en la ausencia de los microbios de los que se obtienen, tales como bacterias (p. ej., más de aproximadamente un 95 % (o más de aproximadamente un 99 %) del contenido obtenido de microbios de la composición farmacéutica comprende mEV).

[12] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden mEV procedentes de una o más de las cepas o especies bacterianas listadas en la tabla 1, la tabla 2 y/o la tabla 3.

[13] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV aisladas (p. ej., de una o más cepas de bacterias (p. ej., bacterias de interés) (p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz de estas). Por ejemplo, en donde al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % del contenido de la composición farmacéutica es mEV aisladas de bacterias (p. ej., bacterias de interés).

[14] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV aisladas (p. ej., de una cepa bacteriana (p. ej., bacterias de interés) (p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz de estas). Por ejemplo, en donde al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % del contenido de la composición farmacéutica es mEV aisladas de bacterias (p. ej., bacterias de interés).

[15] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV procesadas (pmEV).

[16] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende pmEV y las pmEV se producen a partir de bacterias que se han irradiado con rayos gamma, irradiado con UV, inactivado con calor, tratado con ácido o rociado con oxígeno.

[17] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende pmEV y las pmEV se producen a partir de bacterias vivas.

[18] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende pmEV y las pmEV se producen a partir de bacterias muertas.

[19] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende pmEV y las pmEV se producen a partir de bacterias que no se replican.

[20] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV y las mEV son de una cepa de bacterias.

[21] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV y las mEV son de una cepa de bacterias.

[22] En algunas realizaciones, las mEV están liofilizadas (p. ej., el producto liofilizado comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable).

[23] En algunas realizaciones, las mEV se irradian con radiación gamma.

[24] En algunas realizaciones, las mEV se irradian con UV.

[25] En algunas realizaciones, las mEV se inactivan con calor (p. ej., a 50 °C durante dos horas o a 90 °C durante dos horas).

[26] En algunas realizaciones, las mEV se tratan con ácido.

[27] En algunas realizaciones, las mEV se rocían con oxígeno (p. ej., a 0.1 vvm durante dos horas).

[28] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias grampositivas.

[29] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias gramnegativas.

[30] En algunas realizaciones, las bacterias gramnegativas pertenecen a la clase de Negativicutes.

[31] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias aerobias.

[32] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias anaerobias.

[33] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias acidófilas.

[34] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias alcalófilas.

[35] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias neutrófilas.

[36] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias de cultivo exigente.

[37] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias de cultivo no exigente.

[38] En algunas realizaciones, las mEV son de una cepa bacteriana mostrada en la tabla 1, la tabla 2 o la tabla 3.

[39] En algunas realizaciones, las bacterias gramnegativas pertenecen a la clase de *Negativicutes*.

[40] En algunas realizaciones, las bacterias gramnegativas pertenecen a la familia de *Veillonellaceae*, *Selenomonadaceae*, *Acidaminococcaceae* o *Sporomusaceae*.

[41] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias del género *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Propionospora* o *Acidaminococcus*.

[42] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Megasphaera* *sp.*, *Selenomonas* *felix*, *Acidaminococcus* *intestine* o *Propionospora* *sp.*

[43] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias del género *Lactococcus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* o *Veillonella*.

[44] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Lactococcus* *lactis* *cremoris*.

[45] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Prevotella histicola*.

[46] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium animalis*.

[47] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Veillonella parvula*.

[48] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Lactococcus lactis cremoris*. En algunas realizaciones, las bacterias *Lactococcus lactis cremoris* son de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de la Cepa A de *Lactococcus lactis cremoris* (número de registro de ATCC PTA-125368). En algunas realizaciones, las bacterias *Lactococcus* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de la Cepa A de *Lactococcus lactis cremoris* (número de registro de ATCC PTA-125368). En algunas realizaciones, las bacterias *Lactococcus* son de la cepa A de *Lactococcus lactis cremoris* (número de registro de ATCC PTA-125368).

[49] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Prevotella*. En algunas realizaciones, las bacterias *Prevotella* son de una cepa que comprende al menos un 90 % o al menos un 97 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de la Cepa B 50329 de *Prevotella* (número de acceso de NRRL B 50329). En algunas realizaciones, las bacterias *Prevotella* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de la Cepa B 50329 de *Prevotella* (número de acceso de NRRL B 50329). En algunas

realizaciones, las bacterias *Prevotella* son de la Cepa B 50329 de *Prevotella* (número de acceso de NRRL B 50329).

[50] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium*. En algunas realizaciones, las bacterias *Bifidobacterium* son de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Bifidobacterium* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125097. En algunas realizaciones, las bacterias *Bifidobacterium* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Bifidobacterium* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125097. En algunas realizaciones, las bacterias *Bifidobacterium* son de bacterias *Bifidobacterium* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125097.

[51] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Veillonella*. En algunas realizaciones, las bacterias *Veillonella* son de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Veillonella* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125691. En algunas realizaciones, las bacterias *Veillonella* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Veillonella* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125691. En algunas realizaciones, las bacterias *Veillonella* son de bacterias *Veillonella* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125691.

[52] En algunas realizaciones, las mEV son de las bacterias *Ruminococcus gnavus*. En algunas realizaciones, las bacterias *Ruminococcus gnavus* son de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Ruminococcus gnavus* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126695. En algunas realizaciones, las bacterias *Ruminococcus gnavus* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Ruminococcus gnavus* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126695. En algunas realizaciones, las bacterias *Ruminococcus gnavus* son de las bacterias *Ruminococcus gnavus* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126695.

[53] En algunas realizaciones, las mEV son de las bacterias *Megasphaera sp.* En algunas realizaciones, las bacterias *Megasphaera sp.* son de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Megasphaera sp.* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126770. En algunas realizaciones, las bacterias *Megasphaera sp.* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Megasphaera sp.* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126770. En algunas realizaciones, las bacterias *Megasphaera sp.* son de las bacterias *Megasphaera sp.* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126770.

[54] En algunas realizaciones, las mEV son de las bacterias *Fournierella massiliensis*. En algunas realizaciones, las bacterias *Fournierella massiliensis* son

de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Fournierella massiliensis* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126694. En algunas realizaciones, las bacterias *Fournierella massiliensis* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Fournierella massiliensis* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126694. En algunas realizaciones, las bacterias *Fournierella massiliensis* son de las bacterias *Fournierella massiliensis* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126694.

[55] En algunas realizaciones, las mEV son de las bacterias *Harryflintia acetispora*. En algunas realizaciones, las bacterias *Harryflintia acetispora* son de una cepa que comprende al menos un 90 % (o al menos un 97 %) de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Harryflintia acetispora* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126696. En algunas realizaciones, las bacterias *Harryflintia acetispora* son de una cepa que comprende al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Harryflintia acetispora* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-126696. En algunas realizaciones, las bacterias *Harryflintia acetispora* son de las bacterias *Harryflintia acetispora* depositadas como un número de asignación de ATCC PTA-126696.

[56] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias del género *Akkermansia*, *Christensenella*, *Blautia*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* o *Erysipelatoclostridium*.

[57] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris*, *Blautia wexlerae*, *Eubacterium faecium*, *Eubacterium contortum*, *Eubacterium rectale*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus villorum*, *Enterococcus gallinarum*; *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* o *Bifidobacterium breve*.

[58] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias BCG (bacilo Calmette-Guerin), *Parabacteroides*, *Blautia*, *Veillonella*, *Lactobacillus salivarius*, *Agathobaculum*, *Ruminococcus gnavus*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Turicibacter sanguinus*, *Burkholderia*, *Klebsiella quasipneumoniae ssp similpneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Tyzzerella nexilis* o *Neisseria*.

[59] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Blautia hydrogenotrophica*.

[60] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Blautia stercoris*.

[61] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Blautia wexlerae*.

[62] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Enterococcus gallinarum*.

[63] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Enterococcus faecium*.

[64] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium bifidum*.

[65] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium breve*.

[66] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium longum*.

[67] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Roseburia hominis*.

[68] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bacteroides thetaiotaomicron*.

[69] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bacteroides coprocola*.

[70] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Erysipelatoclostridium ramosum*.

[71] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Megasphaera massiliensis*.

[72] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Eubacterium*.

[73] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Parabacteroides distasonis*.

[74] En determinados aspectos, las mEV (tales como pmEV) se obtienen a partir de bacterias que se han seleccionado según determinadas propiedades deseables, tales como una toxicidad reducida y efectos adversos. (p. ej., retirando o eliminando lipopolisacáridos (LPS)), administración oral mejorada (p. ej., mejorando la resistencia a los ácidos, la mucoadherencia y/o la penetración y/o la resistencia a los ácidos biliares, la resistencia a los péptidos antimicrobianos y/o la neutralización de anticuerpos), tipos de células deseadas diana (p. ej., células M, células caliciformes, enterocitos, células dendríticas, macrófagos) biodisponibilidad mejorada sistémicamente en un nicho apropiado (p. ej., ganglios linfáticos mesentéricos, parches de Peyer, lámina propia, ganglios linfáticos que drenan el tumor y/o la sangre), efecto inmunomodulador y/o terapéutico mejorado (p. ej., o bien solo o bien en combinación con otro agente terapéutico), aumento en la activación inmune y/o en los atributos de la fabricación (p. ej., características de crecimiento, rendimiento, mayor estabilidad, tolerancia mejorada a la

congelación y descongelación, tiempos de generación más cortos).

[75] En determinados aspectos, las mEV son de bacterias modificadas por ingeniería que se modifican para potenciar determinadas propiedades deseables. En algunas realizaciones, las bacterias modificadas por ingeniería se modifican de modo que mEV (tales como pmEV) producidas a partir de ellas tengan una toxicidad reducida y efectos adversos. (p. ej., retirando o eliminando lipopolisacáridos (LPS)), administración oral mejorada (p. ej., mejorando la resistencia a los ácidos, la mucoadherencia y/o la penetración y/o la resistencia a los ácidos biliares, la resistencia a los péptidos antimicrobianos y/o la neutralización de anticuerpos), tipos de células deseadas diana (por ejemplo células M, células caliciformes, enterocitos, células dendríticas, macrófagos) biodisponibilidad mejorada sistémicamente en un nicho apropiado (p. ej., ganglios linfáticos mesentéricos, parches de Peyer, lámina propia, ganglios linfáticos que drenan el tumor y/o la sangre), efecto inmunomodulador y/o terapéutico mejorado (p. ej., o bien solo o bien en combinación con otro agente terapéutico), activación inmune aumentada y/o una mejora en los atributos de la fabricación (p. ej., características de crecimiento, rendimiento, mayor estabilidad, tolerancia mejorada a la congelación y descongelación, tiempos de generación más cortos). En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos para crear dichas mEV (tales como pmEV).

[76] En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden mEV (tales como pmEV) útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o un trastorno de salud (p. ej., un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una

enfermedad inflamatoria o una enfermedad metabólica), así como los métodos para crear y/o identificar dichas mEV y métodos para usar dichas composiciones farmacéuticas (p. ej., para el tratamiento de un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad metabólica), ya sea solo o en combinación con una o más otras terapéuticas.

[77] Las composiciones farmacéuticas que contienen las mEV (tales como pmEV) pueden proporcionar una potencia comparable con o superior a las composiciones farmacéuticas que contienen los microbios completos de las cuales se obtienen las mEV. Por ejemplo, en la misma dosis de las mEV (p. ej., según el recuento de partículas o contenido de proteína), una composición farmacéutica que contiene las mEV puede proporcionar una potencia comparable con o superior a la composición farmacéutica comparable que contiene microbios completos de las cepas bacterianas de las cuales se obtienen las mEV. Dicha mEV que contiene composiciones farmacéuticas puede permitir la administración de dosis más elevadas y provocar una respuesta comparable o superior (p. ej., más efectiva) que la observada con una composición farmacéutica comparable que contiene microbios completos de las mismas cepas bacterianas de las cuales se obtienen las mEV.

[78] Como ejemplo adicional, en la misma dosis (p. ej., según el recuento de partículas o el contenido de proteína), una composición farmacéutica que contiene las mEV puede contener menos material derivado de los microbios (según el recuento de partículas o el contenido de proteína), en comparación con una composición farmacéutica que contiene los microbios completos de las mismas cepas bacterianas de las cuales se obtienen las mEV, al mismo tiempo que se

proporciona un beneficio terapéutico equivalente o superior al sujeto que recibe dicha composición farmacéutica.

[79] Como ejemplo adicional, se pueden administrar las mEV en dosis p. ej., de aproximadamente 1×10^7 -aproximadamente 1×10^{15} partículas, p. ej., según lo medido por NTA.

[80] Como otro ejemplo, se pueden administrar las mEV en dosis p. ej., de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 900 mg de proteínas totales, p. ej., según lo medido por el ensayo de Bradford. Como otro ejemplo, se pueden administrar las mEV en dosis p. ej., de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 900 mg de proteínas totales, p. ej., según lo medido por el ensayo de BCA.

[81] En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno inmunitario (p. ej., una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una alergia) que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad metabólica que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad neurológica que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

[82] En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto un antibiótico. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una o más otras terapias contra el cáncer (p. ej., retirada quirúrgica de un tumor, la administración de un agente quimioterápico, la administración de terapia por radiación, y/o la administración de una inmunoterapia contra el cáncer, tal como un inhibidor del punto de control inmunitario, un anticuerpo específico contra el cáncer, una vacuna contra el cáncer, una célula presentadora de antígenos cebada, un linfocito T específico del cáncer, un linfocito T con receptor de antígeno quimérico específico para el cáncer (CAR), una proteína de activación inmunitaria y/o un adyuvante). En algunas realizaciones, el método comprende, además, la administración de otra bacteria y/o mEV terapéutica (tal como pmEV) de una o más cepas bacterianas (p. ej., bacteria terapéutica). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un inmunosupresor y/o un agente antiinflamatorio. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un agente terapéutico para una enfermedad metabólica.

[83] En determinados aspectos, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad (p. ej., un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una disbiosis o una enfermedad metabólica) o un trastorno de salud, ya sea solo o en combinación con una o más agentes terapéuticos adicionales.

[84] En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de un cáncer en un sujeto (p. ej., ser

humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento a la composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de un trastorno inmunitario (p. ej., una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una alergia) en un sujeto (p. ej., ser humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento del trastorno inmunitario. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de una disbiosis en un sujeto (p. ej., ser humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la disbiosis. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento a la composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad metabólica en un sujeto (p. ej., ser humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la enfermedad metabólica. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento a la composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad neurológica en un sujeto (p. ej., ser humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento del trastorno neurológico.

[85] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV se puede usar en combinación con un antibiótico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende las mEV se puede usar en combinación con una o más terapias contra el cáncer (p. ej., retirada quirúrgica de un tumor, el uso de un agente quimioterápico, el uso de terapia por radiación, y/o el uso de una inmunoterapia contra el cáncer, tal como un inhibidor del punto de control inmunitario, un anticuerpo específico contra el cáncer, una vacuna contra el cáncer, una célula presentadora de antígeno cebada, un linfocito T específico del cáncer, un linfocito T con receptor de antígeno quimérico específico para el cáncer (CAR), una proteína de activación inmunitaria y/o un adyuvante). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV puede usarse en combinación con otra bacteria terapéutica y/o mEV obtenidas a partir de una o más cepas bacterianas diferentes (p. ej., bacteria terapéutica). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV puede usarse en combinación con uno o más supresores inmunitarios y/o agentes antiinflamatorios. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV puede usarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes para la enfermedad metabólica.

[86] En determinados aspectos, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad (p. ej., un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una disbiosis o una enfermedad metabólica), ya sea solo o en combinación con otro agente terapéutico. En algunas realizaciones, el uso es en combinación con otra bacteria terapéutica y/o mEV

obtenidas a partir de una o más cepas bacterianas diferentes (p. ej., bacteria terapéutica).

[87] En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir un cáncer en un sujeto (p. ej., ser humano). La composición farmacéutica se puede usar ya sea sola o en combinación con otro agente terapéutico para el cáncer. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir un trastorno inmunitario (p. ej., una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una alergia) en un sujeto (p. ej., ser humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el trastorno inmunitario. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir una disbiosis en un sujeto (p. ej., ser humano). La composición farmacéutica se puede usar ya sea sola o en combinación con otro agente terapéutico para la disbiosis. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV) para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad metabólica en un sujeto (p. ej., ser humano). La composición farmacéutica se puede usar ya sea sola o en combinación con otro agente terapéutico para la enfermedad metabólica. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como pmEV)

para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad neurológica en un sujeto (p. ej., ser humano). Se puede usar la composición farmacéutica ya sea sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el trastorno neurológico.

[88] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV se puede usar en combinación con un antibiótico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende las mEV se puede usar en combinación con una o más terapias contra el cáncer (p. ej., retirada quirúrgica de un tumor, el uso de un agente quimioterápico, el uso de terapia por radiación, y/o el uso de una inmunoterapia contra el cáncer, tal como un inhibidor del punto de control inmunitario, un anticuerpo específico contra el cáncer, una vacuna contra el cáncer, una célula presentadora de antígeno cebada, un linfocito T específico del cáncer, un linfocito T con receptor de antígeno quimérico específico para el cáncer (CAR), una proteína de activación inmunitaria y/o un adyuvante). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV puede usarse en combinación con otra bacteria terapéutica y/o mEV obtenidas a partir de una o más cepas bacterianas diferentes (p. ej., bacteria terapéutica). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV puede usarse en combinación con uno o más supresores inmunitarios y/o agentes antiinflamatorios adicionales. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede usarse en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos de la enfermedad metabólica.

[89] Una composición farmacéutica, p. ej., como se describe en el presente documento, que comprende mEV (tales como pmEV) puede proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de mEV a un sujeto, p. ej., un ser humano.

[90] Una composición farmacéutica, p. ej., como se describe en el presente documento, que comprende mEV (tales como pmEV) puede proporcionar una cantidad no natural de los componentes terapéuticamente eficaces (p. ej., presentes en las mEV (tales como pmEV) a un sujeto, p. ej., un humano.

[91] Una composición farmacéutica, p. ej., como se describe en el presente documento, que comprende mEV (tales como pmEV) puede proporcionar una cantidad no natural de los componentes terapéuticamente eficaces (p. ej., presentes en las mEV (tales como pmEV) a un sujeto, p. ej., un humano.

[92] Una composición farmacéutica, p. ej., como se describe en el presente documento, que comprende mEV (tales como pmEV) puede aportar aproximadamente uno o más cambios a un sujeto, p. ej., ser humano, p. ej., para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno de salud.

[93] Una composición farmacéutica, p. ej., como se describe en el presente documento, que comprende mEV (tales como pmEV) tiene el potencial de una utilidad significativa, p. ej., para afectar un sujeto, p. ej., un humano, p. ej., para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno de salud.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[94] **La Figura 1** muestra la eficacia de las vesículas extracelulares microbianas procesadas (pmEV) administradas i.v. de *B. animalis ssp. lactis* en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[95] **La Figura 2** muestra la eficacia de pmEV de *Anaerostipes hadrus* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[96] **La Figura 3** muestra la eficacia de pmEV de *S. pyogenes* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-

1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[97] **La Figura 4** muestra la eficacia de pmEV de *P. benzoelyticum* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[98] **La Figura 5** muestra la eficacia de pmEV de *Hungatella sp.* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[99] **La Figura 6** muestra la eficacia de pmEV de *S. aureus* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[100] **La Figura 7** muestra la eficacia de pmEV de *R. gnavus* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[101] **La Figura 8** muestra la eficacia de pmEV de *B. animalis ssp. lactis* y *Megasphaera massiliensis* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[102] **La Figura 9** muestra la eficacia de pmEV de *R. gnavus* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 9.

[103] **La Figura 10** muestra la eficacia de pmEV de *R. gnavus* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[104] **La Figura 11** muestra la eficacia de pmEV de *B. animalis ssp. lactis* administradas i.v. sola o en

combinación con anti-PD-1 en comparación con la de anti-PD-1 (sola) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 9.

[105] **La Figura 12** muestra la eficacia de pmEV de *B. animalis ssp. lactis* administradas i.v. sola o en combinación con anti-PD-1 en comparación con la de anti-PD-1 (sola) o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[106] **La Figura 13** muestra la eficacia de pmEV de *P. distasonis* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 9.

[107] **La Figura 14** muestra la eficacia de pmEV de *P. distasonis* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[108] **La Figura 15** muestra la eficacia de pmEV de *P. histicola* administradas por vía oral en comparación con dexametasona. Se evaluaron las pmEV de *P. histicola* en dosificaciones bajas ($6.0E+07$), medias ($6.0E+09$) y elevadas ($6.0E+11$).

[109] **La Figura 16** muestra la eficacia de smEV de *V. parvula* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11.

[110] **La Figura 17** muestra la eficacia de smEV de *V. parvula* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11. Se evaluaron las smEV de *V. parvula* a 2 ug/dosis, 5 ug/dosis y 10 ug/dosis.

[111] **La Figura 18** muestra la eficacia de smEV de *V. atypica* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma

colorrectal en ratones el día 11. Se evaluaron las smEV de *V. atypica* a 2.0×10^{11} PC, 7.0×10^{10} PC y 1.5×10^{10} PC.

[112] **La Figura 19** muestra la eficacia de smEV de *V. tobetsuensis* administradas i.v. en comparación con las anti-PD-1 administradas i.p. o vehículo en un modelo de carcinoma colorrectal en ratones el día 11. Se evaluaron las smEV de *V. tobetsuensis* a 2 ug/dosis, 5 ug/dosis y 10 ug/dosis.

[113] **La Figura 20** muestra la eficacia de smEV administradas por vía oral y smEV liofilizadas de *Prevotella histicola* en concentraciones elevadas (6.0×10^{11} recuento de partículas), medias (6.0×10^9 recuento de partículas) y bajas (6.0×10^7 recuento de partículas) en la reducción de la hinchazón de oído específica del antígeno (grosor de la oreja) a las 24 horas en comparación con el vehículo (control negativo) y dexametasona (control positivo) después del desafío del antígeno en un modelo de hipersensibilidad de tipo retrasado basado en KLH.

[114] **La Figura 21** muestra la eficacia (tal como se determina por mediciones de oído de 24 horas) de tres dosis (baja, media, alta) de pmEV y pmEV liofilizadas a partir de una cepa de *Prevotella histicola* (*P. histicola*) en comparación con la eficacia de polvo de la misma cepa de *Prevotella histicola* en la reducción del grosor del oído en un punto de tiempo de 24 horas en un modelo DTH. Se usó dexametasona como un control positivo.

[115] **La Figura 22** muestra la eficacia (tal como se determina por mediciones de oído de 24 horas) de tres dosis (baja, media, alta) de smEV a partir de una cepa de *Veillonella parvula* (*V. parvula*) y de las pmEV y las pmEV de gamma irradiada (GI) a partir de la misma cepa de *Veillonella parvula* en comparación con la eficacia de un polvo de gamma irradiada (GI) a partir de la misma cepa de *Veillonella*

parvula en la reducción del grosor del oído en un punto de tiempo de 24 horas en un modelo DTH. Se usó dexametasona como un control positivo.

[116] **La Figura 23** muestra la eficacia (según lo determinado por las mediciones del oído a las 24 horas) de dos dosis (alta y baja) de las smEV de *Megasphaera Sp.* Cepa A.

[117] **La Figura 24** muestra la eficacia (según lo determinado por las mediciones del oído a las 24 horas) de dos dosis (alta y baja) de las smEV de *Megasphaera Sp.* Cepa B.

[118] **La Figura 25** muestra la eficacia (según lo determinado por las mediciones del oído a las 24 horas) de dos dosis (alta y baja) de las smEV de *Selenomonas felix*.

[119] **La Figura 26** muestra las smEV de *Megasphaera Sp.* Cepa A que inducen la producción de citocinas a partir de células U937 diferenciadas por PMA. Se trataron las células U937 con las smEV en concentraciones de 1×10^6 – 1×10^9 así como controles de agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) durante 24 horas y se midió la producción de citocinas. "Blanco" indica el control de medio.

[120] **Las Figuras 27A y 27B** muestran el resumen del volumen del tumor al día 22 (Figura 27A) y curvas del volumen del tumor (Figura 27B) en comparación con las smEV *Megasphaera sp.* Cepa A (2×10^{11}) contra un control negativo (vehículo PBS) y control positivo (anti-PD-1).

[121] **Las Figuras 28A y 28B** muestran el resumen del volumen del tumor al día 23 (Figura 28A) y curvas del volumen del tumor (Figura 28B) en comparación con las smEV *Megasphaera sp.* Cepa A. smEV en 3 dosis (2×10^{11} , 2×10^9 y 2×10^7) BID, así como las smEV *Megasphaera sp.* (2×10^{11}) QD contra un control negativo (vehículo PBS) y control positivo (anti-PD-1).

[122] **La Figura 29** muestra los volúmenes del tumor después de que los tumores d10 se dosificaron una vez al día durante 14 días con las pmEV de *E. gallinarum* Cepas A y B.

[123] **La Figura 30** muestra las EV de *Megasphaera* Sp. Cepa A que inducen la producción de citocinas a partir de células U937 diferenciadas por PMA. La liberación de citocinas se midió mediante MSD ELISA. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

[124] **La Figura 31** muestra las EV de *Megasphaera* Sp. Cepa B que inducen la producción de citocinas a partir de células U937 diferenciadas por PMA. La liberación de citocinas se midió mediante MSD ELISA. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

[125] **La Figura 32** muestra las EV de *Selenomonas felix* que inducen la producción de citocinas a partir de las células U937 diferenciadas por PMA. La liberación de citocinas se midió mediante MSD ELISA. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

[126] **La Figura 33** muestra las EV de *Acidaminococcus intestini* que inducen la producción de citocinas a partir de las células U937 diferenciadas por PMA. La liberación de citocinas se midió mediante MSD ELISA. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

[127] **La Figura 34** muestra las EV de *Propionospora* sp. que inducen la producción de citocinas a partir de las células U937 diferenciadas por PMA. La liberación de citocinas se midió mediante MSD ELISA. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[128] "Adyuvante" o "Terapia adyuvante" se refiere ampliamente a un agente que afecta una respuesta inmunológica o fisiológica en un paciente o sujeto (p. ej., ser humano). Por ejemplo, un adyuvante podría aumentar la presencia de un antígeno a lo largo del tiempo o a un área de interés como un tumor, ayudar a absorber un antígeno por una célula presentadora de antígenos, activar macrófagos y linfocitos y apoyar la producción de citocinas. Al cambiar una respuesta inmunitaria, un adyuvante podría permitir que una dosis más pequeña de un agente de interacción inmunitaria aumente la efectividad o la seguridad de una dosis particular del agente de interacción inmunitaria. Por ejemplo, un adyuvante podría evitar el agotamiento de los linfocitos T y, por lo tanto, aumentar la efectividad o la seguridad de un agente de interacción inmunitaria particular.

[129] "Administración" generalmente se refiere a una ruta de administración de una composición (p. ej., una composición farmacéutica) a un sujeto. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración oral, administración rectal, administración tópica, inhalación (nasal) o inyección. La administración mediante inyección incluye administración intravenosa (IV), intramuscular (IM), intratumoral (IT) y subcutánea (SC). Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse en cualquier forma mediante cualquier vía efectiva, incluyendo pero sin limitar a intratumoral, oral, parenteral, enteral, intravenosa, intraperitoneal, tópica, transdérmica (p. ej., usando cualquier parche estándar), intradérmica, oftálmica, por vía (intra)nasal, local, no oral, tal como aerosol, inhalación, subcutánea,

intramuscular, bucal, sublingual, (trans)rectal, vaginal, intraarterial, e intratecal, transmucosa (p. ej., sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (p. ej., por vía trans y perivaginal), implantada, intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, e intrabronquial. En realizaciones preferidas, una composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra por vía oral, rectal, intratumoral, tópica, intravesical, mediante inyección en o adyacente a un ganglio linfático de drenaje, por vía intravenosa, mediante inhalación o aerosol, o por vía subcutánea. En otra realización preferida, una composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra por vía oral, intratumoral o intravenosa.

[130] Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" puede referirse tanto a un anticuerpo intacto como un fragmento 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 como V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo aminoterminal hasta el extremo carboxiloterminal 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 interactúa con un antígeno. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno.

[131] Las expresiones "fragmento de unión a antígeno" y "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal como se usan en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fv unido por disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios, NANOBOODIES®, CDRH3 aislada, y otros fragmentos de anticuerpos que conservan al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse usando técnicas enzimáticas y/o recombinantes convencionales y pueden seleccionarse para la unión al antígeno de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[132] "Cáncer" se refiere, ampliamente, a un crecimiento anormal, incontrolado, de las propias células del hospedador que conduce a la invasión del tejido circundante y potencialmente tejido distal al sitio inicial de crecimiento celular anormal en el hospedador. Las clases principales incluyen carcinomas, que son cánceres del tejido epitelial (por ejemplo, piel, células escamosas); sarcomas, que son cánceres del tejido conjuntivo (por ejemplo, hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, etc.); leucemias, que son cánceres de tejido formador de sangre (por ejemplo, tejido de médula ósea); linfomas y mielomas,

que son cánceres de células inmunitarias; y cánceres del sistema nervioso central, que incluyen cánceres de cerebro y tejido de la médula espinal. "Cáncer(es)" y "neoplasia(s)" se usan en el presente documento de manera indistinta. Tal como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia, o tumores malignos incluyendo leucemias, carcinomas y sarcomas, ya sea nuevos o recurrentes. Los ejemplos específicos de cánceres son: carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y tumores de tipo mixto. Los ejemplos no limitantes de cánceres son cánceres nuevos o recurrentes del cerebro, melanoma, vejiga, mama, cuello uterino, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, no microcítico de pulmón, mesotelioma, ovario, próstata, sarcoma, estómago, útero y meduloblastoma. En algunas realizaciones, el cáncer comprende un tumor sólido. En algunas realizaciones, el cáncer comprende una metástasis.

[133] Un "carbohidrato" se refiere a un azúcar o polímero de azúcares. Los términos "sacárido", "polisacárido", "carbohidrato" y "oligosacárido" se pueden usar de manera intercambiable. La mayoría de los carbohidratos son aldehídos o cetonas con muchos grupos hidroxilo, generalmente uno en cada átomo de carbono de la molécula. Los carbohidratos, en general, tienen la fórmula molecular $C_nH_{2n}O_n$. Un carbohidrato puede ser un monosacárido, un disacárido, trisacárido, oligosacárido o polisacárido. El hidrato de carbono más básico es un monosacárido, como glucosa, galactosa, manosa, ribosa, arabinosa, xilosa y fructosa. Los disacáridos son dos monosacáridos unidos. Los disacáridos ilustrativos incluyen sacarosa, maltosa, celobiosa, y lactosa. Normalmente, un oligosacárido incluye entre tres y seis unidades de monosacárido (p. ej., rafinosa, estaquiosa) y los polisacáridos incluyen seis o más unidades

de monosacárido. Los polisacáridos ilustrativos incluyen almidón, glucógeno y celulosa. Los carbohidratos pueden contener unidades de sacárido modificadas tales como 2'-desoxirribosa, donde se retira un grupo hidroxilo, 2'-fluororribosa, donde se reemplaza un grupo hidroxilo con a flúor, o N-acetilglucosamina, una forma de glucosa que contiene nitrógeno (p. ej., 2'-fluororribosa, desoxirribosa, y hexosa). Los carbohidratos pueden existir en muchas formas diferentes, por ejemplo, confómeros, formas cíclicas, formas acíclicas, estereoisómeros, tautómeros, anómeros e isómeros.

[134] "Aumento celular" se refiere ampliamente a la afluencia de células o la expansión de células en un entorno que no está sustancialmente presente en el entorno antes de la administración de una composición y no presente en la propia composición. Las células que aumentan el entorno incluyen células inmunitarias, células del estroma, células bacterianas y fúngicas. Los entornos de interés particular son los microentornos donde residen o se ubican las células cancerosas. En algunos casos, el microentorno es un microentorno tumoral o un ganglio linfático de drenaje tumoral. 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 acumulará después de la administración remota.

[135] "Clado" se refiere a las OTU (Unidades Taxonómicas Operativas) o miembros de un árbol filogenético que se encuentran después de un nodo estadísticamente válido en un árbol filogenético. El clado comprende un conjunto de hojas terminales en el árbol filogenético que es una unidad evolutiva monofilética distinta y que comparten cierto grado de similitud de secuencia.

[136] Una "combinación" de las mEV (tales como smEV) dos o más cepas microbianas incluye la coexistencia física de los microbios a partir de las cuales se obtienen las mEV (tales como smEV), en el mismo material o producto o en productos conectados físicamente, así como la coadministración temporal o colocalización de las mEV (tales como smEV) de las dos cepas.

[137] "Disbiosis" se refiere a un estado de la microbiota o microbioma del intestino u otra área del cuerpo, que incluye, por ejemplo, la mucosa o las superficies de la piel (o cualquier otro nicho de microbioma) en el que la diversidad normal y/o la función de las redes ecológicas de microbioma intestinal del hospedador ("microbioma") están alteradas. Un estado de disbiosis puede dar como resultado un estado patológico, o puede ser poco saludable solo bajo ciertos estados o solo si está presente durante un período prolongado. La disbiosis puede deberse a una variedad de factores, incluyendo factores ambientales, agentes infecciosos, genotipo del hospedador, dieta del hospedador y/o estrés. Una disbiosis puede dar como resultado: un cambio (p. ej., aumento o disminución) en la prevalencia de uno o más tipos de bacterias (p. ej., anaeróbico), especies y/o cepas, cambio (p. ej., aumento o disminución) en la diversidad de la composición de la población de microbioma del hospedador; un cambio (p. ej., aumento o reducción) de una o más poblaciones de organismos simbiotes que da como resultado una reducción o pérdida de uno o más efectos beneficiosos; sobrecrecimiento de una o más poblaciones de patógenos (p. ej., bacterias patógenas); y/o la presencia de, y/o sobrecrecimiento de, organismos simbióticos que provocan enfermedad solo cuando hay presentes determinadas condiciones.

[138] El término "disminuir" o "agotar" significa un cambio, de modo que la diferencia es, dependiendo de las circunstancias, de al menos un 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 un estado previo al tratamiento. Las propiedades que pueden disminuir incluyen el número de células inmunitarias, células bacterianas, células del estroma, células supresoras derivadas de mieloides, fibroblastos, metabolitos; el nivel de una citocina; u otro parámetro físico (tal como el grosor de la oreja (p. ej., en un modelo animal de DTH) o el tamaño tumoral (p. ej., en un modelo de tumor animal)).

[139] El término "consorcio ecológico" es un grupo de bacterias que intercambian metabolitos y se corregulan positivamente entre sí, en contraste con dos bacterias que inducen la sinergia del hospedador a través de la activación de vías complementarias del hospedador para mejorar la eficacia.

[140] Tal como se usa en el presente documento, "bacterias modificadas por ingeniería" son cualquier bacteria que se han alterado genéticamente de su estado natural por la actividad humana y la progenie de tales bacterias. Las bacterias modificadas por ingeniería incluyen, por ejemplo, los productos de modificación genética dirigida, los productos de selecciones de mutagénesis aleatoria y los productos de evolución dirigida.

[141] El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse de manera específica a un anticuerpo o receptor de linfocitos T. Los epítipos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar. Determinados epítipos pueden

definirse por una secuencia particular de aminoácidos a la que un anticuerpo puede unirse.

[142] El término "gen" se usa 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 esa secuencia genómica.

[143] La "identidad" entre las secuencias de ácido nucleico de dos moléculas de ácido nucleico puede determinarse como un porcentaje de identidad usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros predeterminados como en Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:2444 (otros programas incluyen el paquete de programa 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, la función BLAST de la base de datos de Información del Centro Nacional de Biotecnología puede usarse para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercialmente o públicamente incluyen el programa DNASTar "MegAlign" (Madison, Wis.) y el programa "Gap" de la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison Wis.)).

[144] 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. Las enfermedades inmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias (p. ej., psoriasis, dermatitis atópica, lupus, esclerodermia, anemia

hemolítica, vasculitis, diabetes tipo uno, enfermedad de Grave, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, síndrome de Goodpasture, anemia perniciosa y/o miopatía), enfermedades inflamatorias (p. ej., acné común, asma, enfermedad celíaca, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, sarcoidosis, rechazo de trasplante, vasculitis y/o cistitis intersticial), y/o alergias (p. ej., alergias alimentarias, alergias a fármacos y/o alergias ambientales).

[145] La "inmunoterapia" es un tratamiento que usa el sistema inmunitario de un sujeto para tratar enfermedades (p. ej., enfermedad inmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad metabólica, cáncer) e incluye, por ejemplo, inhibidores de puntos de control, vacunas contra el cáncer, citocinas, terapia celular, células CAR-T, y terapia con células dendríticas.

[146] El término "aumento" significa un cambio, de modo que la diferencia es, dependiendo de las circunstancias, al menos un 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 mayor después del tratamiento en comparación con un estado previo al tratamiento. Las propiedades que pueden aumentarse incluyen el número de células inmunes, células bacterianas, células del estroma, células supresoras derivadas de mieloides, fibroblastos, metabolitos; el nivel de una citocina; u otro parámetro físico (tal como el grosor de la oreja (p. ej., en un modelo animal DTH) o el tamaño del tumor) (p. ej., en un modelo de tumor animal).

[147] Los "agonistas inmunitarios innatos" o "inmunoadyuvantes" son moléculas pequeñas, proteínas u otros agentes que se dirigen específicamente a los receptores

inmunitarios innatos, incluyendo los receptores de tipo Toll (TLR), los receptores NOD, los RLR, los receptores de lectina tipo C, los componentes de la ruta STING-cGAS, complejos de inflammasomas. Por ejemplo, el LPS es un agonista de TLR-4 que se deriva de o sintetiza por bacterias y el aluminio puede usarse como adyuvante inmunoestimulante. Los inmunoadyuvantes son una clase específica de adyuvante más amplio o terapia adyuvante. Los ejemplos de agonistas de STING incluyen, pero sin limitación, 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 análogo de bis-fosforotioato de 2'3'-cGAMP). Los ejemplos de los agonistas de TLR incluyen, pero sin limitación, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 y TLR11. Los ejemplos de agonistas de NOD incluyen, pero sin limitación, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (muramildipéptido (MDP)), ácido gamma-D-glutamil-meso-diaminopimélico (iE-DAP), y desmuramilpéptidos (DMP).

[148] El "espaciador transcrito interno" o "ITS" es un fragmento de ARN no funcional ubicado entre los ARN ribosómicos estructurales (ARNr) en un transcrito precursor común que se usa a menudo para la identificación de especies eucariotas en hongos particulares. El ARNr de hongos que forma el núcleo del ribosoma se transcribe como un gen señal y consta de las regiones 8S, 5.8S y 28S con ITS4 y 5 entre las regiones 8S y 5.8S y 5.8S y 28S, respectivamente. Estos dos segmentos intercistronicos entre las regiones 18S y 5.8S y 5.8S y 28S se eliminan mediante corte y empalme y contienen una variación significativa entre especies para propósitos de códigos de barras como se describió 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 usa tradicionalmente

para la reconstrucción filogenética, sin embargo, el ITS puede cumplir esta función, ya que generalmente está altamente conservado pero contiene regiones hipervariables que albergan suficiente diversidad de nucleótidos para diferenciar las especies de la mayoría de los hongos.

[149] El término "aislado" o "enriquecido" abarca un microbio, una mEV (tal como una smEV) u otra entidad o sustancia que se ha (1) separado de al menos algunos de los componentes con los que se asoció cuando se produjo inicialmente (ya sea en naturaleza o en un entorno experimental), y/o (2) producido, preparado, purificado, y/o fabricado por la mano del hombre. Los microbios aislados o mEV pueden separarse de al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, o más de los otros componentes con lo que se asociaron inicialmente. En algunas realizaciones, los microbios aislados o mEV son más de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, o más de aproximadamente un 99 % puro, p. ej., sustancialmente libres de otros componentes. Los términos "purificar", "purificación" y "purificado" se refieren a un microbio o mEV u otro material que se ha separado de al menos algunos de los componentes a los que estaba asociado, ya sea cuando se produjo inicialmente o se generó (p. ej., ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental), o en cualquier momento después de su producción inicial. Un microbio o una

población microbiana o mEV puede considerarse purificado si se aísla en o después de la producción, tal como de un material o ambiente que contiene el microbio o población microbiana o mEV, un microbio purificado o población microbiana o mEV puede contener otros materiales hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, o por encima de aproximadamente un 90 % y todavía se consideran "aislados". En algunas realizaciones, los microbios purificados o una población microbiana o mEV son más de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, o más de aproximadamente un 99 % puros. En el caso de las composiciones microbianas proporcionadas en el presente documento, los uno o más tipos microbianos presentes en la composición pueden purificarse independientemente de uno o más de microbios diferentes producidos y/o presentes en el material o ambiente que contiene el tipo microbiano. Las composiciones microbianas y los componentes microbianos, tales como mEV de las mismas generalmente se purifican de los productos del hábitat residuales.

[150] Tal como se usa en el presente documento un "lípidos" incluye grasas, aceites, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos en cualquier forma incluyendo los ácidos grasos libres. Las grasas, aceites y ácidos grasos

pueden ser saturados, insaturados (cis o trans) o parcialmente insaturados (cis o trans).

[151] La expresión "mutante de LPS o mutante de lipopolisacárido" se refiere, ampliamente, a las bacterias seleccionadas que comprenden la pérdida de LPS. La pérdida de LPS se puede deber a mutaciones o alteraciones en los genes implicados en la biosíntesis del lípido A, tales como *lpxA*, *lpxC* y *lpxD*. Las bacterias que comprenden los mutantes de LPS pueden ser resistentes a aminoglucósidos y polimixinas (polimixina B y colistina).

[152] "Metabolito", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera y todos los compuestos moleculares, composiciones, moléculas, iones, cofactores, catalizadores o nutrientes utilizados como sustratos en cualquier reacción metabólica celular o microbiana o resultantes como compuestos del producto, composiciones, moléculas, iones, cofactores, catalizadores o nutrientes de cualquier reacción metabólica celular o microbiana.

[153] "Microbio" se refiere a cualquier organismo natural o genomanipulado caracterizado como una arquea, un parásito, una bacteria, hongo, alga microscópica, protozoo, y las etapas de desarrollo o etapas del ciclo de vida (p. ej., vegetativo, espora (incluyendo esporulación, latencia y germinación), latente, biopelícula) asociado al organismo. Entre los ejemplos de microbios intestinales se incluyen: *Actinomyces graevenitzii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vultagus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bilophila wadsworthia*, *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter gracilis*, *Clostridia cluster III*, *Clostridia cluster IV*, *Clostridia cluster IX* (grupo de *Acidaminococcaceae*), *Clostridia cluster*

XI, Clostridia cluster XIII (Peptostreptococcus group), Clostridia cluster XIV, Clostridia cluster XV, Collinsella aerofaciens, Coprococcus, Corynebacterium sunsvallense, Desulfomonas pigra, Dorea formicigenerans, Dorea longicatena, Escherichia coli, Eubacterium hadrum, Eubacterium rectale, Faecalibacterium prausnitzii, Gemella, Lactococcus, Lachnospira, Mollicutes cluster XVI, Mollicutes cluster XVIII, Prevotella, Rothia mucilaginosa, Ruminococcus callidus, Ruminococcus gnavus, Ruminococcus torques, y Streptococcus.

[154] Las "vesículas extracelulares microbianas" (mEV) se pueden obtener a partir de microbios tales como bacterias, arqueas, hongos, algas microscópicas, protozoos y parásitos. En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias. Las mEV incluyen las vesículas extracelulares microbianas secretadas (smEV) y vesículas extracelulares microbianas procesadas (pmEV). Las "vesículas extracelulares microbianas secretadas" (smEV) son vesículas que se producen de forma natural derivadas de los microbios. Las smEV están comprendidas de lípidos microbianos y/o proteínas microbianas y/o ácidos nucleicos microbianos y/o restos de carbohidratos microbianos y se aíslan del sobrenadante del cultivo. La producción natural de estas vesículas se puede mejorar artificialmente (p. ej., aumentar) o disminuir a través de la manipulación del entorno en el que las células bacterianas se cultiva (p. ej., mediante alteraciones del medio o temperatura). Además, las composiciones de las smEV se pueden modificar para reducir, aumentar, agregar o eliminar los componentes microbianos por las sustancias extrañas para alterar la eficacia, la estimulación inmunitaria, la estabilidad, la capacidad estimuladora inmunitaria, la estabilidad, la dirección del órgano (p. ej., ganglio linfático), absorción (p. ej.,

gastrointestinal), y/o rendimiento (p. ej., por lo tanto, altera la eficacia). Tal como se usa en el presente documento, el término "composición de smEV purificada" o "composición de smEV" se refiere a una preparación de smEV que se han separado de al menos una sustancia asociada encontrada en un material de origen (p. ej., separado de al menos uno otro componente microbiano) o cualquier material asociado con las smEV en cualquier proceso usado para producir la preparación. También se puede referir a una composición en la que se han enriquecido significativamente componentes específicos. Las "vesículas extracelulares microbianas procesadas" (pmEV) son una recopilación que ocurre de forma no natural de los componentes de la membrana microbiana que se han purificado a partir de microbios lisados de forma artificial (p. ej., bacterias) (p. ej., componentes de la membrana microbiana que se han separado entre sí, componentes de la célula microbiana intracelular) y que pueden comprender partículas de un rango de tamaños variado o seleccionado, según el método de purificación. Se obtiene un grupo de pmEV mediante la alteración química (p. ej., mediante lisozima y/o lisostafina) y/o la alteración física (p. ej., mediante la fuerza mecánica) de las células microbianas y la separación de los componentes de la membrana microbiana de los componentes intracelulares a través de centrifugación y/o ultracentrifugación u otros métodos. La mezcla resultante de las pmEV contiene un enriquecimiento de las membranas microbianas y los componentes de estas (p. ej., proteínas, lípidos, glucanos, polisacáridos, carbohidratos, otros polímeros de la membrana integrales o asociados de forma periférica), de modo que hay un aumento de la concentración de los componentes de la membrana microbiana y una disminución en la concentración (p. ej., dilución) de los contenidos intracelulares, en relación con

los microbios completos. Para las bacterias grampositivas, las pmEV pueden incluir una célula o membranas citoplasmáticas. Para las bacterias gramnegativas, una pmEV puede incluir membranas internas y/o externas. Las bacterias gramnegativas pueden pertenecer a la clase de Negativicutes. Las pmEV se pueden modificar para aumentar la pobreza, ajustar el tamaño de las partículas en la composición, y/o modificar para reducir, aumentar o eliminar los componentes microbianos o las sustancias extrañas para alterar la eficacia, la estimulación inmunitaria, la estabilidad, la capacidad estimuladora inmunitaria, la estabilidad, la dirección del órgano (p. ej., ganglio linfático), absorción (p. ej., gastrointestinal), y/o rendimiento (p. ej., por lo tanto, alterar la eficacia). Las pmEV se puede modificar para agregar, eliminar, enriquecer o diluir componentes específicos, incluidos los componentes intracelulares para los mismos microbios u otros microbios. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición de pmEV purificada" o "composición de pmEV" se refiere a una preparación de pmEV que se han separado de al menos una sustancia asociada encontrada en un material de origen (p. ej., separado de al menos otro componente microbiano) o cualquier material asociado a las pmEV en cualquier proceso utilizado para producir la preparación. También se puede referir a una composición en la que se han enriquecido significativamente componentes específicos.

[155] "Microbioma" se refiere, ampliamente, a los microbios que residen sobre o en el sitio del cuerpo de un sujeto o paciente. Los microbios en un microbioma pueden incluir bacterias, virus, microorganismos eucariotas y/o virus. Los microbios individuales en un microbioma pueden estar metabólicamente activos, inactivos, latentes, o existir como esporas, pueden existir de forma planctónica o

en biopelículas, o pueden estar presentes en el microbioma de manera sostenible o transitoria. El microbioma puede ser un microbioma comensal o de estado sano o un microbioma de una enfermedad. El microbioma puede ser nativo del sujeto o paciente, o los componentes del microbioma pueden modularse, introducirse o reducirse debido a cambios en el estado de salud (por ejemplo, estado precanceroso o canceroso) o a las condiciones del tratamiento (por ejemplo, tratamiento antibiótico, exposición a diferentes microbios). En algunos aspectos, el microbioma se produce en una superficie mucosa. En algunos aspectos, el microbioma es un microbioma intestinal. En algunos aspectos, el microbioma es un microbioma tumoral.

[156] Un "perfil de microbioma" o una "firma de microbioma" de un tejido o muestra se refiere a una caracterización al menos parcial de la composición bacteriana de un microbioma. En algunas realizaciones, un perfil de 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 en un microbioma. En algunas realizaciones, un perfil de 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 asociadas al cáncer están presentes en una muestra. En algunas realizaciones, el perfil del microbioma indica la cantidad relativa o absoluta de cada cepa bacteriana detectada en la muestra. En algunas realizaciones, el perfil de microbioma es un perfil de microbioma asociado al cáncer. Un perfil de microbioma asociado al cáncer es un perfil de microbioma que ocurre con mayor frecuencia en un sujeto que tiene cáncer que en la población general. En algunas realizaciones, el perfil de microbioma asociado al cáncer comprende un número

mayor de cantidad de bacterias asociadas al cáncer que la que normalmente está presente en un microbioma de una muestra de tejido equivalente que se tomó de un individuo que no tiene cáncer.

[157] "Modificado" en referencia a una bacteria se refiere, en general, a una bacteria que ha experimentado un cambio de su forma natural. La modificación bacteriana puede dar lugar a bacterias modificadas genéticamente. Los ejemplos de modificaciones bacterianas incluyen modificación genética, modificación de expresión génica, modificación de fenotipo, modificación de 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, auxotrofia, migración dirigida o antigenicidad. La modificación del fenotipo podría incluir, a modo de ejemplo, el crecimiento de bacterias en medios que modifican el fenotipo de una bacteria de manera que aumenta o disminuye la virulencia.

[158] Un "oncobioma", tal como se usa en el presente documento, comprende una microbiota, tumorigénica y/o asociada a cáncer, donde la microbiota comprende uno o más de un virus, una bacteria, un hongo, un protista, un parásito u otro microbio.

[159] Los microbios y las bacterias "oncotróficas" u "oncófilas" son microbios que están altamente asociados o presentes en un microentorno de cáncer. Pueden seleccionarse preferentemente dentro del medio ambiente, crecer preferentemente en un microentorno de cáncer o en un entorno específico.

[160] "Unidades taxonómicas operativas" y "UTO" se refieren a una hoja terminal de un árbol filogenético, y se define por una secuencia de ácido nucleico, p. ej., el genoma completo, o una secuencia genética específica, y todas las

secuencias que comparten identidad de secuencia con esta secuencia de ácido nucleico a nivel de especie. En algunas realizaciones la secuencia genética específica puede ser la secuencia 16S o una porción de la secuencia 16S. En otras realizaciones, se secuencian y se comparan los genomas completos de dos entidades. En otra realización, pueden compararse genéticamente regiones seleccionadas como etiquetas de secuencia multilocus (MLST), genes específicos o conjuntos de genes. Para 16S, las OTU que comparten ≥ 97 % de identidad de nucleótidos promedio en todo el 16S o alguna región variable del 16S se consideran la misma OTU. Véase por ejemplo Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, 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. "The bacterial species definition in the genomic era". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940. Para genomas completos, MLST, genes específicos, que no sean 16S, o conjuntos de genes OTU que comparten ≥ 95 % de identidad de nucleótidos promedio se consideran la misma OTU. 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 KT, Ramette A, y Tiedje JM. 2006. "The bacterial species definition in the genomic era". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940. Las OTU se definen con frecuencia comparando secuencias entre organismos. En general, se considera que las secuencias con menos de un 95 % de identidad de secuencia no forman parte de la misma OTU. Las OTU también pueden caracterizarse por cualquier combinación de marcadores de nucleótidos o genes, en particular genes altamente conservados (p. ej., genes de

"mantenimiento"), o una combinación de los mismos. Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) con asignaciones taxonómicas hechas a, por ejemplo, géneros, especies y clados filogenéticos se proporcionan en el presente documento.

[161] Tal como se usa en el presente documento, un gen se "sobreeexpresa" en una bacteria si se expresa a un nivel superior en una bacteria modificada genéticamente en al menos algunas condiciones en comparación con lo que expresa una bacteria natural de la misma especie en las mismas condiciones. De manera similar, un gen se "infraexpresa" en una bacteria si se expresa a un nivel inferior en una bacteria modificada genéticamente en al menos algunas condiciones en comparación con lo que expresa una bacteria natural de la misma especie en las mismas condiciones.

[162] Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente. Hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de estos. 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 de gen, locus definidos a partir del análisis de unión, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), micro ARN (miARN), ARN silenciador (ARNip), 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 ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. De haberlas, se pueden conferir modificaciones a la

estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polímero. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como mediante conjugación con un componente de marcado. En todas las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, los nucleótidos de U pueden intercambiarse por nucleótidos de T.

[163] Como se usa en el presente documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Los términos "purificar", "purificación" y "purificado" se refieren a una preparación de mEV (tales como smEV) u otro material que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociado, ya sea cuando se produjo inicialmente o se generó (p. ej., ya sea en naturaleza o en un entorno experimental), o en cualquier momento después de su producción inicial. Una preparación o composiciones de mEV (tales como smEV) puede considerarse purificada si se aísla en o después de la producción, tal como de uno o más componentes bacterianos diferentes, y un microbio purificado o una población microbiana puede contener otros materiales hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, o por encima de aproximadamente un 90 % y todavía se consideran "purificados". En algunas realizaciones, las mEV purificadas (tal como smEV) son más de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más de

aproximadamente un 99 % puras. Las composiciones (o preparaciones) de mEV (tales como una smEV), p. ej., se purifican a partir de productos de hábitat residual.

[164] Tal como se usa en el presente documento, el término "composición de mEV purificada" o "composición de mEV" se refiere a una preparación que incluye mEV (tales como smEV) que se han separado de al menos una sustancia asociada encontrada en un material de origen (p. ej., separado de al menos uno otro componente bacteriano) o cualquier material asociado con las mEV (tales como smEV) en cualquier proceso usado para producir la preparación. También se refiere a una composición que se ha enriquecido o concentrado significativamente. En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV) se concentran en 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, 1000 veces, 10,000 veces o más de 10,000 veces.

[165] "Productos de hábitat residual" se refiere al material derivado del hábitat de la microbiota dentro o en un sujeto. Por ejemplo, la fermentación de los cultivos de microbios puede contener contaminantes, p. ej., otras cepas o formas de microbio (p. ej., bacterias, virus, micoplasma y/u hongos). Por ejemplo, los microbios viven en las heces en el tracto gastrointestinal, en la piel misma, en la saliva, el moco de las vías respiratorias, o las secreciones del tracto genitourinario (es decir, la materia biológica asociada a la comunidad microbiana). Sustancialmente libre de productos residuales del hábitat significa que la composición microbiana ya no contiene la materia biológica asociada al ambiente microbiano o en el cultivo o el sujeto humano o animal y está un 100 % libre, un 99 % libre, un 98 % libre, un 97 % libre, un 96 % libre o un 95 % libre de cualquier materia biológica contaminante asociada a la comunidad microbiana. Los productos residuales del hábitat

pueden incluir materiales abióticos (incluidos alimentos no digeridos) o pueden incluir microorganismos no deseados. Sustancialmente libre de productos del hábitat residual también puede significar que la composición microbiana no contiene células detectables de un contaminante del cultivo o un ser humano o animal y que solo las células microbianas son detectables. En una realización, sustancialmente libre de productos de hábitat residual también puede significar que la composición microbiana no contiene contaminantes virales detectables (incluyendo las bacterias, los virus (p. ej., fagos)), hongos y micoplasmas. En otra realización, significa que menos de un $1 \times 10^{-2} \%$, $1 \times 10^{-3} \%$, $1 \times 10^{-4} \%$, $1 \times 10^{-5} \%$, $1 \times 10^{-6} \%$, $1 \times 10^{-7} \%$, $1 \times 10^{-8} \%$ de las células viables en la composición microbiana son humanas o animales, en comparación con las células microbianas. Existen múltiples formas de lograr este grado de pureza, ninguna de las cuales son limitativas. Por tanto, puede reducirse la contaminación aislando constituyentes deseados a través de múltiples etapas de sembrado en estrías a colonias individuales en medios sólidos hasta que las estrías replicadas (tal como, pero no limitadas a, dos) de colonias individuales en serie hayan mostrado una sola morfología de colonias. Como alternativa, la reducción de la contaminación puede lograrse mediante múltiples series de diluciones en serie a células deseadas individuales (p. ej., una dilución de 10^{-8} o 10^{-9}), tal como a través de múltiples diluciones en serie con factor de dilución de 10. Esto puede confirmarse adicionalmente mostrando que múltiples colonias aisladas tienen formas celulares similares y comportamiento de tinción de Gram. Otros métodos para confirmar la pureza adecuada incluyen el análisis genético (por ejemplo, PCR, secuenciación de ADN), análisis serológico y antigénico, análisis enzimático y metabólico, y métodos que usan instrumentación tal como

citometría de flujo con los reactivos que distinguen los constituyentes deseados de los contaminantes.

[166] Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno predeterminado o la capacidad de un polipéptido para unirse a su componente de unión predeterminado. Normalmente, un anticuerpo o polipéptido se une específicamente a su antígeno o pareja de unión predeterminado/a con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o inferior, y se une al antígeno/pareja de unión predeterminado/a con una afinidad (expresada por la K_D) que es al menos 10 veces inferior, al menos 100 veces inferior o al menos 1000 veces inferior a su afinidad de unión a un antígeno/un pareja de unión no específico/a y no relacionado/a (p. ej., BSA, caseína). Como alternativa, la unión específica se aplica más ampliamente a un sistema de dos componentes donde un componente es una proteína, lípido, carbohidrato o combinación de los mismos y se involucra con el segundo componente que es una proteína, lípido, carbohidrato o combinación de los mismos de una manera específica.

[167] "Cepa" se refiere a un miembro de una especie bacteriana con una firma genética tal que puede diferenciarse de los miembros estrechamente relacionados de la misma especie bacteriana. La firma genética puede ser la ausencia de todo o parte de al menos un gen, la ausencia de toda o parte de al menos una región reguladora (p. ej., un promotor, un terminador, un ribointerruptor, un sitio de unión al ribosoma), la ausencia ("curado") de al menos un plásmido nativo, la presencia de al menos un gen recombinante, la presencia de al menos un gen mutado, la presencia de al menos un gen exógeno (un gen procedente de otra especie), la presencia de al menos una región reguladora mutada (p. ej.,

un promotor, un terminador, un ribointerruptor, un sitio de unión al ribosoma), la presencia de al menos un plásmido no nativo, la presencia de al menos un casete de resistencia a antibióticos o una combinación de los mismos. Las características genéticas entre diferentes cepas pueden identificarse mediante amplificación por PCR opcionalmente seguida de secuenciación de ADN de la región o regiones genómicas de interés o del genoma entero. En caso de que una cepa (en comparación con otra de la misma especie) haya ganado o perdido resistencia a antibióticos o haya ganado o perdido una capacidad biosintética (tal como una cepa auxótrofa), las cepas pueden diferenciarse mediante selección o contraselección usando un antibiótico o un nutriente/metabolito, respectivamente.

[168] Los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a cualquier mamífero. Un sujeto o un paciente descrito como "que lo necesite" se refiere a aquel que necesita un tratamiento (o la prevención) para una enfermedad. Los mamíferos (es decir, animales mamíferos) incluyen seres humanos, animales de laboratorio (p. ej., primates, ratas, ratones), ganado (p. ej., vacas, ovejas, cabras, cerdos) y mascotas domésticas (p. ej., perros, gatos, roedores). El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano, incluyendo, pero sin limitación, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un cerdo, un burro, una cabra, un camello, un ratón, una rata, un cobaya, una oveja, una llama, un mono, un gorila o un chimpancé. El sujeto puede ser sano o puede estar padeciendo un cáncer en cualquier etapa del desarrollo, donde cualquiera de las etapas son causadas por o soportadas de forma oportunista por un patógeno que causa o está asociado al cáncer o puede estar en riesgo de desarrollar un cáncer o transmitir a otros un patógeno asociado con el cáncer o que causa el cáncer. En

algunas realizaciones, un sujeto tiene cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, plasmacitoma, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de ovario y/o melanoma. El sujeto puede tener un tumor. El sujeto puede tener un tumor que muestra un aumento de la macropinocitosis con la genómica subyacente de este proceso, incluida la activación de Ras. En otras realizaciones, el sujeto tiene otro cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto se ha sometido a una terapia contra el cáncer.

[169] Como se usa en el presente documento, el término "tratar" una enfermedad en un sujeto o "tratar" a un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad se refiere a administrar al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de uno o más agentes, de modo que al menos un síntoma de la enfermedad disminuye o se evita que empeore. Por tanto, en una realización, "tratar" se refiere, entre otros, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de o disminuir la resistencia a terapias alternativas, o una combinación de las mismas. Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" una enfermedad en un sujeto se refiere a administrar al sujeto un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de uno o más agentes de modo que la aparición de al menos un síntoma de la enfermedad o estado se retrasa o previene.

Bacterias

[170] En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden mEV (tales como smEV) obtenidas a partir de bacterias.

[171] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV (tales como smEV) se modifican para reducir la toxicidad u otros efectos adversos, para potenciar la administración oral de las mEV (tales como smEV) (p. ej., mejorando la resistencia al ácido, mucoadherencia y/o penetración y/o resistencia a ácidos biliares, enzimas digestivas, resistencia frente a péptidos antimicrobianos y/o neutralización de anticuerpos), para seleccionar como diana tipos de células deseadas (por ejemplo células M, células caliciformes, enterocitos, células dendríticas, macrófagos), para potenciar su efecto inmunomodulador y/o terapéutico de las mEV (tales como smEV) (p. ej., o bien solo o bien en combinación con otro agente terapéutico), y/o para potenciar la activación inmune o supresión mediante las mEV (tales como smEV) (p. ej., a través de la producción modificada de polisacáridos, pilosidades, fimbrias, adhesinas). En algunas realizaciones, las bacterias modificadas por ingeniería descritas en el presente documento se modifican para mejorar la fabricación de mEV (tales como smEV) (p. ej., mayor tolerancia al oxígeno, estabilidad, mejor tolerancia a la congelación y descongelación, tiempos de generación más cortos). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las bacterias modificadas por ingeniería descritas incluyen bacterias que albergan uno o más cambios genéticos, tales cambios son una inserción, delección, translocación, o sustitución, o cualquier combinación de los mismos, de uno o más nucleótidos contenidos en el cromosoma bacteriano o plásmido endógeno y/o uno o más plásmidos foráneos, en los que el cambio genético puede dar como resultado la sobreexpresión y/o subexpresión de uno o más genes. Las bacterias genomanipuladas pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitación,

mutagénesis dirigida, mutagénesis por transposón, desactivaciones, activaciones, mutagénesis de reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis química, mutagénesis por luz ultravioleta, transformación (químicamente o por electroporación), transducción de fagos, evolución dirigida, o cualquier combinación de los mismos.

[172] Los ejemplos de especies y/o cepas de bacterias que pueden usarse como fuente de mEV (tales como smEV) descrita en el presente documento se proporcionan en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3 y en otras partes por toda la memoria descriptiva. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana es una cepa bacteriana que tiene un genoma que tiene al menos una identidad de secuencial del 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% con respecto a una cepa listada en la Tabla 1, Tabla 2, y/o Tabla 3. En algunas realizaciones, las mEV son de una bacteria oncotrópica. En algunas realizaciones, las mEV son de una bacteria inmunoestimuladora. En algunas realizaciones, las mEV son de una bacteria inmunosupresora. En algunas realizaciones, las mEV son de una bacteria inmunomoduladora. En determinadas realizaciones, las mEV 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 las mEV a partir de cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1, Tabla 2, y/o Tabla 3 y/o cepas bacterianas que tienen un genoma que tiene al menos 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

secuencia con una cepa enumerada en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3.

[173] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias gramnegativas.

[174] En algunas realizaciones, las bacterias gramnegativas pertenecen a la clase de Negativicutes. Los Negativicutes representan una clase única de microorganismos ya que son los únicos miembros didérmicos del filo Firmicutes. Estos organismos anaeróbicos se pueden encontrar en el entorno y son frecuentes en la cavidad oral y el tubo GI de los seres humanos. Debido que estos organismos tienen una membrana externa, se investigaron los rendimientos de la smEV de esta clase. Se encontró que, por célula, estos microbios producen una cantidad elevada de vesículas (10-150 EV/célula). Las smEV de estos organismos son ampliamente estimuladores y altamente potentes en ensayos *in vitro*. Las investigaciones en sus aplicaciones terapéuticas en varios modelos de oncología e inflamación *in vivo* demostraron su potencial terapéutico. Esta clase de Negativicutes incluye las familias *Veillonellaceae*, *Selenomonadaceae*, *Acidaminococcaceae* y *Sporomusaceae*. La clase de Negativicutes incluye los géneros *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Propionospora* y *Acidaminococcus*. Las especies ilustrativas de Negativicutes incluyen, a mero título enunciativo, *Megasphaera sp.*, *Selenomonas felix*, *Acidaminococcus intestine* y *Propionospora sp.*

[175] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias grampositivas.

[176] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias aerobias.

[177] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias anaerobias.

[178] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias acidófilas.

[179] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias alcalófilas.

[180] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias neutrófilas.

[181] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias de cultivo exigente.

[182] En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias de cultivo no exigente.

[183] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV se liofilizan.

[184] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV se irradian con rayos gamma (p. ej., a 17.5 o 25 kGy).

[185] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV se irradian con UV.

[186] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV se inactivan con calor (p. ej., a 50 °C durante dos horas o a 90 °C durante dos horas).

[187] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV se tratan con ácido.

[188] En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV se rocían con oxígeno (p. ej., a 0.1 vvm durante dos horas).

[189] En algunas realizaciones, las mEV se liofilizan.

[190] En algunas realizaciones, las mEV se irradian con rayos gamma (p. ej., a 17.5 o 25 kGy).

[191] En algunas realizaciones, las mEV se irradian con UV.

[192] En algunas realizaciones, las mEV se inactivan con calor (p. ej., a 50 °C durante dos horas o a 90 °C durante dos horas).

[193] En algunas realizaciones, las mEV se tratan con ácido.

[194] En algunas realizaciones, las mEV se rocían con oxígeno (p. ej., a 0.1 vvm durante dos horas).

[195] La fase de crecimiento puede afectar a la cantidad o las propiedades de las bacterias y/o smEV producidas por bacterias. Por ejemplo, en los métodos de preparación de las smEV proporcionados en el presente documento, pueden aislarse las smEV, por ejemplo, a partir de un cultivo, al inicio de la fase logarítmica del crecimiento, a mitad de la fase de registro, y/o una vez que se ha alcanzado el crecimiento de la fase estacionaria.

Tabla 1: Cepas bacterianas ilustrativas

OTU	Registro de DB Público
<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</i> <i>bacterium</i> <i>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</i> sp. D21	ACGB01000071
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	AY350586
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR_074660
<i>Acidovorax</i> sp. 98_63833	AY258065
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ACYQ01000014
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AM157426
<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
<i>Acinetobacter parvus</i>	AIEB01000124
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	ACVR01000010
<i>Acinetobacter schindleri</i>	NR_025412
<i>Acinetobacter</i> sp. 56A1	GQ178049
<i>Acinetobacter</i> sp. CIP 101934	JQ638573
<i>Acinetobacter</i> sp. CIP 102143	JQ638578
<i>Acinetobacter</i> sp. CIP 53.82	JQ638584
<i>Acinetobacter</i> sp. M16_22	HM366447
<i>Acinetobacter</i> sp. RUH2624	ACQF01000094
<i>Acinetobacter</i> sp. SH024	ADCH01000068

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AY362885
<i>Actinobacillus minor</i>	ACFT01000025
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	NR_074857
<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
<i>Actinobaculum sp. P2P_19 P1</i>	AY207066
<i>Actinomyces cardiffensis</i>	GU470888
<i>Actinomyces europaeus</i>	NR_026363
<i>Actinomyces funkei</i>	HQ906497
<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
<i>Actinomyces israelii</i>	AF479270
<i>Actinomyces massiliensis</i>	AB545934
<i>Actinomyces meyeri</i>	GU561321
<i>Actinomyces naeslundii</i>	X81062
<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
<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

<i>Actinomyces</i> sp. GEJ15	GU561313
<i>Actinomyces</i> sp. HKU31	HQ335393
<i>Actinomyces</i> sp. ICM34	HQ616391
<i>Actinomyces</i> sp. ICM41	HQ616392
<i>Actinomyces</i> sp. ICM47	HQ616395
<i>Actinomyces</i> sp. ICM54	HQ616398
<i>Actinomyces</i> sp. M2231_94_1	AJ234063
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral GU009	AY349361
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral GU067	AY349362
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral IO076	AY349363
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral IO077	AY349364
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral IP073	AY349365
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral IP081	AY349366
<i>Actinomyces</i> sp. clon oral JA063	AY349367
<i>Actinomyces</i> sp. taxón oral 170	AFBL01000010
<i>Actinomyces</i> sp. taxón oral 171	AECW01000034
<i>Actinomyces</i> sp. taxón oral 178	AEUH01000060
<i>Actinomyces</i> sp. taxón oral 180	AEPP01000041
<i>Actinomyces</i> sp. taxón oral 848	ACUY01000072
<i>Actinomyces</i> sp. taxón oral C55	HM099646
<i>Actinomyces</i> sp. TeJ5	GU561315
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	ACFH01000038
<i>Actinomyces viscosus</i>	ACRE01000096
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	AB306661
<i>Aerococcus sanguinicola</i>	AY837833
<i>Aerococcus urinae</i>	CP002512
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	NR_043443
<i>Aerococcus viridans</i>	ADNT01000041
<i>Aeromicrobium marinum</i>	NR_025681
<i>Aeromicrobium</i> sp. JC14	JF824798
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	S39232
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	X71121

<i>Aeromonas hydrophila</i>	NC_008570
<i>Aeromonas jandaei</i>	X60413
<i>Aeromonas salmonicida</i>	NC_009348
<i>Aeromonas trota</i>	X60415
<i>Aeromonas veronii</i>	NR_044845
<i>Afipia genomosp. 4</i>	EU117385
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	CP001733
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	CP001607
<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
<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
<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
<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
<i>Alistipes sp. HGB5</i>	AENZ01000082
<i>Alistipes sp. JC50</i>	JF824804
<i>Alistipes sp. RMA 9912</i>	GQ140629

<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i>	AY137848
<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	NR_043674
<i>Alloscardovia omnicolens</i>	NR_042583
<i>Alloscardovia</i> sp. OB7196	AB425070
<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i>	ACJX02000009
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	NR_026075
<i>Anaerobiospirillum thomasi</i>	AJ420985
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	ABXA01000039
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	ABYO01000217
<i>Anaerococcus octavius</i>	NR_026360
<i>Anaerococcus prevotii</i>	CP001708
<i>Anaerococcus</i> sp. 8404299	HM587318
<i>Anaerococcus</i> sp. 8405254	HM587319
<i>Anaerococcus</i> sp. 9401487	HM587322
<i>Anaerococcus</i> sp. 9403502	HM587325
<i>Anaerococcus</i> sp. gpac104	AM176528
<i>Anaerococcus</i> sp. gpac126	AM176530
<i>Anaerococcus</i> sp. gpac155	AM176536
<i>Anaerococcus</i> sp. gpac199	AM176539
<i>Anaerococcus</i> sp. gpac215	AM176540
<i>Anaerococcus tetradius</i>	ACGC01000107
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	ACXU01000016
<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	ABIL02000005
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	AGCJ01000054
<i>Anaerosporobacter mobilis</i>	NR_042953
<i>Anaerostipes caccae</i>	ABAX03000023
<i>Anaerostipes</i> sp. 3_2_56FAA	ACWB01000002
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	ABGD02000021
<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
<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
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	GU585578
<i>Arcobacter butzleri</i>	AEPT01000071
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	NR_025905
<i>Arthrobacter agilis</i>	NR_026198
<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
<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
<i>Atopobium sp. ICM57</i>	HQ616400
<i>Atopobium vaginae</i>	AEDQ01000024
<i>Aurantimonas coralicida</i>	AY065627
<i>Aureimonas altamirensis</i>	FN658986
<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
<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
<i>Bacillus cereus</i>	ABDJ01000015
<i>Bacillus circulans</i>	AB271747
<i>Bacillus clausii</i>	FN397477
<i>Bacillus coagulans</i>	DQ297928
<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
<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
<i>Bacillus licheniformis</i>	NC_006270
<i>Bacillus megaterium</i>	GU252124
<i>Bacillus nealsonii</i>	NR_044546
<i>Bacillus niabensis</i>	NR_043334
<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
<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
<i>Bacillus sp. 7_16AIA</i>	FN397518

<i>Bacillus</i> sp. 9_3AIA	FN397519
<i>Bacillus</i> sp. AP8	JX101689
<i>Bacillus</i> sp. B27(2008)	EU362173
<i>Bacillus</i> sp. BT1B_CT2	ACWC01000034
<i>Bacillus</i> sp. GB1.1	FJ897765
<i>Bacillus</i> sp. GB9	FJ897766
<i>Bacillus</i> sp. HU19.1	FJ897769
<i>Bacillus</i> sp. HU29	FJ897771
<i>Bacillus</i> sp. HU33.1	FJ897772
<i>Bacillus</i> sp. JC6	JF824800
<i>Bacillus</i> sp. taxón oral F26	HM099642
<i>Bacillus</i> sp. taxón oral F28	HM099650
<i>Bacillus</i> sp. taxón oral F79	HM099654
<i>Bacillus</i> sp. SRC_DSf1	GU797283
<i>Bacillus</i> sp. SRC_DSf10	GU797292
<i>Bacillus</i> sp. SRC_DSf2	GU797284
<i>Bacillus</i> sp. SRC_DSf6	GU797288
<i>Bacillus</i> sp. tc09	HQ844242
<i>Bacillus</i> sp. zh168	FJ851424
<i>Bacillus</i> sphaericus	DQ286318
<i>Bacillus</i> sporothermodurans	NR_026010
<i>Bacillus</i> subtilis	EU627588
<i>Bacillus</i> thermoamylovorans	NR_029151
<i>Bacillus</i> thuringiensis	NC_008600
<i>Bacillus</i> weihenstephanensis	NR_074926
<i>Bacteroidales</i> bacterium ph8	JN837494
<i>Bacteroidales</i> genomosp. P1	AY341819
<i>Bacteroidales</i> genomosp. P2 clon oral MB1_G13	DQ003613
<i>Bacteroidales</i> genomosp. P3 clon oral MB1_G34	DQ003615

<i>Bacteroidales genomosp. P4 clon oral MB2_G17</i>	DQ003617
<i>Bacteroidales genomosp. P5 clon oral MB2_P04</i>	DQ003619
<i>Bacteroidales genomosp. P6 clon oral MB3_C19</i>	DQ003634
<i>Bacteroidales genomosp. P7 clon oral MB3_P19</i>	DQ003623
<i>Bacteroidales genomosp. P8 clon oral MB4_G15</i>	DQ003626
<i>Bacteroides acidifaciens</i>	NR_028607
<i>Bacteroides barnesiae</i>	NR_041446
<i>Bacteroides caccae</i>	EU136686
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	ACCH01000108
<i>Bacteroides clarus</i>	AFBM01000011
<i>Bacteroides coagulans</i>	AB547639
<i>Bacteroides coprocola</i>	ABIY02000050
<i>Bacteroides coprophilus</i>	ACBW01000012
<i>Bacteroides dorei</i>	ABWZ01000093
<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
<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
<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
<i>Bacteroides pyogenes</i>	NR_041280
<i>Bacteroides salanitronis</i>	CP002530
<i>Bacteroides salyersiae</i>	EU136690
<i>Bacteroides</i> sp. 1_1_14	ACRP01000155
<i>Bacteroides</i> sp. 1_1_30	ADCL01000128
<i>Bacteroides</i> sp. 1_1_6	ACIC01000215
<i>Bacteroides</i> sp. 2_1_22	ACPQ01000117
<i>Bacteroides</i> sp. 2_1_56FAA	ACWI01000065
<i>Bacteroides</i> sp. 2_2_4	ABZZ01000168
<i>Bacteroides</i> sp. 20_3	ACRQ01000064
<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_19	ADCJ01000062
<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_23	ACRS01000081
<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_33FAA	ACPS01000085
<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_40A	ACRT01000136
<i>Bacteroides</i> sp. 3_2_5	ACIB01000079
<i>Bacteroides</i> sp. 315_5	FJ848547
<i>Bacteroides</i> sp. 31SF15	AJ583248
<i>Bacteroides</i> sp. 31SF18	AJ583249
<i>Bacteroides</i> sp. 35AE31	AJ583244
<i>Bacteroides</i> sp. 35AE37	AJ583245
<i>Bacteroides</i> sp. 35BE34	AJ583246
<i>Bacteroides</i> sp. 35BE35	AJ583247
<i>Bacteroides</i> sp. 4_1_36	ACTC01000133
<i>Bacteroides</i> sp. 4_3_47FAA	ACDR02000029
<i>Bacteroides</i> sp. 9_1_42FAA	ACAA01000096
<i>Bacteroides</i> sp. AR20	AF139524
<i>Bacteroides</i> sp. AR29	AF139525
<i>Bacteroides</i> sp. B2	EU722733
<i>Bacteroides</i> sp. D1	ACAB02000030
<i>Bacteroides</i> sp. D2	ACGA01000077

<i>Bacteroides sp. D20</i>	ACPT01000052
<i>Bacteroides sp. D22</i>	ADCK01000151
<i>Bacteroides sp. F_4</i>	AB470322
<i>Bacteroides sp. NB_8</i>	AB117565
<i>Bacteroides sp. WH2</i>	AY895180
<i>Bacteroides sp. XB12B</i>	AM230648
<i>Bacteroides sp. XB44A</i>	AM230649
<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
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	ADKP01000087
<i>Bacteroidetes bacterium taxón oral D27</i>	HM099638
<i>Bacteroidetes bacterium taxón oral F31</i>	HM099643
<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
<i>Bartonella grahamii</i>	CP001562
<i>Bartonella henselae</i>	NC_005956
<i>Bartonella quintana</i>	BX897700
<i>Bartonella tamiae</i>	EF672728
<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
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CP001606

<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ABQP01000027
<i>Bifidobacterium breve</i>	CP002743
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ABXY01000019
<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
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	ABXX02000002
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	NR_043442
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	AJ307005
<i>Bifidobacterium</i> sp. HM2	AB425276
<i>Bifidobacterium</i> sp. HMLN12	JF519685
<i>Bifidobacterium</i> sp. M45	HM626176
<i>Bifidobacterium</i> sp. MSX5B	HQ616382
<i>Bifidobacterium</i> sp. TM_7	AB218972
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	DQ340557
<i>Bifidobacterium urinalis</i>	AJ278695
<i>Bilophila wadsworthia</i>	ADCP01000166
<i>Bisgaard Taxon</i>	AY683487
<i>Bisgaard Taxon</i>	AY683489
<i>Bisgaard Taxon</i>	AY683491
<i>Bisgaard Taxon</i>	AY683492
<i>Blastomonas natatoria</i>	NR_040824
<i>Blautia coccoides</i>	AB571656
<i>Blautia glucerasea</i>	AB588023
<i>Blautia glucerasei</i>	AB439724
<i>Blautia hansenii</i>	ABYU02000037
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	ACBZ01000217
<i>Blautia luti</i>	AB691576
<i>Blautia producta</i>	AB600998
<i>Blautia schinkii</i>	NR_026312

<i>Blautia</i> sp. M25	HM626178
<i>Blautia stercoris</i>	HM626177
<i>Blautia wexlerae</i>	EF036467
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	NR_025949
<i>Bordetella holmesii</i>	AB683187
<i>Bordetella parapertussis</i>	NR_025950
<i>Bordetella pertussis</i>	BX640418
<i>Borrelia afzelii</i>	ABCU01000001
<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
<i>Borrelia hispanica</i>	DQ057988
<i>Borrelia persica</i>	HM161645
<i>Borrelia recurrentis</i>	AF107367
<i>Borrelia</i> sp. NE49	AJ224142
<i>Borrelia spielmanii</i>	ABKB01000002
<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
<i>Brachyspira aalborgi</i>	FM178386
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	NR_075069
<i>Brachyspira</i> sp. HIS3	FM178387
<i>Brachyspira</i> sp. HIS4	FM178388
<i>Brachyspira</i> sp. HIS5	FM178389
<i>Brevibacillus agri</i>	NR_040983
<i>Brevibacillus brevis</i>	NR_041524
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	NR_043414
<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
<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
<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
<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
<i>Brucella ceti</i>	ACJD01000006
<i>Brucella melitensis</i>	AE009462
<i>Brucella microti</i>	NR_042549
<i>Brucella ovis</i>	NC_009504
<i>Brucella sp. 83_13</i>	ACBQ01000040
<i>Brucella sp. B01</i>	EU053207
<i>Brucella suis</i>	ACBK01000034
<i>Bryantella formatexigens</i>	ACCL02000018
<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

<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
<i>Burkholderia</i> sp. 383	CP000151
<i>Burkholderia xenovorans</i>	U86373
<i>Burkholderiales bacterium 1_1_47</i>	ADCQ01000066
<i>Butyricicoccus pullicaecorum</i>	HH793440
<i>Butyricimonas virosa</i>	AB443949
<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
<i>Campylobacter concisus</i>	CP000792
<i>Campylobacter curvus</i>	NC_009715
<i>Campylobacter fetus</i>	ACLG01001177
<i>Campylobacter gracilis</i>	ACYG01000026
<i>Campylobacter hominis</i>	NC_009714
<i>Campylobacter jejuni</i>	AL139074
<i>Campylobacter lari</i>	CP000932
<i>Campylobacter rectus</i>	ACFU01000050
<i>Campylobacter showae</i>	ACVQ01000030
<i>Campylobacter</i> sp. FOBRC14	HQ616379
<i>Campylobacter</i> sp. FOBRC15	HQ616380
<i>Campylobacter</i> sp. clon oral BB120	AY005038
<i>Campylobacter sputorum</i>	NR_044839
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	AEPU01000040
<i>Candidatus Arthromitus</i> sp. <i>SFB_mouse_Yit</i>	NR_074460
<i>Candidatus Sulcia muelleri</i>	CP002163

<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	CP002113
<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
<i>Capnocytophaga sp. clon oral AH015</i>	AY005074
<i>Capnocytophaga sp. clon oral ASCH05</i>	AY923149
<i>Capnocytophaga sp. clon oral ID062</i>	AY349368
<i>Capnocytophaga sp. A47ROY</i>	AY005077
<i>Capnocytophaga sp. S3</i>	AY005073
<i>Capnocytophaga sp. taxón oral 338</i>	AEXX01000050
<i>Capnocytophaga sp. Slb</i>	U42009
<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
<i>Catabacter hongkongensis</i>	AB671763
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	AB030224
<i>Catonella genomosp. P1 clon oral MB5_P12</i>	DQ003629
<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
<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
<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
<i>Christensenella minuta</i>	AB490809
<i>Chromobacterium violaceum</i>	NC_005085
<i>Chryseobacterium anthropi</i>	AM982793
<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
<i>Citrobacter gillenbergii</i>	AF025367
<i>Citrobacter koseri</i>	NC_009792
<i>Citrobacter murlinae</i>	AF025369
<i>Citrobacter rodentium</i>	NR_074903
<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
<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
<i>Clostridiales bacterium 9403326</i>	HM587324
<i>Clostridiales bacterium clon oral P4PA_66 P1</i>	AY207065

<i>Clostridiales bacterium taxón oral 093</i>	GQ422712
<i>Clostridiales bacterium taxón oral F32</i>	HM099644
<i>Clostridiales bacterium ph2</i>	JN837487
<i>Clostridiales bacterium SY8519</i>	AB477431
<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
<i>Clostridium aerotolerans</i>	X76163
<i>Clostridium aldenense</i>	NR_043680
<i>Clostridium aldrichii</i>	NR_026099
<i>Clostridium algidicarnis</i>	NR_041746
<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
<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
<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
<i>Clostridium celatum</i>	X77844
<i>Clostridium celerecrescens</i>	JQ246092

<i>Clostridium cellulosi</i>	NR_044624
<i>Clostridium chauvoei</i>	EU106372
<i>Clostridium citroniae</i>	ADLJ01000059
<i>Clostridium clariflavum</i>	NR_041235
<i>Clostridium clostridiiformes</i>	M59089
<i>Clostridium clostridioforme</i>	NR_044715
<i>Clostridium coccoides</i>	EF025906
<i>Clostridium cochlearium</i>	NR_044717
<i>Clostridium cocleatum</i>	NR_026495
<i>Clostridium colicanis</i>	FJ957863
<i>Clostridium colinum</i>	NR_026151
<i>Clostridium difficile</i>	NC_013315
<i>Clostridium disporicum</i>	NR_026491
<i>Clostridium estertheticum</i>	NR_042153
<i>Clostridium fallax</i>	NR_044714
<i>Clostridium favosporum</i>	X76749
<i>Clostridium felsineum</i>	AF270502
<i>Clostridium frigidicarnis</i>	NR_024919
<i>Clostridium gasigenes</i>	NR_024945
<i>Clostridium ghonii</i>	AB542933
<i>Clostridium glycolicum</i>	FJ384385
<i>Clostridium glycyrrhizinilyticum</i>	AB233029
<i>Clostridium haemolyticum</i>	NR_024749
<i>Clostridium hathewayi</i>	AY552788
<i>Clostridium hiranonis</i>	AB023970
<i>Clostridium histolyticum</i>	HF558362
<i>Clostridium hylemonae</i>	AB023973
<i>Clostridium indolis</i>	AF028351
<i>Clostridium innocuum</i>	M23732
<i>Clostridium irregulare</i>	NR_029249
<i>Clostridium isatidis</i>	NR_026347
<i>Clostridium kluyveri</i>	NR_074165

<i>Clostridium lactatifermentans</i>	NR_025651
<i>Clostridium lavalense</i>	EF564277
<i>Clostridium leptum</i>	AJ305238
<i>Clostridium limosum</i>	FR870444
<i>Clostridium magnum</i>	X77835
<i>Clostridium malenominatum</i>	FR749893
<i>Clostridium mayombeii</i>	FR733682
<i>Clostridium methylpentosum</i>	ACEC01000059
<i>Clostridium nexile</i>	X73443
<i>Clostridium novyi</i>	NR_074343
<i>Clostridium orbiscindens</i>	Y18187
<i>Clostridium oroticum</i>	FR749922
<i>Clostridium paraputrificum</i>	AB536771
<i>Clostridium perfringens</i>	ABDW01000023
<i>Clostridium phytofermentans</i>	NR_074652
<i>Clostridium piliforme</i>	D14639
<i>Clostridium putrefaciens</i>	NR_024995
<i>Clostridium quinii</i>	NR_026149
<i>Clostridium ramosum</i>	M23731
<i>Clostridium rectum</i>	NR_029271
<i>Clostridium saccharogumia</i>	DQ100445
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	CP002109
<i>Clostridium sardiniense</i>	NR_041006
<i>Clostridium sartagoforme</i>	NR_026490
<i>Clostridium scindens</i>	AF262238
<i>Clostridium septicum</i>	NR_026020
<i>Clostridium sordellii</i>	AB448946
<i>Clostridium</i> sp. 7_2_43FAA	ACDK01000101
<i>Clostridium</i> sp. D5	ADBG01000142
<i>Clostridium</i> sp. HGF2	AENW01000022
<i>Clostridium</i> sp. HPB_46	AY862516
<i>Clostridium</i> sp. JC122	CAEV01000127

<i>Clostridium</i> sp. L2_50	AAYW02000018
<i>Clostridium</i> sp. LMG 16094	X95274
<i>Clostridium</i> sp. M62_1	ACFX02000046
<i>Clostridium</i> sp. MLG055	AF304435
<i>Clostridium</i> sp. MT4 E	FJ159523
<i>Clostridium</i> sp. NMBHI_1	JN093130
<i>Clostridium</i> sp. NML 04A032	EU815224
<i>Clostridium</i> sp. SS2_1	ABGC03000041
<i>Clostridium</i> sp. SY8519	AP012212
<i>Clostridium</i> sp. TM_40	AB249652
<i>Clostridium</i> sp. YIT 12069	AB491207
<i>Clostridium</i> sp. YIT 12070	AB491208
<i>Clostridium</i> sphenoides	X73449
<i>Clostridium</i> spiroforme	X73441
<i>Clostridium</i> sporogenes	ABKW02000003
<i>Clostridium</i> sporosphaeroides	NR_044835
<i>Clostridium</i> stercorearium	NR_025100
<i>Clostridium</i> sticklandii	L04167
<i>Clostridium</i> straminisolvens	NR_024829
<i>Clostridium</i> subterminale	NR_041795
<i>Clostridium</i> sulfidigenes	NR_044161
<i>Clostridium</i> symbiosum	ADLQ01000114
<i>Clostridium</i> tertium	Y18174
<i>Clostridium</i> tetani	NC_004557
<i>Clostridium</i> thermocellum	NR_074629
<i>Clostridium</i> tyrobutyricum	NR_044718
<i>Clostridium</i> viride	NR_026204
<i>Clostridium</i> xylanolyticum	NR_037068
<i>Collinsella</i> aerofaciens	AAVN02000007
<i>Collinsella</i> intestinalis	ABXH02000037
<i>Collinsella</i> stercoreis	ABXJ01000150
<i>Collinsella</i> tanakaei	AB490807

<i>Comamonadaceae</i> <i>bacterium</i> NML000135	JN585335
<i>Comamonadaceae</i> <i>bacterium</i> NML790751	JN585331
<i>Comamonadaceae</i> <i>bacterium</i> NML910035	JN585332
<i>Comamonadaceae</i> <i>bacterium</i> NML910036	JN585333
<i>Comamonadaceae</i> <i>bacterium</i> <i>taxón</i> <i>oral F47</i>	HM099651
<i>Comamonas</i> <i>sp.</i> <i>NSP5</i>	AB076850
<i>Conchiformibius kuhniae</i>	NR_041821
<i>Coprobacillus cateniformis</i>	AB030218
<i>Coprobacillus</i> <i>sp.</i> <i>29_1</i>	ADKX01000057
<i>Coprobacillus</i> <i>sp.</i> <i>D7</i>	ACDT01000199
<i>Coprococcus catus</i>	EU266552
<i>Coprococcus comes</i>	ABVR01000038
<i>Coprococcus eutactus</i>	EF031543
<i>Coprococcus</i> <i>sp.</i> <i>ART55_1</i>	AY350746
<i>Coriobacteriaceae</i> <i>bacterium</i> <i>BV3Ac1</i>	JN809768
<i>Coriobacteriaceae</i> <i>bacterium</i> <i>JC110</i>	CAEM01000062
<i>Coriobacteriaceae</i> <i>bacterium</i> <i>phI</i>	JN837493
<i>Corynebacterium accolens</i>	ACGD01000048
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ADNS01000011
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	ABZU01000033
<i>Corynebacterium appendicis</i>	NR_028951
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	EF463055
<i>Corynebacterium atypicum</i>	NR_025540
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	ACLH01000041
<i>Corynebacterium bovis</i>	AF537590
<i>Corynebacterium canis</i>	GQ871934

<i>Corynebacterium casei</i>	NR_025101
<i>Corynebacterium confusum</i>	Y15886
<i>Corynebacterium coyleae</i>	X96497
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	NC_002935
<i>Corynebacterium durum</i>	Z97069
<i>Corynebacterium efficiens</i>	ACLI01000121
<i>Corynebacterium falsenii</i>	Y13024
<i>Corynebacterium flavescens</i>	NR_037040
<i>Corynebacterium genitalium</i>	ACLJ01000031
<i>Corynebacterium glaucum</i>	NR_028971
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	ABYP01000081
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	BA000036
<i>Corynebacterium hansenii</i>	AM946639
<i>Corynebacterium imitans</i>	AF537597
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	ACYW01000001
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	NR_026380
<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	ACHJ01000075
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	AB359393
<i>Corynebacterium mastitidis</i>	AB359395
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	ACSH02000003
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	X82064
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	NR_026396
<i>Corynebacterium propinquum</i>	NR_037038
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	X84258
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	ABYQ01000237
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	NR_037070
<i>Corynebacterium pyruviciproducens</i>	FJ185225
<i>Corynebacterium renale</i>	NR_037069
<i>Corynebacterium resistens</i>	ADGN01000058
<i>Corynebacterium riegelii</i>	EU848548

<i>Corynebacterium simulans</i>	AF537604
<i>Corynebacterium singulare</i>	NR_026394
<i>Corynebacterium</i> sp. 1 ex sheep	Y13427
<i>Corynebacterium</i> sp. L_2012475	HE575405
<i>Corynebacterium</i> sp. NML 93_0481	GU238409
<i>Corynebacterium</i> sp. NML 97_0186	GU238411
<i>Corynebacterium</i> sp. NML 99_0018	GU238413
<i>Corynebacterium striatum</i>	ACGE01000001
<i>Corynebacterium sundsvallense</i>	Y09655
<i>Corynebacterium tuberculoostearicum</i>	ACVP01000009
<i>Corynebacterium tuscaniae</i>	AY677186
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	NR_074467
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	X81913
<i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	AM397636
<i>Corynebacterium variabile</i>	NR_025314
<i>Corynebacterium xerosis</i>	FN179330
<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
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	GU230889
<i>Cytophaga xylanolytica</i>	FR733683
<i>Deferribacteres</i> sp. clon oral JV001	AY349370
<i>Deferribacteres</i> sp. clon oral JV006	AY349371
<i>Deferribacteres</i> sp. clon oral JV023	AY349372
<i>Deinococcus radiodurans</i>	AE000513
<i>Deinococcus</i> sp. R_43890	FR682752

<i>Delftia acidovorans</i>	CP000884
<i>Dermabacter hominis</i>	FJ263375
<i>Dermacoccus</i> sp. <i>Ellin185</i>	AEIQ01000090
<i>Desmospora activa</i>	AM940019
<i>Desmospora</i> sp. <i>8437</i>	AFHT01000143
<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	AJ276701
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	NR_074996
<i>Desulfobulbus</i> sp. <i>clon oral CH031</i>	AY005036
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	NR_044832
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DQ092636
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	U42221
<i>Desulfovibrio piger</i>	AF192152
<i>Desulfovibrio</i> sp. <i>3_1_syn3</i>	ADDR01000239
<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
<i>Dialister propionicifaciens</i>	NR_043231
<i>Dialister</i> sp. <i>taxón oral 502</i>	GQ422739
<i>Dialister succinatiphilus</i>	AB370249
<i>Dietzia natronolimnaea</i>	GQ870426
<i>Dietzia</i> sp. <i>BBDP51</i>	DQ337512
<i>Dietzia</i> sp. <i>CA149</i>	GQ870422
<i>Dietzia timorensis</i>	GQ870424
<i>Dorea formicigenerans</i>	AAXA02000006
<i>Dorea longicatena</i>	AJ132842
<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

<i>Eggerthella</i> sp. 1_3_56FAA	ACWN01000099
<i>Eggerthella</i> sp. HGA1	AEXR01000021
<i>Eggerthella</i> sp. YY7918	AP012211
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	AAIF01000035
<i>Eikenella corrodens</i>	ACEA01000028
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	ACYI01000081
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AJ251468
<i>Enterobacter asburiae</i>	NR_024640
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Z96078
<i>Enterobacter cloacae</i>	FP929040
<i>Enterobacter cowanii</i>	NR_025566
<i>Enterobacter hormaechei</i>	AFHR01000079
<i>Enterobacter</i> sp. 247BMC	HQ122932
<i>Enterobacter</i> sp. 638	NR_074777
<i>Enterobacter</i> sp. JC163	JN657217
<i>Enterobacter</i> sp. SCSS	HM007811
<i>Enterobacter</i> sp. TSE38	HM156134
<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium 9_2_54FAA	ADCU01000033
<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium CF01Ent_1	AJ489826
<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium Smarlab 3302238	AY538694
<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
<i>Enterococcus faecium</i>	AM157434
<i>Enterococcus gallinarum</i>	AB269767
<i>Enterococcus gilvus</i>	AY033814
<i>Enterococcus hawaiiensis</i>	AY321377

<i>Enterococcus hirae</i>	AF061011
<i>Enterococcus italicus</i>	AEPV01000109
<i>Enterococcus mundtii</i>	NR_024906
<i>Enterococcus raffinosus</i>	FN600541
<i>Enterococcus</i> sp. BV2CASA2	JN809766
<i>Enterococcus</i> sp. CCRI_16620	GU457263
<i>Enterococcus</i> sp. F95	FJ463817
<i>Enterococcus</i> sp. RfL6	AJ133478
<i>Enterococcus thailandicus</i>	AY321376
<i>Eremococcus coleocola</i>	AENN01000008
<i>Erysipelothrix inopinata</i>	NR_025594
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	ACLK01000021
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	NR_040871
<i>Erysipelotrichaceae</i> bacterium 3_1_53	ACTJ01000113
<i>Erysipelotrichaceae</i> bacterium 5_2_54FAA	ACZW01000054
<i>Escherichia albertii</i>	ABKX01000012
<i>Escherichia coli</i>	NC_008563
<i>Escherichia fergusonii</i>	CU928158
<i>Escherichia hermannii</i>	HQ407266
<i>Escherichia</i> sp. 1_1_43	ACID01000033
<i>Escherichia</i> sp. 4_1_40B	ACDM02000056
<i>Escherichia</i> sp. B4	EU722735
<i>Escherichia vulneris</i>	NR_041927
<i>Ethanoligenens harbinense</i>	AY675965
<i>Eubacteriaceae</i> bacterium P4P_50 P4	AY207060
<i>Eubacterium barkeri</i>	NR_044661
<i>Eubacterium biforme</i>	ABYT01000002
<i>Eubacterium brachy</i>	U13038
<i>Eubacterium budayi</i>	NR_024682

<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
<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
<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
<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
<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
<i>Eubacterium sp. OBRC9</i>	HQ616354
<i>Eubacterium sp. clon oral GI038</i>	AY349374
<i>Eubacterium sp. clon oral IR009</i>	AY349376
<i>Eubacterium sp. clon oral JH012</i>	AY349373
<i>Eubacterium sp. clon oral JI012</i>	AY349379
<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
<i>Eubacterium tortuosum</i>	NR_044648
<i>Eubacterium ventriosum</i>	L34421
<i>Eubacterium xylanophilum</i>	L34628
<i>Eubacterium yurii</i>	AEES01000073
<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
<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
<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
<i>Fulvimonas sp. NML 060897</i>	EF589680
<i>Fusobacterium canifelinum</i>	AY162222
<i>Fusobacterium genomosp. C1</i>	AY278616
<i>Fusobacterium genomosp. C2</i>	AY278617
<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
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ADVK01000034

<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ACJY01000002
<i>Fusobacterium russii</i>	NR_044687
<i>Fusobacterium</i> sp. 1_1_41FAA	ADGG01000053
<i>Fusobacterium</i> sp. 11_3_2	ACUO01000052
<i>Fusobacterium</i> sp. 12_1B	AGWJ01000070
<i>Fusobacterium</i> sp. 2_1_31	ACDC02000018
<i>Fusobacterium</i> sp. 3_1_27	ADGF01000045
<i>Fusobacterium</i> sp. 3_1_33	ACQE01000178
<i>Fusobacterium</i> sp. 3_1_36A2	ACPU01000044
<i>Fusobacterium</i> sp. 3_1_5R	ACDD01000078
<i>Fusobacterium</i> sp. AC18	HQ616357
<i>Fusobacterium</i> sp. ACB2	HQ616358
<i>Fusobacterium</i> sp. AS2	HQ616361
<i>Fusobacterium</i> sp. CM1	HQ616371
<i>Fusobacterium</i> sp. CM21	HQ616375
<i>Fusobacterium</i> sp. CM22	HQ616376
<i>Fusobacterium</i> sp. D12	ACDG02000036
<i>Fusobacterium</i> sp. clon oral ASCF06	AY923141
<i>Fusobacterium</i> sp. clon oral ASCF11	AY953256
<i>Fusobacterium ulcerans</i>	ACDH01000090
<i>Fusobacterium varium</i>	ACIE01000009
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CP001849
<i>Gemella haemolysans</i>	ACDZ02000012
<i>Gemella morbillorum</i>	NR_025904
<i>Gemella morbillorum</i>	ACRX01000010
<i>Gemella sanguinis</i>	ACRY01000057
<i>Gemella</i> sp. clon oral ASCE02	AY923133
<i>Gemella</i> sp. clon oral ASCF04	AY923139
<i>Gemella</i> sp. clon oral ASCF12	AY923143
<i>Gemella</i> sp. WAL 1945J	EU427463
<i>Gemmiger formicilis</i>	GU562446
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	NR_074989

<i>Geobacillus</i> sp. E263	DQ647387
<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	CP001638
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	NR_040794
<i>Geobacillus</i> <i>thermocatenulatus</i>	NR_043020
<i>Geobacillus</i> <i>thermodenitrificans</i>	NR_074976
<i>Geobacillus</i> <i>thermoglucoasidarius</i>	NR_043022
<i>Geobacillus</i> <i>thermoleovorans</i>	NR_074931
<i>Geobacter</i> <i>bemidjiensis</i>	CP001124
<i>Gloeobacter</i> <i>violaceus</i>	NR_074282
<i>Gluconacetobacter</i> <i>azotocaptans</i>	NR_028767
<i>Gluconacetobacter</i> <i>diazotrophicus</i>	NR_074292
<i>Gluconacetobacter</i> <i>entanii</i>	NR_028909
<i>Gluconacetobacter</i> <i>europaeus</i>	NR_026513
<i>Gluconacetobacter</i> <i>hansenii</i>	NR_026133
<i>Gluconacetobacter</i> <i>johannae</i>	NR_024959
<i>Gluconacetobacter</i> <i>oboediens</i>	NR_041295
<i>Gluconacetobacter</i> <i>xylinus</i>	NR_074338
<i>Gordonia</i> <i>bronchialis</i>	NR_027594
<i>Gordonia</i> <i>polyisoprenivorans</i>	DQ385609
<i>Gordonia</i> sp. KTR9	DQ068383
<i>Gordonia</i> <i>sputi</i>	FJ536304
<i>Gordonia</i> <i>terrae</i>	GQ848239
<i>Gordonibacter</i> <i>pamelaee</i>	AM886059
<i>Gordonibacter</i> <i>pamelaee</i>	FP929047
<i>Gracilibacter</i> <i>thermotolerans</i>	NR_043559
<i>Gramella</i> <i>forsetii</i>	NR_074707
<i>Granulicatella</i> <i>adiacens</i>	ACKZ01000002
<i>Granulicatella</i> <i>elegans</i>	AB252689
<i>Granulicatella</i> <i>paradiacens</i>	AY879298
<i>Granulicatella</i> sp. M658_99_3	AJ271861
<i>Granulicatella</i> sp. clon oral ASC02	AY923126

<i>Granulicatella</i> sp. clon oral ASCA05	DQ341469
<i>Granulicatella</i> sp. clon oral ASCB09	AY953251
<i>Granulicatella</i> sp. clon oral ASCG05	AY923146
<i>Grimontia hollisae</i>	ADAQ01000013
<i>Haematobacter</i> sp. BC14248	GU396991
<i>Haemophilus aegyptius</i>	AFBC01000053
<i>Haemophilus ducreyi</i>	AE017143
<i>Haemophilus genomosp.</i> P2 clon oral MB3_C24	DQ003621
<i>Haemophilus genomosp.</i> P3 clon oral MB3_C38	DQ003635
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	JN175335
<i>Haemophilus influenzae</i>	AADP01000001
<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
<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
<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
<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
<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
<i>Helicobacter winthamensis</i>	ACDO01000013
<i>Heliobacterium modesticaldum</i>	NR_074517
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	CP002039
<i>Herbaspirillum</i> sp. JC206	JN657219
<i>Histophilus somni</i>	AF549387
<i>Holdemania filiformis</i>	Y11466
<i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i>	NR_044425
<i>Hyperthermus butylicus</i>	CP000493
<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	AY468372
<i>Hyphomonas neptunium</i>	NR_074092
<i>Ignatzschineria indica</i>	HQ823562
<i>Ignatzschineria</i> sp. NML 95_0260	HQ823559
<i>Ignicoccus islandicus</i>	X99562
<i>Inquilinus limosus</i>	NR_029046
<i>Janibacter limosus</i>	NR_026362
<i>Janibacter melonis</i>	EF063716
<i>Janthinobacterium</i> sp. SY12	EF455530
<i>Johnsonella ignava</i>	X87152
<i>Jonquetella anthropi</i>	ACOO02000004
<i>Kerstersia gyiorum</i>	NR_025669
<i>Kingella denitrificans</i>	AEWV01000047
<i>Kingella genomosp.</i> P1 oral cone MB2_C20	DQ003616

<i>Kingella kingae</i>	AFHS01000073
<i>Kingella oralis</i>	ACJW02000005
<i>Kingella sp. clon oral ID059</i>	AY349381
<i>Klebsiella oxytoca</i>	AY292871
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP000647
<i>Klebsiella sp. AS10</i>	HQ616362
<i>Klebsiella sp. Co9935</i>	DQ068764
<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
<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
<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
<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
<i>Lachnospira multipara</i>	FR733699
<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	L14675
<i>Lachnospiraceae bacterium 1_1_57FAA</i>	ACTM01000065

<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 1_4_56FAA	ACTN01000028
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 2_1_46FAA	ADLB01000035
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 2_1_58FAA	ACTO01000052
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 3_1_57FAA_CT1	ACTP01000124
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 4_1_37FAA	ADCR01000030
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 5_1_57FAA	ACTR01000020
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 5_1_63FAA	ACTS01000081
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 6_1_63FAA	ACTV01000014
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 8_1_57FAA	ACWQ01000079
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> 9_1_43BFAA	ACTX01000023
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> A4	DQ789118
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> DJF VP30	EU728771
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> ICM62	HQ616401
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> MSX33	HQ616384
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> <i>taxón</i> oral 107	ADDS01000069
<i>Lachnospiraceae</i> <i>bacterium</i> <i>taxón</i> oral F15	HM099641
<i>Lachnospiraceae</i> <i>genomosp.</i> C1	AY278618
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	NR_024718
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CP000033

<i>Lactobacillus alimentarius</i>	NR_044701
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	ADNY01000006
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	CP002338
<i>Lactobacillus antri</i>	ACLL01000037
<i>Lactobacillus brevis</i>	EU194349
<i>Lactobacillus buchneri</i>	ACGH01000101
<i>Lactobacillus casei</i>	CP000423
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	M23729
<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
<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
<i>Lactobacillus genomosp. C1</i>	AY278619
<i>Lactobacillus genomosp. C2</i>	AY278620
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ACLM01000202
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	ACGP01000200
<i>Lactobacillus hominis</i>	FR681902
<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
<i>Lactobacillus kefiri</i>	NR_042230
<i>Lactobacillus kimchii</i>	NR_025045
<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
<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
<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
<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
<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
<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0702</i>	EU600906
<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0703</i>	EU600907
<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0704</i>	EU600908
<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0705</i>	EU600909
<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0707</i>	EU600911
<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</i> sp. KLDS 1.0716	EU600921
<i>Lactobacillus</i> sp. KLDS 1.0718	EU600922
<i>Lactobacillus</i> sp. KLDS 1.0719	EU600923
<i>Lactobacillus</i> sp. clon oral HT002	AY349382
<i>Lactobacillus</i> sp. clon oral HT070	AY349383
<i>Lactobacillus</i> sp. taxón oral 052	GQ422710
<i>Lactobacillus tucseti</i>	NR_042194
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	ACGU01000081
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	ACGV01000168
<i>Lactobacillus vini</i>	NR_042196
<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
<i>Lactonifactor longoviformis</i>	DQ100449
<i>Laribacter hongkongensis</i>	CP001154
<i>Lautropia mirabilis</i>	AEQP01000026
<i>Lautropia</i> sp. clon oral AP009	AY005030
<i>Legionella hackeliae</i>	M36028
<i>Legionella longbeachae</i>	M36029
<i>Legionella pneumophila</i>	NC_002942
<i>Legionella</i> sp. D3923	JN380999
<i>Legionella</i> sp. D4088	JN381012
<i>Legionella</i> sp. H63	JF831047
<i>Legionella</i> sp. NML 93L054	GU062706
<i>Legionella steelei</i>	HQ398202
<i>Leminorella grimontii</i>	AJ233421
<i>Leminorella richardii</i>	HF558368
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NC_008508
<i>Leptospira broomii</i>	NR_043200
<i>Leptospira interrogans</i>	NC_005823

<i>Leptospira licherasiae</i>	EF612284
<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
<i>Leptotrichia</i> sp. <i>neutropenicPatient</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
<i>Leptotrichia sp. clon oral IK040</i>	AY349387
<i>Leptotrichia sp. clon oral P2PB_51</i> <i>P1</i>	AY207053
<i>Leptotrichia sp. taxón oral 223</i>	GU408547
<i>Leuconostoc carnosum</i>	NR_040811
<i>Leuconostoc citreum</i>	AM157444
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	FN822744
<i>Leuconostoc inhae</i>	NR_025204
<i>Leuconostoc kimchii</i>	NR_075014
<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
<i>Listeria ivanovii</i>	X56151
<i>Listeria monocytogenes</i>	CP002003
<i>Listeria welshimeri</i>	AM263198
<i>Luteococcus sanguinis</i>	NR_025507
<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
<i>Marvinbryantia formatexigens</i>	AJ505973
<i>Massilia</i> sp. CCUG 43427A	FR773700
<i>Megamonas funiformis</i>	AB300988
<i>Megamonas hypermegale</i>	AJ420107
<i>Megasphaera elsdenii</i>	AY038996
<i>Megasphaera genomsp. C1</i>	AY278622
<i>Megasphaera genomsp. type_1</i>	ADGP01000010
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	AECS01000020
<i>Megasphaera</i> sp. BLPYG_07	HM990964
<i>Megasphaera</i> sp. UPII 199_6	AFIJ01000040
<i>Metallosphaera sedula</i>	D26491
<i>Methanobacterium formicicum</i>	NR_025028
<i>Methanobrevibacter acididurans</i>	NR_028779
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	NR_042783
<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
<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
<i>Methanobrevibacter woesei</i>	NR_044788
<i>Methanobrevibacter wolinii</i>	NR_044790
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	AY196684
<i>Methylobacterium extorquens</i>	NC_010172
<i>Methylobacterium podarium</i>	AY468363
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	GU294320

<i>Methylobacterium sp. lsub</i>	AY468371
<i>Methylobacterium sp. MM4</i>	AY468370
<i>Methylocella silvestris</i>	NR_074237
<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
<i>Microbacterium oleivorans</i>	EU714381
<i>Microbacterium oxydans</i>	EU714348
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AJ491806
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	EU714359
<i>Microbacterium schleiferi</i>	NR_044936
<i>Microbacterium sp. 768</i>	EU714378
<i>Microbacterium sp. C24KA</i>	AF287752
<i>Microbacterium testaceum</i>	EU714365
<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
<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
<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
<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
<i>Moraxella osloensis</i>	JN175341
<i>Moraxella sp. 16285</i>	JF682466
<i>Moraxella sp. GM2</i>	JF837191
<i>Morganella morganii</i>	AJ301681
<i>Morganella sp. JB_T16</i>	AJ781005
<i>Morococcus cerebrosus</i>	JN175352
<i>Moryella indoligenes</i>	AF527773
<i>Mycobacterium abscessus</i>	AGQU01000002
<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
<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
<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
<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

<i>Mycobacterium seoulense</i>	DQ536403
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CP000480
<i>Mycobacterium sp. 1761</i>	EU703150
<i>Mycobacterium sp. 1776</i>	EU703152
<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
<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
<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
<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
<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
<i>Mycoplasma hominis</i>	AF443616
<i>Mycoplasma orale</i>	AY796060
<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	NR_025989
<i>Mycoplasma penetrans</i>	NC_004432

<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
<i>Myroides odoratimimus</i>	NR_042354
<i>Myroides sp. MY15</i>	GU253339
<i>Neisseria bacilliformis</i>	AFAY01000058
<i>Neisseria cinerea</i>	ACDY01000037
<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
<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
<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
<i>Neisseria sp. B33KA</i>	AY005028
<i>Neisseria sp. taxón oral 014</i>	ADEA01000039
<i>Neisseria sp. SMC_A9199</i>	FJ763637
<i>Neisseria sp. TM10_1</i>	DQ279352
<i>Neisseria subflava</i>	ACEO01000067
<i>Neorickettsia risticii</i>	CP001431
<i>Neorickettsia sennetsu</i>	NC_007798
<i>Nocardia brasiliensis</i>	AIHV01000038

<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
<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
<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>	DQ365921
<i>Odoribacter laneus</i>	AB490805
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	CP002544
<i>Okadaella gastrococcus</i>	HQ699465
<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
<i>Olsenella sp. taxón oral 809</i>	ACVE01000002
<i>Olsenella uli</i>	CP002106
<i>Opitutus terrae</i>	NR_074978
<i>Oribacterium sinus</i>	ACKX01000142
<i>Oribacterium sp. ACB1</i>	HM120210
<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
<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
<i>Ornithinibacillus</i> sp. 7_10AIA	FN397526
<i>Oscillibacter</i> sp. G2	HM626173
<i>Oscillibacter valericigenes</i>	NR_074793
<i>Oscillospira guilliermondii</i>	AB040495
<i>Oxalobacter formigenes</i>	ACDQ01000020
<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
<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
<i>Paenibacillus popilliae</i>	NR_040888
<i>Paenibacillus</i> sp. CIP 101062	HM212646
<i>Paenibacillus</i> sp. HGF5	AEXS01000095
<i>Paenibacillus</i> sp. HGF7	AFDH01000147
<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
<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
<i>Pantoea septica</i>	EU216734
<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	NR_025025

<i>Parabacteroides distasonis</i>	CP000140
<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	AY974070
<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
<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
<i>Parascardovia denticolens</i>	ADEB01000020
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	AFBP01000029
<i>Parasutterella secunda</i>	AB491209
<i>Parvimonas micra</i>	AB729072
<i>Parvimonas</i> sp. taxón oral 110	AFII01000002
<i>Pasteurella bettyae</i>	L06088
<i>Pasteurella dagmatis</i>	ACZR01000003
<i>Pasteurella multocida</i>	NC_002663
<i>Pediococcus acidilactici</i>	ACXB01000026
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	NR_075052
<i>Peptococcus niger</i>	NR_029221
<i>Peptococcus</i> sp. clon oral JM048	AY349389
<i>Peptococcus</i> sp. taxón oral 167	GQ422727
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	D14145
<i>Peptoniphilus duerdenii</i>	EU526290
<i>Peptoniphilus harei</i>	NR_026358
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	AY153431
<i>Peptoniphilus ivorii</i>	Y07840
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	ADDO01000050
<i>Peptoniphilus</i> sp. gpac007	AM176517

<i>Peptoniphilus</i> sp. gpac018A	AM176519
<i>Peptoniphilus</i> sp. gpac077	AM176527
<i>Peptoniphilus</i> sp. gpac148	AM176535
<i>Peptoniphilus</i> sp. JC140	JF824803
<i>Peptoniphilus</i> sp. taxón oral 386	ADCS01000031
<i>Peptoniphilus</i> sp. taxón oral 836	AEAA01000090
<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium ph1	JN837495
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	AY326462
<i>Peptostreptococcus micros</i>	AM176538
<i>Peptostreptococcus</i> sp. 9succ1	X90471
<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 stomatis</i>	ADGQ01000048
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	NR_026111
<i>Phascolarctobacterium</i> sp. YIT 12068	AB490812
<i>Phascolarctobacterium</i> <i>succinatutens</i>	AB490811
<i>Phenylobacterium zucineum</i>	AY628697
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	Z76752
<i>Pigmentiphaga daeguensis</i>	JN585327
<i>Planomicrobium koreense</i>	NR_025011
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	X60418
<i>Porphyromonadaceae</i> bacterium NML 060648	EF184292
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	AENO01000048
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	ACNN01000021
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AE015924

<i>Porphyromonas levii</i>	NR_025907
<i>Porphyromonas macacae</i>	NR_025908
<i>Porphyromonas somerae</i>	AB547667
<i>Porphyromonas sp. clon oral BB134</i>	AY005068
<i>Porphyromonas sp. clon oral F016</i>	AY005069
<i>Porphyromonas sp. clon oral P2PB_52 P1</i>	AY207054
<i>Porphyromonas sp. clon oral 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
<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
<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
<i>Prevotella genomosp. C1</i>	AY278624
<i>Prevotella genomosp. C2</i>	AY278625
<i>Prevotella genomosp. P7 clon oral MB2_P31</i>	DQ003620
<i>Prevotella genomosp. P8 clon oral MB3_P13</i>	DQ003622
<i>Prevotella genomosp. P9 clon oral MB7_G16</i>	DQ003633
<i>Prevotella heparinolytica</i>	GQ422742

<i>Prevotella histicola</i>	JN867315
<i>Prevotella intermedia</i>	AF414829
<i>Prevotella loescheii</i>	JN867231
<i>Prevotella maculosa</i>	AGEK01000035
<i>Prevotella marshii</i>	AEEI01000070
<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
<i>Prevotella nigrescens</i>	AFPX01000069
<i>Prevotella oralis</i>	AEPE01000021
<i>Prevotella oris</i>	ADDV01000091
<i>Prevotella oulorum</i>	L16472
<i>Prevotella pallens</i>	AFPY01000135
<i>Prevotella ruminicola</i>	CP002006
<i>Prevotella salivae</i>	AB108826
<i>Prevotella</i> sp. BI_42	AJ581354
<i>Prevotella</i> sp. CM38	HQ610181
<i>Prevotella</i> sp. ICM1	HQ616385
<i>Prevotella</i> sp. ICM55	HQ616399
<i>Prevotella</i> sp. JCM 6330	AB547699
<i>Prevotella</i> sp. clon oral AA020	AY005057
<i>Prevotella</i> sp. clon oral ASCG10	AY923148
<i>Prevotella</i> sp. clon oral ASCG12	DQ272511
<i>Prevotella</i> sp. clon oral AU069	AY005062
<i>Prevotella</i> sp. clon oral CY006	AY005063
<i>Prevotella</i> sp. clon oral DA058	AY005065
<i>Prevotella</i> sp. clon oral FL019	AY349392
<i>Prevotella</i> sp. clon oral FU048	AY349393
<i>Prevotella</i> sp. clon oral FW035	AY349394
<i>Prevotella</i> sp. clon oral GI030	AY349395

<i>Prevotella</i> sp. clon oral GI032	AY349396
<i>Prevotella</i> sp. clon oral GI059	AY349397
<i>Prevotella</i> sp. clon oral GU027	AY349398
<i>Prevotella</i> sp. clon oral HF050	AY349399
<i>Prevotella</i> sp. clon oral ID019	AY349400
<i>Prevotella</i> sp. clon oral IDR_CEC_0055	AY550997
<i>Prevotella</i> sp. clon oral IK053	AY349401
<i>Prevotella</i> sp. clon oral IK062	AY349402
<i>Prevotella</i> sp. clon oral P4PB_83 P2	AY207050
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 292	GQ422735
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 299	ACWZ01000026
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 300	GU409549
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 302	ACZK01000043
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 310	GQ422737
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 317	ACQH01000158
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 472	ACZS01000106
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 781	GQ422744
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral 782	GQ422745
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral F68	HM099652
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral G60	GU432133
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral G70	GU432179
<i>Prevotella</i> sp. taxón oral G71	GU432180
<i>Prevotella</i> sp. SEQ053	JN867222
<i>Prevotella</i> sp. SEQ065	JN867234
<i>Prevotella</i> sp. SEQ072	JN867238
<i>Prevotella</i> sp. SEQ116	JN867246
<i>Prevotella</i> sp. SG12	GU561343
<i>Prevotella</i> sp. sp24	AB003384
<i>Prevotella</i> sp. sp34	AB003385
<i>Prevotella stercorea</i>	AB244774

<i>Prevotella tannerae</i>	ACIJ02000018
<i>Prevotella timonensis</i>	ADEF01000012
<i>Prevotella veroralis</i>	ACVA01000027
<i>Prevotella jejuni</i> , <i>Prevotella aurantiaca</i> , <i>Prevotella baroniae</i> , <i>Prevotella colorans</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Prevotella dentasini</i> , <i>Prevotella enoeca</i> , <i>Prevotella falsenii</i> , <i>Prevotella fusca</i> , <i>Prevotella heparinolytica</i> , <i>Prevotella loescheii</i> , <i>Prevotella multisaccharivorax</i> , <i>Prevotella nanceiensis</i> , <i>Prevotella oryzae</i> , <i>Prevotella paludivivens</i> , <i>Prevotella pleuritidis</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Prevotella saccharolytica</i> , <i>Prevotella scopos</i> , <i>Prevotella shahii</i> , <i>Prevotella zoogloformans</i>	
<i>Prevotellaceae bacterium P4P_62 P1</i>	AY207061
<i>Prochlorococcus marinus</i>	CP000551
<i>Propionibacteriaceae bacterium NML 02_0265</i>	EF599122
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	NC_019395
<i>Propionibacterium acnes</i>	ADJM01000010
<i>Propionibacterium avidum</i>	AJ003055
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	NR_036972
<i>Propionibacterium granulosum</i>	FJ785716
<i>Propionibacterium jensenii</i>	NR_042269
<i>Propionibacterium propionicum</i>	NR_025277
<i>Propionibacterium sp. 434_HC2</i>	AFIL01000035

<i>Propionibacterium</i> sp. H456	AB177643
<i>Propionibacterium</i> sp. LG	AY354921
<i>Propionibacterium</i> sp. taxón oral 192	GQ422728
<i>Propionibacterium</i> sp. S555a	AB264622
<i>Propionibacterium thoenii</i>	NR_042270
<i>Proteus mirabilis</i>	ACLE01000013
<i>Proteus penneri</i>	ABVP01000020
<i>Proteus</i> sp. HS7514	DQ512963
<i>Proteus vulgaris</i>	AJ233425
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ABXW01000071
<i>Providencia rettgeri</i>	AM040492
<i>Providencia rustigianii</i>	AM040489
<i>Providencia stuartii</i>	AF008581
<i>Pseudoclavibacter</i> sp. Timone	FJ375951
<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	AY136666
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AABQ07000001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AY622220
<i>Pseudomonas gessardii</i>	FJ943496
<i>Pseudomonas mendocina</i>	AAUL01000021
<i>Pseudomonas monteilii</i>	NR_024910
<i>Pseudomonas poae</i>	GU188951
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000
<i>Pseudomonas putida</i>	AF094741
<i>Pseudomonas</i> sp. 2_1_26	ACWU01000257
<i>Pseudomonas</i> sp. G1229	DQ910482
<i>Pseudomonas</i> sp. NP522b	EU723211
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AM905854
<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
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	CP000323
<i>Psychrobacter faecalis</i>	HQ698566
<i>Psychrobacter nivimaris</i>	HQ698587
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	HQ698582
<i>Psychrobacter</i> sp. 13983	HM212668
<i>Pyramidobacter piscolens</i>	AY207056
<i>Ralstonia pickettii</i>	NC_010682
<i>Ralstonia</i> sp. 5_7_47FAA	ACUF01000076
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	AB364958
<i>Raoultella planticola</i>	AF129443
<i>Raoultella terrigena</i>	NR_037085
<i>Rhodobacter</i> sp. taxón oral C30	HM099648
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CP000144
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	X80615
<i>Rhodococcus equi</i>	ADNW01000058
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ACNO01000030
<i>Rhodococcus fascians</i>	NR_037021
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	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>	L36224
<i>Rickettsia typhi</i>	AE017197
<i>Robinsoniella peoriensis</i>	AF445258
<i>Roseburia cecicola</i>	GU233441
<i>Roseburia faecalis</i>	AY804149
<i>Roseburia faecis</i>	AY305310
<i>Roseburia hominis</i>	AJ270482
<i>Roseburia intestinalis</i>	FP929050
<i>Roseburia inulinivorans</i>	AJ270473

<i>Roseburia</i> sp. 11SE37	FM954975
<i>Roseburia</i> sp. 11SE38	FM954976
<i>Roseiflexus castenholzii</i>	CP000804
<i>Roseomonas cervicalis</i>	ADVL01000363
<i>Roseomonas mucosa</i>	NR_028857
<i>Roseomonas</i> sp. NML94_0193	AF533357
<i>Roseomonas</i> sp. NML97_0121	AF533359
<i>Roseomonas</i> sp. NML98_0009	AF533358
<i>Roseomonas</i> sp. NML98_0157	AF533360
<i>Rothia aerea</i>	DQ673320
<i>Rothia dentocariosa</i>	ADDW01000024
<i>Rothia mucilaginoso</i>	ACVO01000020
<i>Rothia nasimurium</i>	NR_025310
<i>Rothia</i> sp. taxón oral 188	GU470892
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	NR_026450
<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
<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
<i>Ruminococcus</i> sp. 18P13	AJ515913
<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	ACII01000172
<i>Ruminococcus</i> sp. 9SE51	FM954974
<i>Ruminococcus</i> sp. ID8	AY960564
<i>Ruminococcus</i> sp. K_1	AB222208
<i>Ruminococcus torques</i>	AAVP02000002
<i>Saccharomonospora viridis</i>	X54286

<i>Salmonella bongori</i>	NR_041699
<i>Salmonella enterica</i>	NC_011149
<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
<i>Salmonella enterica</i>	EU118094
<i>Salmonella enterica</i>	NC_011094
<i>Salmonella enterica</i>	AE014613
<i>Salmonella enterica</i>	ABFH02000001
<i>Salmonella enterica</i>	ABEM01000001
<i>Salmonella enterica</i>	ABAM02000001
<i>Salmonella typhimurium</i>	DQ344533
<i>Salmonella typhimurium</i>	AF170176
<i>Sarcina ventriculi</i>	NR_026146
<i>Scardovia inopinata</i>	AB029087
<i>Scardovia wiggsiae</i>	AY278626
<i>Segniliparus rotundus</i>	CP001958
<i>Segniliparus rugosus</i>	ACZI01000025
<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
<i>Selenomonas genomsp. P5</i>	AY341820
<i>Selenomonas genomsp. P6 clon oral</i> MB3_C41	DQ003636
<i>Selenomonas genomsp. P7 clon oral</i> MB5_C08	DQ003627
<i>Selenomonas genomsp. P8 clon oral</i> MB5_P06	DQ003628

<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802
<i>Selenomonas noxia</i>	GU470909
<i>Selenomonas ruminantium</i>	NR_075026
<i>Selenomonas sp. FOBRC9</i>	HQ616378
<i>Selenomonas sp. clon oral FT050</i>	AY349403
<i>Selenomonas sp. clon oral GI064</i>	AY349404
<i>Selenomonas sp. clon oral GT010</i>	AY349405
<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
<i>Selenomonas sp. clon oral JS031</i>	AY349410
<i>Selenomonas sp. clon oral OH4A</i>	AY947498
<i>Selenomonas sp. clon oral P2PA_80</i> <i>P4</i>	AY207052
<i>Selenomonas sp. taxón oral 137</i>	AENV01000007
<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
<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
<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
<i>Simonsiella muelleri</i>	ADCY01000105

<i>Slackia equolifaciens</i>	EU377663
<i>Slackia exigua</i>	ACUX01000029
<i>Slackia faecicanis</i>	NR_042220
<i>Slackia heliotrinireducens</i>	NR_074439
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	AB566418
<i>Slackia piriformis</i>	AB490806
<i>Slackia</i> sp. NATTS	AB505075
<i>Solobacterium moorei</i>	AECQ01000039
<i>Sphingobacterium faecium</i>	NR_025537
<i>Sphingobacterium mizutaii</i>	JF708889
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	NR_040953
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	ACHA02000013
<i>Sphingomonas echinoides</i>	NR_024700
<i>Sphingomonas</i> sp. clon oral FI012	AY349411
<i>Sphingomonas</i> sp. clon oral FZ016	AY349412
<i>Sphingomonas</i> sp. taxón oral A09	HM099639
<i>Sphingomonas</i> sp. taxón oral F71	HM099645
<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	CP000356
<i>Spiroplasma insolitum</i>	NR_025705
<i>Sporobacter termitidis</i>	NR_044972
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	NR_040962
<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>	NR_042247
<i>Sporosarcina newyorkensis</i>	AFPZ01000142
<i>Sporosarcina</i> sp. 2681	GU994081
<i>Staphylococcaceae</i> bacterium NML 92_0017	AY841362
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP002643
<i>Staphylococcus auricularis</i>	JQ624774
<i>Staphylococcus capitis</i>	ACFR01000029
<i>Staphylococcus caprae</i>	ACRH01000033
<i>Staphylococcus carnosus</i>	NR_075003
<i>Staphylococcus cohnii</i>	JN175375

<i>Staphylococcus condimentii</i>	NR_029345
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ACHE01000056
<i>Staphylococcus equorum</i>	NR_027520
<i>Staphylococcus fleurettii</i>	NR_041326
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	NC_007168
<i>Staphylococcus hominis</i>	AM157418
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	AEQA01000024
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	FJ189773
<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
<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
<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
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	NR_041781
<i>Streptococcus anginosus</i>	AECT01000011
<i>Streptococcus australis</i>	AEQR01000024
<i>Streptococcus bovis</i>	AEEL01000030
<i>Streptococcus canis</i>	AJ413203
<i>Streptococcus constellatus</i>	AY277942
<i>Streptococcus cristatus</i>	AEVC01000028
<i>Streptococcus downei</i>	AEKN01000002
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	AP010935

<i>Streptococcus equi</i>	CP001129
<i>Streptococcus equinus</i>	AEVB01000043
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	FR824043
<i>Streptococcus genomosp. C1</i>	AY278629
<i>Streptococcus genomosp. C2</i>	AY278630
<i>Streptococcus genomosp. C3</i>	AY278631
<i>Streptococcus genomosp. C4</i>	AY278632
<i>Streptococcus genomosp. C5</i>	AY278633
<i>Streptococcus genomosp. C6</i>	AY278634
<i>Streptococcus genomosp. C7</i>	AY278635
<i>Streptococcus genomosp. C8</i>	AY278609
<i>Streptococcus gordonii</i>	NC_009785
<i>Streptococcus infantarius</i>	ABJK02000017
<i>Streptococcus infantis</i>	AFNN01000024
<i>Streptococcus intermedius</i>	NR_028736
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	NR_037096
<i>Streptococcus massiliensis</i>	AY769997
<i>Streptococcus milleri</i>	X81023
<i>Streptococcus mitis</i>	AM157420
<i>Streptococcus mutans</i>	AP010655
<i>Streptococcus oligofermentans</i>	AY099095
<i>Streptococcus oralis</i>	ADMV01000001
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	AEKM01000012
<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
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	AENS01000003
<i>Streptococcus pyogenes</i>	AE006496
<i>Streptococcus rattii</i>	X58304
<i>Streptococcus salivarius</i>	AGBV01000001

<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
<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
<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
<i>Streptococcus sp. ICM2</i>	HQ616386
<i>Streptococcus sp. ICM4</i>	HQ616387
<i>Streptococcus sp. ICM45</i>	HQ616394
<i>Streptococcus sp. M143</i>	ACRK01000025
<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
<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
<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</i> sp. clon oral ASCD10	DQ272509
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE03	AY923134
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE04	AY953253
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE05	DQ272510
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE06	AY923135
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE09	AY923136
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE10	AY923137
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCE12	AY923138
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCF05	AY923140
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCF07	AY953255
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCF09	AY923142
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCG04	AY923145
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral BW009	AY005042
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral CH016	AY005044
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral GK051	AY349413
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral GM006	AY349414
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral P2PA_41 P2	AY207051
<i>Streptococcus</i> sp. clon oral P4PA_30 P4	AY207064
<i>Streptococcus</i> sp. taxón oral 071	AEEP01000019
<i>Streptococcus</i> sp. taxón oral G59	GU432132
<i>Streptococcus</i> sp. taxón oral G62	GU432146
<i>Streptococcus</i> sp. taxón oral G63	GU432150
<i>Streptococcus</i> sp. SHV515	Y07601
<i>Streptococcus suis</i>	FM252032
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CP000419
<i>Streptococcus uberis</i>	HQ391900
<i>Streptococcus urinalis</i>	DQ303194
<i>Streptococcus vestibularis</i>	AEKO01000008
<i>Streptococcus viridans</i>	AF076036
<i>Streptomyces albus</i>	AJ697941

<i>Streptomyces griseus</i>	NR_074787
<i>Streptomyces</i> sp. 1 AIP_2009	FJ176782
<i>Streptomyces</i> sp. SD 511	EU544231
<i>Streptomyces</i> sp. SD 524	EU544234
<i>Streptomyces</i> sp. SD 528	EU544233
<i>Streptomyces</i> sp. SD 534	EU544232
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	NR_027616
<i>Subdoligranulum variabile</i>	AJ518869
<i>Succinatimonas hippei</i>	AEVO01000027
<i>Sutterella morbirenis</i>	AJ832129
<i>Sutterella parvirubra</i>	AB300989
<i>Sutterella sanguinus</i>	AJ748647
<i>Sutterella</i> sp. YIT 12072	AB491210
<i>Sutterella stercoricanis</i>	NR_025600
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	ADMF01000048
<i>Synergistes genomsp. C1</i>	AY278615
<i>Synergistes</i> sp. RMA 14551	DQ412722
<i>Synergistetes bacterium</i> ADV897	GQ258968
<i>Synergistetes bacterium</i> LBVCM1157	GQ258969
<i>Synergistetes bacterium</i> taxón oral 362	GU410752
<i>Synergistetes bacterium</i> taxón oral D48	GU430992
<i>Syntrophococcus sucromutans</i>	NR_036869
<i>Syntrophomonadaceae genomsp. P1</i>	AY341821
<i>Tannerella forsythia</i>	CP003191
<i>Tannerella</i> sp. 6_1_58FAA_CT1	ACWX01000068
<i>Tatlockia micdadei</i>	M36032
<i>Tatumella ptyseos</i>	NR_025342
<i>Tessaracoccus</i> sp. taxón oral F04	HM099640
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	NR_075020
<i>Tetragenococcus koreensis</i>	NR_043113

<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	CP000924
<i>Thermobifida fusca</i>	NC_007333
<i>Thermofilum pendens</i>	X14835
<i>Thermus aquaticus</i>	NR_025900
<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860
<i>Trabulsiella guamensis</i>	AY373830
<i>Treponema denticola</i>	ADEC01000002
<i>Treponema genomsp. P1</i>	AY341822
<i>Treponema genomsp. P4 clon oral MB2_G19</i>	DQ003618
<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
<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
<i>Treponema socranskii</i>	NR_024868
<i>Treponema sp. 6:H:D15A_4</i>	AY005083
<i>Treponema sp. clone DDKL_4</i>	Y08894
<i>Treponema sp. clon oral JU025</i>	AY349417
<i>Treponema sp. clon oral JU031</i>	AY349416
<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
<i>Treponema sp. taxón oral 235</i>	GU408673

<i>Treponema sp. taxón oral 239</i>	GU408738
<i>Treponema sp. taxón oral 247</i>	GU408748
<i>Treponema sp. taxón oral 250</i>	GU408776
<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
<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. ovine footrot</i>	AJ010951
<i>Treponema vincentii</i>	ACYH01000036
<i>Tropheryma whipplei</i>	BX251412
<i>Trueperella pyogenes</i>	NR_044858
<i>Tsukamurella paurometabola</i>	X80628
<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
<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
<i>Veillonella atypica</i>	AEDS01000059
<i>Veillonella dispar</i>	ACIK02000021
<i>Veillonella genomosp. P1 clon oral MB5_P17</i>	DQ003631
<i>Veillonella montpellierensis</i>	AF473836
<i>Veillonella parvula</i>	ADFU01000009

<i>Veillonella</i> sp. 3_1_44	ADCV01000019
<i>Veillonella</i> sp. 6_1_27	ADCW01000016
<i>Veillonella</i> sp. ACP1	HQ616359
<i>Veillonella</i> sp. AS16	HQ616365
<i>Veillonella</i> sp. BS32b	HQ616368
<i>Veillonella</i> sp. ICM51a	HQ616396
<i>Veillonella</i> sp. MSA12	HQ616381
<i>Veillonella</i> sp. NVG 100cf	EF108443
<i>Veillonella</i> sp. OK11	JN695650
<i>Veillonella</i> sp. clon oral ASCA08	AY923118
<i>Veillonella</i> sp. clon oral ASCB03	AY923122
<i>Veillonella</i> sp. clon oral ASCG01	AY923144
<i>Veillonella</i> sp. clon oral ASCG02	AY953257
<i>Veillonella</i> sp. clon oral OH1A	AY947495
<i>Veillonella</i> sp. taxón oral 158	AENU01000007
<i>Veillonellaceae</i> bacterium taxón oral 131	GU402916
<i>Veillonellaceae</i> bacterium taxón oral 155	GU470897
<i>Vibrio cholerae</i>	AAUR01000095
<i>Vibrio fluvialis</i>	X76335
<i>Vibrio furnissii</i>	CP002377
<i>Vibrio mimicus</i>	ADAF01000001
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AAWQ01000116
<i>Vibrio</i> sp. RC341	ACZT01000024
<i>Vibrio vulnificus</i>	AE016796
<i>Victivallaceae</i> bacterium NML 080035	FJ394915
<i>Victivallis vadensis</i>	ABDE02000010
<i>Virgibacillus proomii</i>	NR_025308
<i>Weissella beninensis</i>	EU439435
<i>Weissella cibaria</i>	NR_036924

<i>Weissella confusa</i>	NR_040816
<i>Weissella hellenica</i>	AB680902
<i>Weissella kandleri</i>	NR_044659
<i>Weissella koreensis</i>	NR_075058
<i>Weissella paramesenteroides</i>	ACKU01000017
<i>Weissella</i> sp. KLDS 7.0701	EU600924
<i>Wolinella succinogenes</i>	BX571657
<i>Xanthomonadaceae</i> bacterium NML 03_0222	EU313791
<i>Xanthomonas campestris</i>	EF101975
<i>Xanthomonas</i> sp. kmd_489	EU723184
<i>Xenophilus aerolatus</i>	JN585329
<i>Yersinia aldovae</i>	AJ871363
<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
<i>Yersinia kristensenii</i>	ACCA01000078
<i>Yersinia mollaretii</i>	NR_027546
<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 oncófilas ilustrativas

Género	Especie	Asociación tumoral
<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
<i>Methylophilus</i>	<i>sp.</i>	Cáncer de próstata
<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i>	Cáncer de próstata
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>	MALT gástrico
<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i>	Cáncer renal
<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
<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>Prevotella</i>	<i>sp</i>	Cáncer de laringe
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	Cáncer de laringe
<i>Gemella</i>	<i>sp</i>	Cáncer de laringe
<i>Bordetella</i>	<i>Pertussis</i>	Cáncer de laringe
<i>Cornebacterium</i>	<i>tuberculoesteraricum</i>	Carcinoma epidermoide oral
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	Carcinoma epidermoide oral
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	Carcinoma epidermoide oral
<i>Exiguobacterium</i>	<i>oxidotolerans</i>	Carcinoma epidermoide oral

<i>Fusobacterium</i>	<i>naviforme</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Veillonella</i>	<i>dispar</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>stomatis</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Gemella</i>	<i>Haemolysans</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Johnsonella</i>	<i>ignava</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguis</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	Carcinoma oral	epidermoide
<i>Mycobacteria</i>	<i>marinum</i>	Infección pulmonar	
<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
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Eubacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Dialister</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<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>Atoppbium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<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
<i>Sneathia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Prevotella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Porphyromonas</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<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
<i>Granulicatella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
<i>Variovorax</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma peritoneal
<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	Pseudomixoma peritoneal
<i>Pseudomonas</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma peritoneal

<i>Tessaracoccus</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma peritoneal
<i>Acinetobacter</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma peritoneal
<i>Helicobacter</i>	<i>hepaticus</i>	Cáncer de mama
<i>Chlamydia</i>	<i>psittaci</i>	Linfoma de MALT
<i>Borrelia</i>	<i>burgdorferi</i>	Linfoma de piel de linfocitos B
<i>Escherichia</i>	<i>Coli NC101</i>	Cáncer colorrectal
<i>Salmonella</i>	<i>typhimurium</i>	Herramienta
<i>Eterococcus</i>	<i>faecalis</i>	sangre
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	sangre
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>	sangre
<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

[196] En determinadas realizaciones, las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento se obtienen a partir de bacterias anaerobias estrictas. Los ejemplos de bacterias anaeróbicas estrictas incluyen bastones gramnegativos (incluyendo los géneros de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila* y *Sutterella* spp.), cócicas grampositivas (principalmente *Peptostreptococcus* spp.), formadoras de esporas grampositivas (*Clostridium* spp.), bacilos no formadores de esporas (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp.), y cocos gramnegativos

(principalmente *Veillonella* spp.). En algunas realizaciones, las bacterias anaerobias estrictas son de un género seleccionado del grupo que consiste en *Agathobaculum*, *Atopobium*, *Blautia*, *Burkholderia*, *Dielma*, *Longicatena*, *Paraclostridium*, *Turicibacter*, y *Tyzzerella*.

[197] En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento se obtienen a partir de las bacterias de un género seleccionado del grupo que consiste en *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Shigella* y *Staphylococcus*.

[198] En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento se obtienen a partir de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Blautia massiliensis*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Dielma fastidiosa*, *Longicatena caecimuris*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Tyzzerella nexilis*, *Hungatella effluvia*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Veillonella tobetsuensis*.

[199] En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento se obtienen a partir de una bacteria *Prevotella* seleccionada del grupo que consiste en *Prevotella albensis*, *Prevotella amnii*, *Prevotella bergensis*, *Prevotella bivia*, *Prevotella brevis*, *Prevotella bryantii*, *Prevotella buccae*, *Prevotella buccalis*, *Prevotella copri*, *Prevotella dentalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella disiens*, *Prevotella histicola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella maculosa*, *Prevotella marshii*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella micans*, *Prevotella multiformis*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Prevotella oris*, *Prevotella oulorum*, *Prevotella pallens*, *Prevotella salivae*, *Prevotella stercorea*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella timonensis*, *Prevotella jejuni*, *Prevotella aurantiaca*, *Prevotella baroniae*, *Prevotella*

colorans, *Prevotella corporis*, *Prevotella dentasini*, *Prevotella enoeca*, *Prevotella falsenii*, *Prevotella fusca*, *Prevotella heparinolytica*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella multisaccharivorax*, *Prevotella nanceiensis*, *Prevotella oryzae*, *Prevotella paludivivens*, *Prevotella pleuritidis*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella saccharolytica*, *Prevotella scopos*, *Prevotella shahii*, *Prevotella zoogloformans*, y *Prevotella veroralis*.

[200] En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento son de una cepa de bacterias que comprende una secuencia genómica que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia (p. ej., al menos un 99.5 % de identidad de secuencia, al menos un 99.6 % de identidad de secuencia, al menos un 99.7 % de identidad de secuencia, al menos un 99.8 % de identidad de secuencia, al menos un 99.9 % de identidad de secuencia) con respecto a la secuencia genómica de la cepa de bacterias depositadas con el número de registro de ATCC tal como se proporciona en la Tabla 3. En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV) en el presente documento son de una cepa de bacterias que comprende una secuencia 16S que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia (p. ej., al menos un 99.5 % de identidad de secuencia, al menos un 99.6 % de identidad de secuencia, al menos un 99.7 % de identidad de secuencia, al menos un 99.8 % de identidad de secuencia, al menos un 99.9 % de identidad de secuencia) con respecto a la secuencia 16S tal como se proporciona en la Tabla 3.

Tabla 3 Cepas bacterianas ilustrativas

SEQ ID NO:	Cepa	Número de registro	Secuencia 16S
	Parabacteroides goldsteinii Cepa A		
	Bifidobacterium animalis ssp. lactis Cepa A	PTA-125097	
	Bifidobacterium animalis ssp. lactis Cepa B		
	Bifidobacterium animalis ssp. lactis Cepa C		
	Blautia Massiliensis Cepa A	PTA-125134	
	Prevotella Cepa B	Número de registro de NRRL B 50329	
	Prevotella Histicola Cepa A		
	Prevotella melanogenica Cepa A		
	Blautia Cepa A	PTA-125346	
	Lactococcus lactis cremoris Cepa A	PTA-125368	
	Lactococcus lactis cremoris Cepa B		
	Cepa de Ruminococcus gnavus	PTA-125706	
	Cepa de Tyzzerella nexilis	PTA-125707	

	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-19	>S10-19-contig CAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGA AGTATTTTCGGTATGTAAAGCTCT ATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTAT CCGGATTTACTGGGTGTAAAGGG AGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAAC TGCGGGACTGCTTTGGAACTGT TTAAGTGGAGTGTCGGAGAGGTA AGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGA ACACCAGTGGCGAAGGCGACTTA CTGGACGATAACTGACGTTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAATACTAGG TGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGG TGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTA TTCCACCTGGGGAGTACGTTCGC AAGAATGAAACTCAAAGGAATTG ACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCA ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT TGACATCGATCCGACGGGGGAGT AACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCG GAGAAGACAGGTGGTGCATGGTT GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG CGCAACCCTTATTCTAAGTAGCC AGCGGTTTCGGCCGGGAACCTTG GGAGACTGCCAGGGATAACCTGG AGGAAGGTGGGGATGACGTCAA TCATCATGCCCTTATGATCTGG GCTACACACGTGCTACAATGGCG TAAACAAAGAGAAGCAAGACCGC GAGGTGGAGCAAATCTCAAAAAT AACGTCTCAGTTCGGACTGCAGG CTGCAACTCGCCTGCACGAAGCT GGAATCGCTAGTAATCGCGAATC AGAATGTCGCGGTGAATACGTTT CCGGGTCTTGTACACACCGCCCG TCACACCATGGGAGTCAGTAACG CCCGAAGTCAGTGACCCAACCGC AAGG
--	-------------------------------------	---

	<i>Clostridium symbiosum</i> S6-202	<pre> >S6-202-contig GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTG AAGAAGTATTTTCGGTATGTAAAG CTCTATCAGCAGGGAAGAAAATG ACGGTACCTGACTAAGAAGCCCC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGGGCAAGCG TTATCCGGATTTACTGGGTGTAA AGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCT CAACTGCGGGACTGCTTTGGAAA CTGTTTAACTGGAGTGTCGGAGA GGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATTAGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA CTTACTGGACGATAACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATAACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAATAC TAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCT TCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTA AGTATTCCACCTGGGGAGTACGT TCGCAAGAATGAAACTCAAAGGA ATTGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA AGCAACGCGAAGAACCCTACCAG GTCTTGACATCGATCCGACGGGG GAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGG GGCGGAGAAGACAGGTGGTGCAT GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCTTATTCTAAGT AGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACT CTTGGGAGACTGCCAGGGATAAC CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCTTATGAT CTGGGCTACACACGTGCTACAAT GGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGA CCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAA AAATAACGTCTCAGTTCGGACTG CAGGCTGCAACTCGCCTGCACGA AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG AATCAGAATGTCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGTCTTGTAACACACCG CCCGTCACACCATGGGAGTCAGT AACGCCCCGAAGTCAGTGACCCAA CCGCAAGGAGGG </pre>
--	--	---

	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-257		>secuencia de consenso TGACTAAGAAGCCCCGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGG ATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCG TAGACGGTAAAGCAAGTCTGAAG TGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCG GGACTGCTTTGGAAACTGTTTAA CTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTG GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACTTACTGG ACGATAACTGACGTTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTGTT GGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCC GTCGCAAACGCAGTAAGTATTCC ACCTGGGGAGTACGTTGCAAGA ATGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTGCAAGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC ATCGATCCGACGGGGGAGTAACG TCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGA AGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCG GTTCGGCCGGGAACCTTGGGAG ACTGCCAGGGATAACCTGGAGGA AGGTGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCCTTATGATCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGCGTAAA CAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGG TGGAGCAAATCTCAAAAATAACG TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGC AACTCGCCTGCACGAAGCTGGAA TCGCTAGTAATCGCGAATCAGAA TGTCGC GGTGAATACGTTCCC
	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-552		>10-552 secuencia de consensoCGTATTACCGCGAC ATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG ATTCCAGCTTCGTGCAGGCGAGT TGCAGCCTGCAGTCCGAAGTGA ACGTTATTTTTGAGATTTGCTCC ACCTCGCGGTCTTGCTTCTCTTT GTTTACGCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCAGATCATAAGGGGCAT

			GATGATTTGACGTCATCCCCACC TTCCTCCAGGTTATCCCTGGCAG TCTCCCAAGAGTTCCCGGCCGAA CCGCTGGCTACTTAGAATAAGGG TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC CCAACATCTCACGACACGAGCTG ACGACAACCATGCACCACCTGTC TTCTCCGCCCCGAAGGGAAGGGG ACGTTACTCCCCCGTCGGATCGA TGTC AAGACCTGGTAAGGTTCTT CGCGTTGCTTCGAATTAAACCAC ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTC CCCGTCAATTCTTTGAGTTTCA TTCTTGCGAACGTACTCCCCAGG TGGAATACTTACTGCGTTTGCGA CGGCACCGAAGAGCTTTGCTCCC CAACACCTAGTATTCATCGTTTA CGGCGTGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT TCGAGCCTCAACGTCAGTTATCG TCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACT GGTGTTCCTCCTAATATCTACGC ATTTACACCGCTACACTAGGAATT CCTTACCTCTCCGACACTCCA GTTAAACAGTTTCCAAAGCAGTC CCGCAGTTGAGCCGCGGGCTTTC ACTTCAGACTTGCTTTACCGTCT ACGCTCCCTTTACACCCAGTAAA TCCGGATAACGCTTGCCCCCTAC GTATTACCGCGGCTGCTGGCACG TAGTTAGCCGGGGCTTCTTAGT
	<i>Clostridium</i> <i>ymbiosum</i> S10- 551		>10-511_secuencia de consenso 2 lecturas de 10-511 ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT T TACTGGGTGTAAAGGGAGCGTA GACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTG AAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGG ACTGCTTTGGAACTGTTTAACT GGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA ATTCTAGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGAC GATAACTGACGTTGAGGCTCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTTGG

			GGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGT CGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAAT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGTCTTGACAT CGATCCGACGGGGGAGTAACGTC CCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC AGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGT TCGGCCGGGAACCTTGGGAGAC TGCCAGGGATAACCTGGAGGAAG GTGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCCCTTATGATCTGGGCTACA CACGTGCTACAATGGCGTAAACA AAGAGAAGCAAGACCGCGAGGTG GAGCAAATCTCAAAAATAACGTC TCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAA CTCGCCTGCACGAAGCTGGAATC GCTAGTAATCGCGAATCAGAATG TCGCGGTGAATACGTTCCC
	<i>Clostridium</i> <i>symbiosum</i> S10- 530		>10- 530GAAAATGACGGTACCTGACT AAGAAGCCCCGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GGGGCAAGCGTTATCCGGATTTA CTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGAC GGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCCGCGGCTCAACTGCGGGACT GCTTTGGAACTGTTTAACTGGA GTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATT CCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATTAGGAGGAACACCAGTG GCGAAGGCGACTTACTGGACGAT AACTGACGTTGAGGCTCGAAAGC GTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA CGATGAATACTAGGTGTTGGGGA GCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGC AAACGCAGTAAGTATTCCACCTG GGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACC CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGTCTTGACATCGA

			TCCGACGGGGGAGTAACGTCCCC TTCCCTTCGGGGCGGA
	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-533		>10-533_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10-533GAACGTATTCACCGCGACAT TCTGATTCGCGATTACTAGCGAT TCCAGCTTCGTGCAGGCGAGTTG CAGCCTGCAGTCCGAAGTGAAGAC GTTATTTTTGAGATTGCTCCAC CTCGCGGTCTTGCTTCTCTTTGT TTACGCCATTGTAGCACGTGTGT AGCCCAGATCATAAGGGGCATGA TGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCAGGTTATCCCTGGCAGTC TCCCAAGAGTTCCCGGCCGAACC GCTGGCTACTTAGAATAAGGGTT GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC AACATCTCACGACACGAGCTGAC GACAACCATGCACCACCTGTCTT CTCCGCCCCGAAGGGAAGGGGAC GTTACTCCCCCGTCGGATCGATG TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCG CGTTGCTTCGAATTAAACCACAT GCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCC CGTCAATTCCTTTGAGTTTCATT CTTGCGAACGTACTCCCCAGGTG GAATACTTACTGCGTTTGCAGACG GCACCGAAGAGCTTTGCTCCCCA ACACCTAGTATTCATCGTTTACG GCGTGGACTACCAGGGTATCTAA TCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC GAGCCTCAACGTCAGTTATCGTC CAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGG TGTTCCCTCCTAATATCTACGCAT TTCACCGCTACACTAGGAATTCC ACTTACCTCTCCGACACTCCAGT TAAACAGTTTCCAAAGCAGTCCC GCAGTTGAGCCGCGGGCTTTCAC TTCAGACTTGCTTTACCGTCTAC GCTCCCTTTACACCCAGTAAATC CGGATAACGCTTGCCCCCTACGT ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA GTTAGCCGGGGCTTCTTAG
	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-537		>10-537_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10-537ACTAAGAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

			ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCG GATTTACTGGGTGTAAAGGGAGC GTAGACGGTAAAGCAAGTCTGAA GTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGC GGGACTGCTTTGGAACTGTTTA ACTGGAGTGTCTGGAGAGGTAAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAA ATGCGTAGATATTAGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGACTTACTG GACGATAACTGACGTTGAGGCTC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGAATACTAGGTGT TGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGC CGTCGCAAACGCAGTAAGTATTC CACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAG AATGAAACTCAAAGGAATTGACG GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA CATCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAG AAGACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCTTATTCTAAGTAGCCAGC GGTTCGGCCGGGAACCTTTGGGA GACTGCCAGGGATAACCTGGAGG AAGGTGGGGATGACGTCAAATCA TCATGCCCCCTTATGATCTGGGCT ACACACGTGCTACAATGGCGTAA ACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAG GTGGAGCAAATCTCAAAAATAAC GTCTCAGTTTCGGAAGTGCAGGCTG CAACTCGCCTGCACGAAGCTGGA ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA ATGTCGCGGTGAATACGTT
	<i>Clostridium</i> <i>ymbiosum</i> S10- 544		>10- 544ATGACGGTACCTGACTAAGA AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGGGG CAAGCGTTATCCGGATTTACTGG GTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTA AAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTT TGGAAGTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAAGTGAATTCCTA GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATTAGGAGGAACACCAGTGGCGA

			AGGCGACTTACTGGACGATAACT GACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGG GGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT GAATACTAGGTGTTGGGGAGCAA AGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAAC GCAGTAAGTATTCCACCTGGGGA GTACGTTTCGCAAGAATGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGACCCGCA CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT TACCAGGTCTTGACATCGATCCG ACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCC CTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTG GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTTATT CTAAGTAGCCAGCGGTTTCGGCCG GGAACCTCTTGGGAGACTGCCAGG GATAACCTG
	<i>Clostridium</i> <i>ymbiosum</i> S10- 547		>10- 547GGGAAGAAAATGACGGTACC TGACTAAGAAGCCCCGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGG ATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCG TAGACGGTAAAGCAAGTCTGAAG TGAAAGCCCCGCGGCTCAACTGCG GGAAGTCTTTGGAACTGTTTAA CTGGAGTGTCTGGAGAGGTAAGTG GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCCTAGATATTAGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACTTACTGG ACGATAACTGACGTTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTGTT GGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCC GTCGCAAACGCAGTAAGTATTCC ACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGA ATGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC ATCGATCCGACGGGGGAGTAACG TCCCCTTCCCCTTCGGGGCGGAGA AGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA

			ACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCG GTTCGGCCGGGAATC
	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-548		>10-548_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10-548AAGAAGCCCCGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT TTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTA GACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTG AAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGG ACTGCTTTTGAAACTGTTTAACT GGAGTGTTCGAGAGGTAAGTGG ATTCTAGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGAC GATAACTGACGTTGAGGCTCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTTGG GGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGT CGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAAT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGTCTTGACAT CGATCCGACGGGGGAGTAACGTC CCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGT TCGGCCGGGAATCTTGGGAGAC TGCCAGGGATAACCTGGAGGAAG GTGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCCCTTATGATCTGGGCTACA CACGTGCTACAATGGCGTAAACA AAGAGAAGCAAGACCGCGAGGTG GAGCAAATCTCAAAAATAACGTC TCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAA CTCGCCTGCACGAAGCTGGAATC GCTAGTAATCGCGAATCAGAATG TCGCGGTGAATACGTT
	<i>Clostridium</i> sp. S7-203		>S7-203-357F TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGT GAAGAAGTATTTTCGGTATGTAAA GCTCTATCAGCAGGGAAGAAAAT GACGGTACCTGACTAAGAAGCCC

		CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTGTA AAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCA AGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGC TCAACTGCGGGACTGCTTTGGAA ACTGTTTAACTGGAGTGTCGGAG AGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG ACTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAATA CTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGT AAGTATTCCACCTGGGGAGTACG TTCGCAAGAATGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGACCCGCACAAGC GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG AAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCGATCCGACGGG GGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCG GGGCGGAGAAGACAGGTGGTGCA TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTAAG TAGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAC TCTTGGGAGACTGCCAGGGATAA CCTGGAGGAAGGTGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCT
	<i>Clostridium</i> sp. 36A7-1014	GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTT CGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT TACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGA AAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGA CTGCTTTGGAAACTGTTTAACTG GAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACTTACTGGACG ATAACTGACGTTGAGGCTCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTTGGG

			GAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTC GCAAACGCAGTAAGTATTCCACC TGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATC GATCCGACGGGGGAGTAACGTCC CCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGA CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC CTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTT C
	<i>Clostridium</i> sp. S4-31		>4-31-contig GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG AGTGAAGAAGTATTTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAA AATGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGGGGCA AGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAA GCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGC GGCTCAACTGCGGGACTGCTTTG GAAACTGTTTAACTGGAGTGTCG GAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGT GTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG GCGACTTACTGGACGATAACTGA CGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG AGCAAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCCGTAAACGATGA ATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGC AGTAAGTATTCCACCTGGGGAGT ACGTTCGCAAGAATGAACTCAA AGGAATTGACGGGGACCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT TCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTA CCAGGTCTTGACATCGATCCGAC GGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCT TCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGT GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTCT AAGTAGCCAGCGGTTTCGGCCGGG AACTCTTGGGAGACTGCCAGGGA TAACCTGGAGGAAGGTGGGGATG

			ACGTCAAATCATCATGCCCTTA TGATCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGCGTAAACAAAGAGAAGC AAGACCGCGAGGTGGAGCAAATC TCAAAAATAACGTCTCAGTTCGG ACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC ACGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT CGCGAATCAGAATGTCGCGGTGA ATACGTTCCCGGGTCTTGTACAC ACCGCCCGTCACACCATGGGAGT CAGTAACGCCCCGAAGTCAGTGAC CCAACCGCAAGGAGGGAGCTG
	<i>Clostridium</i> sp. S210-133		>210-133-Contig TTCGGTATGTAAAGCTCTATCAG CAGGGAAGAAAATGACGGTACCT GACTAAGAAGCCCCGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGA TTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGT GAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGG GACTGCTTTGGAACTGTTTAAC TGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGG AATTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACTTACTGGA CGATAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGAATACTAGGTGTTG GGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCG TCGCAAACGCAGTAAGTATTCCA CCTGGGGAGTACGTTGCAAGAA TGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCAT GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG AAGAACCTTACCAGGTCTTGACA TCGATCCGACGGGGGAGTAACGT CCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAA GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGG TTCGGCCGGGAACCTTTGGGAGA CTGCCAGGGATAACCTGGAGGAA GGTGGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCCCTTATGATCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGCGTAAA CAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGG

			TGGAGCAAATCTCAAAAATAACG TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGC AACTCGCCTGCACGAAGCTGGAA TCGCTAGTAATCGCGAATCAGAA TGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCCG AAGTCAGTGACCCA
	<i>Clostridium</i> <i>symbiosum</i> S10- 534		>10-534_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10- 534ACTAAGAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCG GATTTACTGGGTGTAAAGGGAGC GTAGACGGTAAAGCAAGTCTGAA GTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGC GGGACTGCTTTGGAACTGTTTA ACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAAG TGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTACT GGACGATAACTGACGTTGAGGCT CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG ATTAGATAACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAATACTAGGTG TTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTG CCGTGCGAAACGCAGTAAGTATT CCACCTGGGGAGTACGTTGCGAA GAATGAACTCAAAGGAATTGAC GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG CATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTG ACATCGATCCGACGGGGGAGTAA CGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGA GAAGACAGGTGGTGCATGGTTGT CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCTTATTCTAAGTAGCCAG CGGTTCGGCCGGGAACCTTGGG AGACTGCCAGGGATAACCTGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCAAATC ATCATGCCCCCTTATGATCTGGGC TACACACGTGCTACAATGGCGTA AACAAAGAGAAGCAAGACCGCGA GGTGGAGCAAATCTCAAAAATAA CGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCT GCAACTCGCCTGCACGAAGCTGG

			AATCGCTAGTAATCGCGAATCAG AATGTCGCGGTGAATACGTTCC
	<i>Clostridium</i> sp. S4-44		>4-44-contig CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG TGAAGAAGTAGTTTCGGTATGTA AAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAA ATGACGGTACCTGACTAAGAAGC CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGCG GCTCAACTGCGGGACTGCTTTGG AAACTGTTTAACTGGAGTGTCGG AGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATT AGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG CGACTTACTGGACGATAACTGAC GTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGA GCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAA TACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGC TCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCA GTAAGTATTCCACCTGGGGAGTA CGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAA GGAATTGACGGGGACCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAGGTCTTGACATCGATCCGACG GGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTT CGGGGCGGAGAAGACAGGTGGTG CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTATTCTA AGTAGCCAGCGGTTTCGGCCGGGA ACTCTTGGGAGACTGCCAGGGAT AACCTGGAGGAAGGTGGGGGATG ACGTCAAATCATCATGCCCTTA TGATCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGCGTAAACAAAGAGAAGC AAGACCGCGAGGTGGAGCAAATC TCAAAAATAACGTCTCAGTTCGG ACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC ACGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT CGCGAATCAGAATGTCGCGGTGA ATACGTTCCCGGGTCTTGTACAC ACCGCCCGTCACACCATGGGAGT CAGTAACGCCCGAAGTCAGTGAC

			CCAACCGCAAGGAGGGAGCTGCC GA
	<i>Hungatella hathewayi</i> o [<i>Clostridium</i>] <i>hathewayi</i> 34D2-1004		GAAGTATTTTCGGTATGTAAAGCT CTATCAGCAGGGAAGAAAATGAC GGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGGGCAAGCGTT ATCCGGATTTACTGGGTGTAAAG GGAGCGTAGACGGTTTAGCAAGT CTGAAGTGAAAGCCCCGGGCTCA ACCCCGGTACTGCTTTGGAAACT GTTAGACTTGAGTGCAGGAGAGG TAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAG GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT TACTGGACTGTAAGTACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATACCTGGTAGTC CACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCTGGGGGGCAAAGCCCTTC GGTGCCGCCGCAAACGCAATAAG TATTCCACCTGGGGAGTACGTTTC GCAAGAATGAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG CAACGCGAAGAACCTTACCAAGT CTTGACATC
	<i>Hungatella hathewayi</i> o [<i>Clostridium</i>] <i>hathewayi</i> 34H6-1004		TTCGGTATGTAAAGCTCTATCAG CAGGGAAGAAAATGACGGTACCT GACTAAGAAGCCCCGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGA TTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTTTAGCAAGTCTGAAGT GAAAGCCCCGGGCTCAACCCCGG TACTGCTTTGGAACTGTTAGAC TTGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGG AATTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGA CTGTAAGTACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGAATACTAGGTGTCG GGGGGCAAAGCCCTTCGGTGCCG CCGCAAACGCAATAAGTATTCCA CCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAA TGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCAT

			GTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCG AAGAACCTTACCAAGTCTTGACA TCCCA
	<i>Hungatella effluvia</i> 36B10-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTT CGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT TACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGA AAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGTA CTGCTTTGGAAACTGTTTGACTT GAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT GTAAGTACGTTGAGGCTCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTCGGG GGACAAAGTCCTTCGGTGCCGCC GCTAACGCAATAAGTATTCCACC TGGGGAGTACGTTGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGTCTTGACATC CCATTGAAAATCATTTAACCG
	<i>Hungatella effluvia</i> 36C4- 1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTT CGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT TACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGA AAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGTA CTGCTTTGGAAACTGTTTGACTT GAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT GTAAGTACGTTGAGGCTCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTCGGG GGACAAAGTCCTTCGGTGCCGCC GCTAACGCAATAAGTATTCCACC

			TGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGTCTTGACATC CCATTGAAAA
	<i>Hungatella</i> <i>effluvii</i> 36F7- 1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTT CGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT TACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGA AAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTA CTGCTTTGGAACTGTTTGA CTT GAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT GTAAC TGACGTTGAGGCTCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTCGGG GGACAAAGTCCTTCGGTGCCGCC GCTAACGCAATAAGTATTCCACC TGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGTCTTGACATC CCATTGAA
	<i>Lachnospiracea</i> e sp o [<i>Clostridium</i>] <i>Citroniae</i> 39A7-1014		GACGGTACCTGACTAAGAAGCCC CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTGTA AAGGGAGCGTAGACGGCGAAGCA AGTCTGGAGTGAAAACCCAGGGC TCAACCCTGGGACTGCTTTGGAA ACTGTTTTGTAGAGTGTCGGAG AGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGCGAAGGCG GCTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAATG CTAGGTGTTGGGGGG

	<i>Lachnospiraceae</i> <i>[Clostridium]</i> <i>citroniae</i> 39A8-1014		GACGGTACCTGACTAAGAAGCCC CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTGTA AAGGGAGCGTAGACGGCGAAGCA AGTCTGGAGTGAAAACCCAGGGC TCAACCCTGGGACTGCTTTGGAA ACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAG AGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG GCTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAATG CTAGGTGTTGGGGGG
	<i>Lachnospiraceae</i> <i>[Clostridium]</i> <i>citroniae</i> 36A6-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTT CGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAACTGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT TACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGCGAAGCAAGTCTGGAGTGA AAACCCAGGGCTCAACCCTGGGA CTGCTTTGGAACTGTTTTGCTA GAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGGCTTACTGGACG ATAACTGACGTTGAGGCTCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGCTAGGTGTTGGG GGGCAAAGCCCTTC
	<i>Lachnospiraceae</i> <i>[Clostridium]</i> <i>sp</i> 36C9-1014		GAAGTATTTTCGGTATGTAACTT CTATCAGCAGGGAAGAAAATGAC GGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGGGCAAGCGTT ATCCGGATTTACTGGGTGTAAAG GGAGCGTAGACGGCAGTGCAAGT CTGAAGTGAAAGCCCCGGGGCTCA ACCCCGGGACTGCTTTGGAACT GTGCAGCTAGAGTGTCGGAGAGG CAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAG GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT TGCTGGACGATGACTGACGTTGA

			GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATAACCCTGGTAGTC CACGCCGTAAACGATGACTACTA GGTGTCTGGGGAGCAAAGCTCTTC GGTGCCGCAGCCAACGCAATAAG TAGTCCACCTGGGGAGTACGTTC GCAAGAATGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGACCCGCACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG CAACGCGAAGAACCTTACCTGCT CTTGACATCCCTCTGACCG
	[<i>Clostridium</i>] <i>bolteae</i> S10-21		>S10-121-contig GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTG AAGAAGTATTTTCGGTATGTAAAG CTCTATCAGCAGGGAAGAAAATG ACGGTACCTGACTAAGAAGCCCC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGGGCAAGCG TTATCCGGATTTACTGGGTGTAA AGGGAGCGTAGACGGCGAAGCAA GTCTGAAGTGAAAACCCAGGGCT CAACCCTGGGACTGCTTTGGAAA CTGTTTTGCTAGAGTGTCTGGAGA GGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATTAGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACGATAACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATAACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAATGC TAGGTGTTGGGGGGCAAAGCCCT TCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTA AGCATTCACCTGGGGAGTACGT TCGCAAGAATGAAACTCAAAGGA ATTGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA AGCAACGCGAAGAACCTTACCAA GTCTTGACATCCTCTTGACCGGC GTGTAACGGCGCCTTCCCTTCGG GGCAGGAGAGACAGGTGGTG CAT GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCTTATCCTTAGT AGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCAC TCTAGGGAGACTGCCAGGGATAA CCTGGAGGAAGGTGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCCTTATGA TTTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGCGTAAACAAAGGGAAGCAAG

			ACAGTGATGTGGAGCAAATCCCA AAAATAACGTCCCAGTTCGGACT GTAGTCTGCAACCCGACTACACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC GAATCAGAATGTCGCGGTGAATA CGTTCCCGGGTCTTGTACACACC GCCCGTCACACCATGGGAGTCAG CAACGCCCCGAAGTCAGTGACCCA ACTCGCAAGAGAGGG
	<i>Ruminococcus gnavus</i> Cepa A	PTA-126695	CCTTAGCGGTTGGGTCACTGACT TCGGGCGTTACTGACTCCCATGG TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGA CCCGGGAACGTATTCACCGCGAC ATTCTGATTTCGCGATTACTAGCG ATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGT TGCAGACTACAATCCGAAGTGAAG ACGTTATTTTTGGGATTTGCTCC CCCTCGCGGGCTCGCTTCCCTTT GTTTACGCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCTGGTCATAAGGGGCAT GATGATTTGACGTCATCCCCACC TTCCTCCAGGTTATCCCTGGCAG TCTCTCTAGAGTGCCCATCCTAA ATGCTGGCTACTAAAGATAGGGG TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC CCAACATCTCACGACACGAGCTG ACGACAACCATGCACCACCTGTC TCCTCTGTCCCGAAGGAAAGCTC CGATTAAAGAGCGGTCAGAGGGA TGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTT CGCGTTGCTTCGAATTAAACCAC ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTC CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA TTCTTGCGAACGTACTCCCCAGG TGGAATACTTATTGCGTTTGCTG CGGCACCGAATGGCTTTGCCACC CGACACCTAGTATTCATCGTTTA CGGCGTGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT TCGAGCCTCAACGTCAGTCATCG TCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACT GGTGTTCCTCCTAATATCTACGC ATTTACCGCTACACTAGGAATT CCGCTTTCCTCTCCGACACTCTA GCCTGACAGTTCCAAATGCAGT
	<i>Tyzzerella nexilis</i> Cepa A		> T. nexilis S10-231 secuencia de consenso GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGGTGCAAGCG

		TTATCCGGATTTACTGGGTGTAA AGGGAGCGTAGACGGTTGTGTAA GTCTGATGTGAAAGCCCCGGGGCT CAACCCCGGGACTGCATTGGAAA CTATGTAAGTAGAGTGTTCGGAGA GGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATTAGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACGATCACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGACTAC TAGGTGTTCGGGGAGCAAAGCTCT TCGGTGCCGCAGCAAACGCAATA AGTAGTCCACCTGGGGAGTACGT TCGCAAGAATGAACTCAAAGGA ATTGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA AGCAACGCGAAGAACCTTACCTG GTCTTGACATCCCTCTGACCGCT CTTTAATCGGAGTTTTCCTTCGG GACAGAGGAGACAGGTGGTGCAT GGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTG AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCCTATCTTCAGT AGCCAGCATTTAAGGTGGGCACT CTGGAGAGACTGCCAGGGATAAC CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCTTATGAC CAGGGCTACACACGTGCTACAAT GGCGTAAACAAAGGGAAGCGAAC CTGTGAGGGGAAGCAAATCTCAA AAATAACGTCTCAGTTCGGATTG TAGTCTGCAACTCGACTACATGA AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG AATCAGCATGTCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGTCTTGTTACACACCG CCCGTC
	<i>Veillonella tobetsuensis</i>	>S11-19-357F AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAC GGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTG TTAATCGGGACGAAAGGCCTTCT TGCGAATAGTTAGAAGGATTGAC GGTACCGGAATAGAAAGCCACGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG CGCGCGCAGGCGGATCGGTCAGT CTGTCTTAAAAGTTCGGGGCTTA

			ACCCCGTGAGGGGATGGAACTG CTGATCTAGAGTATCGGAGAGGA AAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGATATTAGGAAG AACACCAGTGGCGAAGGCGACTT TCTGGACGAAAACCTGACGCTGAG GCGCGAAAGCCAGGGGAGCGAAC GGGATTAGATACCCCGGTAGTCC TGGCCGTAAACGATGGGTACTAG GTGTAGGAGGTATCGACCCCTTC TGTGCCGGAGTTAACGCAATAAG TACCCCGCCTGGGGAGTACGACC GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT GGAGTATGTGGTTTAATTCGACG CAACGCGAAGAACCTTACCAGGT CTTGACATTGATGGACAGAACTA GAGATAGTTCCTCTTCTTCGGAA GCCAGAAAACAGGTGGTGCACGG TTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG AGCGCAACCCCTATCTTATGTTG CCAGCACTTCGGGTGGGAACTCA T
	<i>Veillonella parvula</i>		>S14-201 Contig GAGTGATGACGGCCTTCGGGTTG TAAAGCTCTGTTAATCGGGACGA AAGGCCTTCTTGCGAATAGTGAG AAGGATTGACGGTACCGGAATAG AAAGCCACGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG ATAGGTCAGTCTGTCTTAAAAGT TCGGGGCTTAACCCCGTGATGGG ATGGAAACTGCCAATCTAGAGTA TCGGAGAGGAAAGTGGAATTCCT AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATTAGGAAGAACACCAGTGGCG AAGGCGACTTTCTGGACGAAAAC TGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAG GGGAGCGAACGGGATTAGATACC CCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGA TGGGTACTAGGTGTAGGAGGTAT CGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTA ACGCAATAAGTACCCCGCCTGGG GAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG CACAAGCGGTGGAGTATGTGGTT

			TAATTTCGACGCAACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATTGATG GACAGAACCAGAGATGGTTCCTC TTCTTCGGAAGCCAGAAAACAGG TGGTGCACGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA TCTTATGTTGCCAGCACTTTGGG TGGGGACTCATGAGAGACTGCCG CAGACAATGCGGAGGAAGGCGGG GATGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGACCTGGGCTACACACGT ACTACAATGGGAGTTAATAGACG GAAGCGAGATCGCGAGATGGAGC AAACCCGAGAAACACTCTCTCAG TTCGGATCGTAGGCTGCAACTCG CCTACGTGAAGTCGGAATCGCTA GTAATCGCAGGTCAGCATACTGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACACCACG AAAGTCGGAAGTGCCCAAAGCCG GTGGGGTAACCTTC
	<i>Veillonella parvula</i>		>S14-205 Contig GAGTGATGACGGCCTTCGGGTTG TAAAGCTCTGTTAATCGGGACGA AAGGCCTTCTTGCGAATAGTGAG AAGGATTGACGGTACCGGAATAG AAAGCCACGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG ATAGGTCAGTCTGTCTTAAAAGT TCGGGGCTTAACCCCGTGATGGG ATGGAAACTGCCAATCTAGAGTA TCGGAGAGGAAAGTGGAATTCCT AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATTAGGAAGAACACCAGTGGCG AAGGCGACTTTCTGGACGAAAAC TGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAG GGGAGCGAACGGGATTAGATACC CCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGA TGGGTACTAGGTGTAGGAGGTAT CGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTA ACGCAATAAGTACCCCGCCTGGG GAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG CACAAGCGGTGGAGTATGTGGTT TAATTTCGACGCAACGCGAAGAAC

			CTTACCAGGTCTTGACATTGATG GACAGAACCAGAGATGGTTCCTC TTCTTCGGAAGCCAGAAAACAGG TGGTGCACGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA TCTTATGTTGCCAGCACTTTGGG TGGGGACTCATGAGAGACTGCCG CAGACAATGCGGAGGAAGGCGGG GATGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGACCTGGGCTACACACGT ACTACAATGGGAGTTAATAGACG GAAGCGAGATCGCGAGATGGAGC AAACCCGAGAAACACTCTCTCAG TTCGGATCGTAGGCTGCAACTCG CCTACGTGAAGTCGGAATCGCTA GTAATCGCAGGTCAGCATACTGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACACCACG AAAGTCGGAAGTGCCCAAAGCCG GTG
	<i>Veillonella atypica</i> Cepa A	PTA-125709	
	<i>Veillonella atypica</i> Cepa B	PTA-125711	
	<i>Veillonella dispar</i>		
	<i>Veillonella parvula</i> Cepa A	PTA-125691	
	<i>Veillonella parvula</i> Cepa B	PTA-125711	
	<i>Veillonella tobetsuensis</i> Cepa A	PTA-125708	
	<i>Veillonella tobetsuensis</i> Cepa B		
	<i>Lactobacillus salivarius</i> Cepa A		ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA AGAAGGTCTTCGGATCGTAAAC TCTGTTGTTAGAGAAGAACACGA GTGAGAGTAACTGTTTCATTCGAT GACGGTATCTAACCAGCAAGTCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA AAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTA AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGC TTAACCGGAGTAGTGCATTGGAA ACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAG

		AGGAGAGTGGAAGTCCATGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATATG GAAGAACACCAGTGGCGAAAGCG GCTCTCTGGTCTGTAACTGACGC TGAGGTTCGAAAGCGTGGGTAGC AAACAGGATTAGATAACCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAATG CTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCC CTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAA TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGGCCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC AGGTCTTGACATCCTTTGACCAC CTAAGAGATTAGGCTTTCCCTTC GGGGACAAAGTGACAGGTGGTGC ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTGTTGTCA GTTGCCAGCATTAAGTTGGGCAC TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAA ACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG TCAAGTCATCATGCCCCCTTATGA CCTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGACGGTACAACGAGTCGCGAG ACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCT TAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATT GTAGGCTGCAACTCGCCTACATG AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC GAATCAGCATGTGCGGGTGAATA CGTTCCCGGGCCTTGACACACC GCCCCGTCACACCATGAGAGTTTG TAACACCCAAAGCCGGTGGGGTA ACCGCAAGGAGCCAGCCG
	<i>Agathobaculum</i> Cepa A	CCGCGTGATTGAAGAAGGCCTNT CGGGTTGTAAAGATCTTTAATTC GGGACGAAAAATGACGGTACCGA AAGAATAAGCTCCGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGAGCAAGCGTTATCCGGAT TACTGGGTGTAAAGGGCGCGCA GGCGGGCTGGCAAGTTGGAAGTG AAATCTAGGGGCTTAACCCCTAA ACTGCTTTCAAACTGCTGGTCT TGAGTGATGGAGAGGCAGGCGGA ATTCCGTGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATACGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGAC

		ATTAAGTACGCTGAGGCGCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGGATACTAGGTGTGGG AGGTATTGACCCCTTCCGTGCCG CAGTTAACACAATAAGTATCCCA CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT TGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAGCAGTGGAGTAT GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG AAGAACCCTTACCAGGCCTTGACA TCCCGATGACCGGTCTAGAGATA GACCTTCTCTTCGGAGCATCGGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTACGGTTAGTTGATACGCA AGATCACTCTAGCCGGACTGCCG TTGACAAAACGGAGGAAGGTGGG GACGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGGCCTGGGCTACACACGT ACTACAATGGCAGTCATACAGAG GGAAGCAAAGCTGTGAGGCGGAG CAAATCCCTAAAAGCTGTCCCAG TTCAGATTGCAGGCTGCAACCCG CCTGCATGAAGTCGGAATTGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACACCATG AGAGCCGTCAATACCCGAAGTCC GTAGCCTAACCGCAAG
	<i>Paraclostridium</i> <i>benzoelyticum</i> Cepa A	GAATTACTGGGCGTAAAGGGTGC GTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGAA GTGAAAGGCTACGGCTCAACCGT AGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAA CTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTA GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TCGGTAGATATTAGGAGGAATAC CAGTAGCGAAGGCGGCTCTCTGG ACTGTAAGTACACTGAGGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAGTACTAGGTGTC GGGGGTTACCCCCCTCGGTGCCG CAGCTAACGCATTAAGTACTCCG CCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAG TGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGTAGCGGAGCAT GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG

			AAGAACCTTACCTAAGCTTGACA TCCCAGTACCTCTCCCTAATCG GAGATTTCCCTTCGGGGACAGTG GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCTTGCCCTTTAGTTGCCAGC ATTAAGTTGGGCACTCTAGAGGG ACTGCCGAGGATAACTCGGAGGA AGGTGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCCTTATGCTTAGGGCTA CACACGTGCTACAATGGGTGGTA CAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG TGGAGCTAATCCCTTAAAGCCAT TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGA AACTCGCCTACATGAAGCTGGAG TTACTAGTAATCGCAGATCAGAA TGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGAAGTTGGGGGCGCCCG AAGCCGGTTAGCTAACCTTTTAG GAAGCGGCCGT
	<i>Turicibacter sanguinis</i> Ceba A		ATGGCTAGAGTGTGACGGTACCT TATGAGAAAGCCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGAGCGCGC AGGTGGTTGATTAAGTCTGATGT GAAAGCCCACGGCTTAACCGTGG AGGGTCATTGGAACTGGTCAAC TTGAGTGCAGAAGAGGGAAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATATGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGGCTTCCTGGT CTGTAAGTACACTGAGGCGCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGAGTGCTAAGTGTG GGGGTCGAACCTCAGTGCTGAAG TTAACGCATTAAGCACTCCGCCT GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA AACTCAAAGGAATTGACGGGGAC CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG GTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAG AACCTTACCAGGTCTTGACATAC CAGTGACCGTCCTAGAGATAGGA TTTTCCCT TCGGGGACAATGGATACAGGTGG TGCATGGTTGTCTCAGCTCGTG

			TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTGTCG TTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGG GACTCTAACGAGACTGCCAGTGA CAAACCTGGAGGAAGGTGGGGATG ACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGTTGGTACAAAGAGAAGC GAAGCGGTGACGTGGAGCAAACC TCATAAAGCCAATCTCAGTTCGG ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAT CGCGAATCAGCATGTCTCGCGGTGA ATACGTT
	Burkholderia pseudomallei		
	Klebsiella quasipneumonia e subsp. similipneumoni ae		
	Klebsiella oxytoca Cepa A		
	Megasphaera Sp. Cepa A	PTA-126770	TATCAATTCGAGTGGCAAACGGG TGAGTAACGCGTAAGCAACCTGC CCTTCAGATGGGGACAACAGCTG GAAACGGCTGCTAATACCGAATA CGTTCTTTCCGCCGCATGACGGG ATGAAGAAAGGGAGGCCTTCGGG CTTTCGCTGGAGGAGGGGCTTGC GTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGG TAACGGCCCCACCAAGGCGACGAT CAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGA ACGGCCACATTGGGACTGAGACA CGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATCTTCCGCAAT GGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC GCCGCGTGAACGATGACGGCCTT CGGGTTGTAAAGTTCTGTTATAT GGGACGAACAGGATAGCGGTCAA TACCCGTTATCCCTGACGGTACC GTAAGAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG AATTATTGGGCGTAAAGGGCGCG CAGGCGGCATCGCAAGTCGGTCT TAAAAGTGCGGGGCTTAACCCCG TGAGGGGACCGAAACTGTGAAGC

			TCGAGTGTCTGGAGAGGAAAGCGG AATTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACACC AGTGGCGAAAGCGGCTTTCTGGA CGACAACTGACGCTGAGGCGCGA AAGCCAGGGGAGCAAACGGGATT AGATACCCCGGTAGTCCTGGCCG TAAACGATGGATACTAGGTGTAG GAGGTATCGACTCCTTCTGTGCC GGAGTTAACGCAATAAGTATCCC GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG CTGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTA TGTGGTTTAATTCGACGCAACGC GAAGAACCTTACCAAGCCTTGAC ATTGATTGCTACGGAAAGAGATT TCCGGTTCTTCTTCGGAAGACAA GAAAACAGGTGGTGCACGGCTGT CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGT TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCCTATCTTCTGTTGCCAG CACTAAGGGTGGGGACTCAGAAG AGACTGCCGCAGACAATGCGGAG GAAGGCGGGGATGACGTCAAGTC ATCATGCCCCCTTATGGCTTGGGC TACACACGTACTACAATGGCTCT TAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCG ATCCGGAGCAAACCCCAAAAACA GAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGC TGCAACTCGCCTGCATGAAGCAG GAATCGCTAGTAATCGCAGGTCA GCATACTGCGGTGAATACGTTCC CGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACACCACGAAAGTCATTCACAC CCGAAGCCGGTGAGGCAACCGCA AGGAACCAGCCGTCGAAGGTGGG GGCGATGATTGGGGTGAAGTCGT AACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG TGCGGCTGGATCACCTCCTTT
	Megasphaera Sp. Cepa B		ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCA GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTT AACACATGCAAGTCGAACGAGAA GAGATGAGAAGCTTGCTTCTTAT CAATTCGAGTGGCAAACGGGTGA GTAACGCGTAAGCAACCTGCCCT TCAGATGGGGACAACAGCTGGAA ACGGCTGCTAATACCGAATACGT TCTTTCCGCCGCATGACGGGATG

			AAGAAAGGGAGGCCTTCGGGCTT TCGCTGGAGGAGGGGCTTGCGTC TGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAA CGGCCCACCAAGGCGACGATCAG TAGCCGGTCTGAGAGGATGAACG GCCACATTGGGACTGAGACACGG CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTGGGGAATCTTCCGCAATGGA CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC GCGTGAACGATGACGGCCTTCGG GTTGTAAAGTTCTGTTATATGGG ACGAACAGGATAGCGGTCAATAC CCGTTATCCCTGACGGTACCGTA AGAGAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT TATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAG GCGGCATCGCAAGTCGGTCTTAA AAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGA GGGGACCGAAACTGTGAAGCTCG AGTGTCGGAGAGGAAAGCGGAAT TCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATTAGGAGGAACACCAGT GGCGAAAGCGGCTTTCTGGACGA CAACTGACGCTGAGGCGCGAAAG CCAGGGGAGCAAACGGGATTAGA TACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAA ACGATGGATACTAGGTGTAGGAG GTATCGACTCCTTCTGTGCCGGA GTTAACGCAATAAGTATCCCGCC TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGG CCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT GGTTTAATTTCGACGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGCCTTGACATT GATTGCTACGGAAAGAGATTTC GGTTCTTCTTCGGAAGACAAGAA AACAGGTGGTGCACGGCTGTCGT CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCCTATCTTCTGTTGCCAGCAC TAAGGGTGGGGACTCAGAAGAGA CTGCCGCAGACAATGCGGAGGAA GGCGGGGATGACGTCAAGTCATC ATGCCCCTTATGGCTTGGGCTAC ACACGTACTACAATGGCTCTTAA TAGAGGGAAGCGAAGGAGCGATC CGGAGCAAACCCCAAAAACAGAG TCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGC
--	--	--	--

			AACTCGCCTGCATGAAGCAGGAA TCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCA TACTGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCACGAAAGTCATTCACACCCG AAGCCGGTGAGGCAACCGCAAGG AACCAGCCGTCGAAGGTGGGGGC GATGATTGGGGTGAAGTCGTAAC AAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC GGCTGGATCACCTCCTTT
	Selenomonas felix		GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA AGGCGACGATCAGTAGCCGGTCT GAGAGGATGAACGGCCACATTGG GACTGAGACACGGCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT CTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTG ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA AGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGC TCTGTTGACGGGGACGAACGTGC GGAGTGCGAATAGCGCTTTGTAA TGACGGTACCTGTCGAGGAAGCC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGTGGCGAG CGTTGTCCGGAATCATTGGGCGT AAAGGGAGCGCAGGCGGGCCGGT AAGTCTTACTTAAAAGTGCGGGG CTCAACCCCGTGATGGGAGAGAA ACTATCGGTCTTGAGTACAGGAG AGGAAAGCGGAATTCCCAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTGG GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG GCTTTCTGGACTGCAACTGACGC TGAGGCTCGAAAGCCAGGGGAGC GAACGGGATTAGATAACCCGGTA GTCCTGGCCGTAAACGATGGATA CTAGGTGTGGGAGGTATCGACCC CTACCGTGCCGGAGTTAACGCAA TAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGACCCGCACAAG CGGTGGAGTATGTGGTTTAATTC GAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AGGCCTTGACATTGACTGAAAGC ACTAGAGATAGTGCCCTCTCTTC GGAGACAGGAAAACAGGTGGTGC ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCCTGTTCTTT

			GTTGCCATCAGGTAAAGCTGGGC ACTCAAAGGAGACTGCCGCGGAG AACGCGGAGGAAGGCGGGGATGA CGTCAAGTCATCATGCCCCCTTAT GGCCTGGGCTACACACGTACTAC AATGGAACGGACAGAGAGCAGCG AACCCGCGAGGGCAAGCGAACCT CAAAAACCGTTTCCCAGTTCGGA TTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCA TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC GCAGGTCAGCATACTGCGGTGAA TACGTTCCCGGGTCTTGTACACA CCGCCCCTCACACCACGGAAGTC ATTACACCCGAAGCCGGCGCAG CCGTCTAAGGTGGGGAAGGTGAC TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA GCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGG ATCACCTCCTTT
	Enterococcus gallinarum Cepa A		CTGACCGAGCACGCCGCGTGAGT GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAA GGATGAGAGTAAAACGTTTCATCC CTTGACGGTATCTAACCAGAAAG CCACGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTC TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCC GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG AAGAGGAGAGTGGAATTCCATGT GTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG GCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGA CGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG AGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCCGTAAACGATGA GTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCC GCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACG CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG TACGACCGCAAGGTTGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC CACTCTAGAGATAGAGCTTCCCC TTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGG TGCATGGTTGTCTCAGCTCGTG

			TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTG TTAGTTGCCATCATTAGTTGGG CACTCTAGCGAGACTGCCGGTGA CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG ACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGGAAGTACAACGAGTTGC GAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATC TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGG ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC ATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT CGCGGATCAGCACGCCGCGGTGA ATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC ACCGCCCGTCACACCACGAGAGT TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAG GTAACCTTT
	Enterococcus Gallinarum Cepa B		CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCG GATCGTAAACTCTGTTGTTAGA GAAGAACAAGGATGAGAGTAGAA CGTTCATCCCTTGACGGTATCTA ACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA GGGTCATTGGAACTGGGAGACT TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTC TGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAA AGCGTG GGGGAGCGAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAGTGCTAAGTGTG AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTG CAGCAAACGCATTAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGT TGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT GTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCG AAGAACCTTACCAGGTCTTGACA TCCTTTGACCACTCTAGAGATAG AGCTTCCCCCTTCGGGGGCAAAGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA

			CCCTTATTGTTAGTTGCCATCAT T TAGTTGGGCACTCTAGCGAGAC TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG GTGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCCCTTATGACCTGGGCTACA CACGTGCTACAATGGGAAGTACA ACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCT AAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTC TCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA CTCGCCTACATGAAGCCGGAATC GCTAGTAATCGCGGATCAGCACG CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC CTTGTACACACCGCCCGTCACAC CACGAGAGTTTGTAACACCCGAA GTCGGTGAGGTAACCTTTTNGGA GCCAGCCGC
Fournierella massiliensis	PTA-126694		Fournierella massiliensis
Harryflintia acetispora	PTA-126696		Harryflintia acetispora

[201] En algunas realizaciones, las mEV a partir de una o más de las siguientes bacterias:

o *Akkermansia*, *Christensenella*, *Blautia*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* o *Erysipelatoclostridium*

o *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris*, *Blautia wexlerae*, *Eubacterium faecium*, *Eubacterium contortum*, *Eubacterium rectale*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus villorum*, *Enterococcus gallinarum*; *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, o *Bifidobacterium breve*

o *BCG*, *Parabacteroides*, *Blautia*, *Veillonella*, *Lactobacillus salivarius*, *Agathobaculum*, *Ruminococcus*

gnavus, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Turicibacter sanguinus*, *Burkholderia*, *Klebsiella quasipneumoniae* ssp *similpneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Tyzzerella nexilis*, o *Neisseria*

- o *Blautia hydrogenotrophica*
- o *Blautia stercoris*
- o *Blautia wexlerae*
- o *Enterococcus gallinarum*
- o *Enterococcus faecium*
- o *Bifidobacterium bifidum*
- o *Bifidobacterium breve*
- o *Bifidobacterium longum*
- o *Roseburia hominis*
- o *Bacteroides thetaiotaomicron*
- o *Bacteroides coprocola*
- o *Erysipelatoclostridium ramosum*
- o *Megasphaera*, incluida *Megasphaera massiliensis*
- o *Parabacteroides distasonis*
- o *Eubacterium contortum*
- o *Eubacterium hallii*
- o *Intestimonas butyriciproducens*
- o *Streptococcus australis*
- o *Eubacterium eligens*
- o *Faecalibacterium prausnitzii*
- o *Anaerostipes caccae*
- o *Erysipelotrichaceae*
- o *Rikenellaceae*
- o *Lactococcus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*,

Veillonella

- o *Lactococcus lactis cremoris*
- o *Prevotella histicola*
- o *Bifidobacterium animalis lactis*
- o *Veillonella parvula*

[202] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Lactococcus lactis cremoris*, por ejemplo, de una cepa que comprende al menos un 90 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de *Lactococcus lactis cremoris* Cepa A (número de registro de ATCC PTA-125368). En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Lactococcus*, p. ej., de *Lactococcus lactis cremoris* Cepa A (número de registro de ATCC PTA-125368).

[203] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Prevotella*, por ejemplo, de una cepa que comprende al menos un 90 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o de CRISPR con la secuencia de nucleótidos de la cepa de *Prevotella* B 50329 (número de acceso de NRRL B 50329). En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Prevotella*, p. ej., de *Prevotella* Cepa B 50329 (número de acceso de NRRL B 50329).

[204] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium*, p. ej., de una cepa que comprende al menos el 90 % o al menos el 99 % de genómica, 16S y/o de CRISPR de la identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Bifidobacterium* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125097. En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium*, p. ej., de bacterias *Bifidobacterium* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125097.

[205] En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Veillonella*, p. ej., de una cepa que comprende al menos el 90 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia genómica, de 16S y/o CRISPR con la secuencia de nucleótidos de las bacterias *Veillonella* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125691. En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Veillonella*, p. ej., de las bacterias

Veillonella depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125691.

mEV modificadas

[206] En algunos aspectos, las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento se modifican de modo que comprenden, se conectan a, y/o se unen por un resto terapéutico.

[207] En algunas realizaciones, el resto terapéutico es un resto específico del cáncer. En algunas realizaciones, el resto específico del cáncer tiene especificidad de unión para determinar una célula cancerosa (p. ej., tiene especificidad de unión para determinar un antígeno específico del cáncer). En algunas realizaciones, el resto específico del cáncer comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el resto específico del cáncer comprende un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el resto específico del cáncer comprende un ligando para determinar 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 del cáncer es una proteína de fusión bipartita que tiene dos partes: una primera parte que se une a y/o está unida a la bacteria y una segunda parte que puede unirse a una célula cancerosa (p. ej., que tiene especificidad de unión para determinar un antígeno específico del cáncer). En algunas realizaciones, la primera parte es un fragmento o una proteína de reconocimiento de peptidoglucano de longitud completa, tal como PGRP. En algunas realizaciones, la primera parte tiene especificidad de unión por la mEV (p. ej., al tener especificidad de unión por un antígeno bacteriano). En algunas realizaciones, la primera y/o segunda parte comprende un anticuerpo o fragmento

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 para determinar un receptor expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o un fragmento de unión al receptor del mismo. En determinadas realizaciones, la coadministración del resto específico del cáncer con las mEV (o bien en combinación o bien en administraciones individuales) aumenta el direccionamiento de las mEV a las células cancerosas.

[208] En algunas realizaciones, las mEV descritas en el presente documento se modifica de modo que comprenden, se ligan a, y/o se unen por un resto magnético y/o resto paramagnético (p. ej., una perla magnética). En algunas realizaciones, el resto magnético y/o paramagnético está compuesto por y/o unido directamente a las bacterias. En algunas realizaciones, el resto magnético y/o paramagnético se une a y/o una parte de un resto de unión a mEV que se une a la mEV. En algunas realizaciones, el resto de unión a mEV es un fragmento de una proteína de reconocimiento de peptidoglucano de longitud completa, tal como PGRP. En algunas realizaciones el resto de unión a mEV tiene especificidad de unión por la mEV (p. ej., al tener especificidad de unión para determinar un antígeno bacteriano). En algunas realizaciones, el resto de unión a mEV comprende un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el resto de unión a mEV comprende un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el resto de unión a mEV comprende un ligando para determinar un receptor expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o un fragmento de unión al receptor del mismo. En

determinadas realizaciones, la coadministración del resto magnético y/o paramagnético con las mEV (o bien juntos o bien en administraciones independientes) puede usarse para aumentar el direccionamiento de las mEV (p. ej., a las células cancerosas y/o parte de un sujeto donde las células cancerosas están presente).

Producción de vesículas extracelulares microbianas secretadas (smEV)

[209] En ciertos aspectos, las smEV descritas en el presente documento pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica.

[210] En algunas realizaciones, las smEV se preparan sin una etapa de purificación de smEV. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las bacterias descritas en el presente documento se destruyen usando un método que deja las smEV intactas y los componentes bacterianos resultantes, incluidas las smEV, se usan en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, las bacterias se destruyen usando un antibiótico (p. ej., usando un antibiótico descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, las bacterias se destruyen usando irradiación con UV. En algunas realizaciones, las bacterias se destruyen con calor.

[211] En algunas realizaciones, las smEV descritas en el presente documento se purifican de uno o más componentes bacterianos diferentes. Los métodos para purificar las smEV de bacterias se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, las smEV 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) o Jeppesen, *et al.* Cell 177:428 (2019), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas

realizaciones, las bacterias se cultivan en una densidad óptica elevada y luego se centrifugan para sedimentar las bacterias (p. ej., a 10,000 x g durante 30 minutos a 4 °C, a 15,500 x g durante 15 minutos a 4 °C). En algunas realizaciones, los sobrenadantes de cultivo se pasan a continuación a través de filtros para excluir las células bacterianas intactas (p. ej., un filtro de 0.22 µm). En algunas realizaciones, los sobrenadantes luego se someten a una filtración de flujo tangencial, durante la cual se concentra el sobrenadante, se eliminan las especies más pequeñas de 100 kDa y los medios se intercambian parcialmente con PBS. En algunas realizaciones, los sobrenadantes filtrados se centrifugan para sedimentar las smEV bacterianas (p. ej., a 100,000-150,000 x g durante 1-3 horas a 4 °C, a 200,000 x g durante 1-3 horas a 4 °C). En algunas realizaciones, las smEV se purifican, adicionalmente, al resuspender los sedimentos de las smEV resultantes (p. ej., en PBS) y aplicar las smEV resuspendidas a un gradiente de Optiprep (iodixanol) o gradiente (p. ej., un gradiente discontinuo del 30-60 %, un gradiente discontinuo del 0-45 %), seguido de la centrifugación (p. ej., a 200,000 x g durante 4-20 horas a 4 °C). Las bandas de las smEV se pueden recolectar, diluir con PBS y centrifugar hasta sedimentar las smEV (p. ej., a 150,000 x g durante 3 horas a 4 °C, a 200,000 x g durante 1 hora a 4 °C). Las smEV purificadas se pueden almacenar, por ejemplo, a -80 °C o -20 °C hasta su uso. En algunas realizaciones, las smEV se purifican adicionalmente mediante tratamiento con DNasa y/o proteinasa K.

[212] Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cultivos de bacterias se pueden centrifugar a 11,000 x g durante 20-40 minutos a 4 °C para sedimentar las bacterias. Los sobrenadantes de cultivo se pueden pasar a través de un

filtro de 0.22 μm para excluir las células bacterianas intactas. A continuación, los sobrenadantes filtrados pueden concentrarse usando métodos que pueden incluir, pero sin limitación, precipitación de sulfato de amonio, ultracentrifugación o filtración. Por ejemplo, para la precipitación de sulfato de amonio, se puede añadir lentamente sulfato de amonio 1.5-3 M al sobrenadante filtrado lentamente, mientras se agita a 4 °C. Las precipitaciones pueden incubarse a 4 °C durante 8-48 horas y, a continuación, centrifugarse a 11,000 x g durante 20-40 minutos a 4 °C. Los sedimentos resultantes contienen smEV de bacterias y otros residuos. Usando la ultracentrifugación, los sobrenadantes filtrados se pueden centrifugar a 100,000-200,000 x g durante 1-16 horas a 4 °C. El sedimento de esta centrifugación contiene las smEV de bacterias y otros residuos tales como complejos grandes de proteína. En algunas realizaciones, usando una técnica de filtración, tal como a través del uso de un filtro de centrifugación Amicon Ultra o mediante filtración de flujo tangencial, los sobrenadantes se pueden filtrar para retener especies de peso molecular >50 o 100 kDa.

[213] Como alternativa, las smEV se pueden obtener de cultivos de bacterias continuamente durante el crecimiento, o en puntos de tiempo seleccionados durante el crecimiento, p. ej., conectando un biorreactor a un sistema de flujo tangencial alterno (ATF, *Alternating Tangential Flow*) (p. ej., XCell ATF de Repligen). El sistema ATF retiene células intactas (>0.22 μm) en el biorreactor, y permite que componentes más pequeños (p. ej., smEV, proteínas libres) pasen a través de un filtro para su recolección. Por ejemplo, el sistema se puede configurar para que el filtrado <0.22 μm pase a través de un segundo filtro de 100 kDa, lo que permite recolectar especies tales como las smEV de entre 0.22 μm y

100 kDa, y bombear especies de menos de 100 kDa de vuelta al biorreactor. Como alternativa, se puede configurar el sistema para permitir que el medio en el biorreactor se vuelva a llenar y/o modificar durante el crecimiento del cultivo. Las smEV recopiladas mediante este método se pueden purificar y/o concentrar adicionalmente mediante ultracentrifugación o filtración como se ha descrito anteriormente para los sobrenadantes filtrados.

[214] Las smEV obtenidas por los métodos proporcionados en el presente documento pueden purificarse adicionalmente por cromatografía en columna basada en tamaño, por cromatografía de afinidad, mediante cromatografía de intercambio de iones y por ultracentrifugación en gradiente, usando métodos que pueden incluir, entre otros, el uso de un gradiente de sacarosa o un gradiente Optiprep. En resumen, al usar un método de gradiente de sacarosa, si se usara precipitación con sulfato de amonio o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, se vuelven a suspender los sedimentos en sacarosa al 60 %, Tris 30 mM, pH 8.0. Si se usó filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se intercambia en tampón al 60 % de sacarosa, Tris 30 mM, pH 8.0, usando una columna Amicon Ultra. Se aplican las muestras a un gradiente de sacarosa discontinuo del 35-60 % y se centrifugan a 200,000 x g durante 3-24 horas a 4 °C. En resumen, al usar un método de gradiente Optiprep, si se utiliza precipitación o ultracentrifugación de sulfato de amonio para concentrar los sobrenadantes filtrados, se vuelven a suspender los sedimentos en PBS y se agregan 3 volúmenes de Optiprep al 60 % a la muestra. En algunas realizaciones, si se usó una filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se diluye usando Optiprep al 60 % hasta una concentración final de Optiprep

del 35 %. Se aplican las muestras a un gradiente discontinuo al 0-45 % y se centrifugan a 200,000 x g durante 3-24 horas a 4 °C, p. ej., 4-24 horas a 4 °C.

[215] En algunas realizaciones, para confirmar la esterilidad y aislamiento de las preparaciones de smEV, las smEV se diluyen en serie en un medio de agar usado para el cultivo de rutina de las bacterias que se están sometiendo a prueba, y se incuban usando condiciones de rutina. Se hacen pasar preparaciones no estériles a través de un filtro de 0.22 um para excluir células intactas. Para aumentar adicionalmente la pureza, las smEV aisladas pueden tratarse con DNasa o proteinasa K.

[216] En algunas realizaciones, para la preparación de las smEV usadas para las inyecciones *in vivo*, se procesan las smEV purificadas como se ha descrito anteriormente (G. Norheim, et al., *PLoS ONE*. 10(9): e0134353 (2015)). Brevemente, después de la centrifugación en gradiente de sacarosa, las bandas que contienen las smEV se resuspenden a una concentración final de 50 µg/ml en una solución que contiene sacarosa al 3 % u otra solución adecuada para inyección *in vivo* conocida por un experto en la materia. Esta solución también puede contener adyuvante, por ejemplo, hidróxido de aluminio a una concentración del 0-0.5 % (p/v). En algunas realizaciones, para la preparación de las smEV usadas para las inyecciones *in vivo*, las smEV en PBS se filtran de forma estéril hasta <0.22 um.

[217] En determinadas realizaciones, para hacer que las muestras sean compatibles con pruebas adicionales (p. ej., para retirar la sacarosa antes de la obtención de imágenes de TEM [*Transmission Electron Microscopy*, microscopía electrónica de transmisión] o ensayos *in vitro*), las muestras se intercambian con tampón en PBS o Tris 30 mM, pH 8.0 usando filtración (p. ej., columnas Amicon Ultra),

diálisis o ultracentrifugación (200,000 x g, ≥3 horas, 4 °C) y resuspensión.

[218] En algunas realizaciones, la esterilidad de las preparaciones de smEV puede confirmarse colocando en placas una porción de las smEV en medio de agar usado para el cultivo estándar de las bacterias usadas en la generación de las smEV y por incubación usando condiciones estándar.

[219] En algunas realizaciones, las smEV seleccionadas se aíslan y se enriquecen mediante cromatografía y restos de superficie de unión en las smEV. En otras realizaciones, las smEV seleccionadas se aíslan y/o se enriquecen mediante clasificación de células fluorescentes mediante métodos que usan reactivos de afinidad, colorantes químicos, proteínas recombinantes u otros métodos conocidos por un experto en la técnica.

[220] Las smEV pueden analizarse, por ejemplo, como se describe en Jeppesen, *et al.* Cell 177:428 (2019).

[221] En algunas realizaciones, se liofilizan las smEV.

[222] En algunas realizaciones, las smEV se irradian con rayos gamma (p. ej., a 17.5 o 25 kGy).

[223] En algunas realizaciones, las smEV se irradian con UV.

[224] En algunas realizaciones, las smEV se inactivan con calor (p. ej., a 50 °C durante dos horas o a 90 °C durante dos horas).

[225] En algunas realizaciones, las smEV se tratan con ácido.

[226] En algunas realizaciones, las smEV se rocían con oxígeno (p. ej., a 0.1 vvm durante dos horas).

[227] La fase de crecimiento puede afectar a la cantidad o las propiedades de las bacterias y/o smEV producidas por bacterias. Por ejemplo, en los métodos de

preparación de smEV proporcionados en el presente documento, pueden aislarse las smEV, por ejemplo, a partir de un cultivo, al inicio de la fase logarítmica del crecimiento, a mitad de la fase de registro, y/o una vez que se ha alcanzado el crecimiento de la fase estacionaria.

[228] El entorno de crecimiento (p. ej., condiciones de cultivo) pueden afectar la cantidad de las smEV producidas por bacterias. Por ejemplo, el rendimiento de las smEV se puede aumentar mediante un inductor de smEV, como se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4: Técnicas de cultivo para aumentar la producción de las smEV

Inducción de smEV	Inductor de smEV	Actúa en
Temperatura		
	Calor Cambio de temperatura de TA hasta 37 °C	Respuesta al estrés Simula una infección
	Cambio de temperatura de 37 °C a 40 °C	Infección febril
ROS		
	Plumbagina Hidroperóxido de cumeno Peróxido de hidrógeno	Respuesta al estrés oxidativo Respuesta al estrés oxidativo Respuesta al estrés oxidativo
Antibióticos		
	Ciprofloxacino Gentamicina Polimixina B D-cilcloserina	Respuesta SOS bacteriana Síntesis de proteínas Membrana externa Pared celular

Osmolito		
	NaCl	Estrés osmótico
Estrés de iones metálicos		
	Quelación de hierro EDTA Hemina baja	Niveles de hierro Elimina cationes divalentes Niveles de hierro
Aditivos o eliminación de medios		
Otros mecanismos	Lactato Falta de aminoácidos Hexadecano Glucosa Bicarbonato de sodio PQS Diaminas + DFMO Nutrientes elevados Nutrientes bajos Oxígeno Sin cisteína Inducción de biopelícula o floculación Crecimiento diaúxico Fago Urea	Crecimiento Estrés Estrés Crecimiento Inducción de ToxT Vesiculador (a partir de bacterias) Anclaje de membranas (solamente <i>Negativicutes</i>) Crecimiento potenciado Estrés de oxígeno en anaerobios Estrés de oxígeno en anaerobios

[229] En los métodos de la preparación de smEV proporcionada en el presente documento, el método puede incluir, opcionalmente, la exposición de un cultivo de

bacterias a un inductor de smEV antes de aislar las smEV del cultivo bacteriano. El cultivo de las bacterias se puede exponer a un inductor de smEV al inicio de la fase logarítmica del crecimiento, a mitad de la fase logarítmica y/o una vez que se ha alcanzado el crecimiento de la fase estacionaria.

Composiciones farmacéuticas

[230] En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden las mEV (tales como smEV) (p. ej., una composición de mEV (p. ej., una composición de smEV)). En algunas realizaciones, la composición de mEV comprende mEV (tales como smEV) y/o una combinación de las mEV (tales como smEV) descritas en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición de smEV comprende una smEV y/o una combinación de smEV descritas en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

[231] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden las mEV (tales como smEV) sustancial o completamente libres de bacterias completas (p. ej., bacterias vivas, bacterias destruidas, bacterias atenuadas). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tanto smEV como bacterias enteras (p. ej., bacterias vivas, bacterias muertas, bacterias atenuadas). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden smEV de una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) de las cepas bacterianas o especies listadas en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden MP y/o bacterias a partir de una de las cepas bacterianas o especies listadas en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3. En algunas realizaciones, la composición

farmacéutica comprende mEV liofilizadas (tales como smEV). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV irradiadas con rayos gamma (tales como smEV). Las mEV (tales como smEV) pueden ser irradiadas con rayos gamma después de que se aislen las mEV (p. ej., se preparen).

[232] En algunas realizaciones, para cuantificar las cantidades de las mEV (tales como smEV) y/o bacterias presentes en una muestra bacteriana, se puede usar la microscopía electrónica (p. ej., EM de secciones ultrafinas congeladas) para visualizar las mEV (tales como smEV) y/o bacterias y contar sus números relativos. Como alternativa, se pueden usar el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), el recuento de Coulter o la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) 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 frecuentemente tienen diámetros de 1-2 μm (micrómetros). El intervalo completo es de 0.2-20 μm . Los resultados combinados del recuento de Coulter y NTA pueden revelar el número de bacterias y/o mEV (tales como smEV) en una muestra dada. El recuento con Coulter revela el número de partículas con diámetros de 0.7-10 μm . Para la mayoría de las muestras bacterianas y/o mEV (tales como smEV), el recuento de Coulter solo puede revelar la cantidad de bacterias y/o mEV (tales como smEV) en una muestra. Para NTA, se puede obtener un instrumento Nanosight de Malvern Pananalytical. Por ejemplo, el NS300 puede visualizar y medir las partículas en suspensión en el rango del tamaño 10-2000 nm. La NTA nos permite contar el número de partículas que tiene, por ejemplo, un diámetro de 50-1000 nm. La DLS revela la distribución de partículas de

diferentes diámetros dentro de un intervalo aproximado de 1 nm - 3 μ m.

[233] Las mEV pueden caracterizarse mediante métodos analíticos conocidos en la técnica (p. ej., Jeppesen, *et al.* Cell 177:428 (2019)).

[234] En algunas realizaciones, las mEV se pueden cuantificar según el recuento de partículas. Por ejemplo, el contenido de proteínas totales de una preparación de mEV se puede medir usando NTA.

[235] En algunas realizaciones, las mEV se puede cuantificar según la cantidad de proteína, lípido o carbohidrato. Por ejemplo, el contenido de proteínas totales de una preparación de mEV se puede medir usando el ensayo de Bradford.

[236] En algunas realizaciones, las mEV se aíslan de uno o más componentes bacterianos adicionales de las bacterias fuente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además otros componentes bacterianos.

[237] En determinadas realizaciones, la preparación de mEV obtenida de las bacterias fuente se pueden fraccionar en subpoblaciones basadas en las propiedades físicas (p. ej., tamaño, densidad, contenido proteína, afinidad de unión) de las subpoblaciones. Una o más de las subpoblaciones de mEV se pueden incorporar posteriormente en las composiciones farmacéuticas de la invención.

[238] En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden las mEV (tales como smEV) útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades (p. ej., un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad metabólica), así como los métodos para crear y/o identificar dichas mEV y métodos para usar dichas composiciones farmacéuticas (p. ej., para el

tratamiento de un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad metabólica, ya sea solo o en combinación con otra terapéutica). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden las dos mEV (tales como smEV) y las bacterias completas (p. ej., bacterias vivas, bacterias destruidas, bacterias atenuadas). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden mEV (tales como smEV) en la ausencia de bacterias. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden mEV (tales como smEV) a partir de una o más de las cepas bacterianas o especies listadas en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden mEV (tales como smEV) a partir de una de las cepas bacterianas o especies listadas en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3.

[239] En determinados aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas para su administración a un sujeto (p. ej., sujeto humano). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se combinan con materiales activos y/o inactivos adicionales con el fin de producir un producto final, que puede estar en una unidad de dosis única o en un formato multidosis. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se combina con un adyuvante tal como un inmunoadyuvante (p. ej., un agonista de STING, un agonista de TLR o un agonista de NOD).

[240] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un hidrato de carbono.

[241] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un lípido. En algunas realizaciones el lípido comprende al menos un ácido graso seleccionado de 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).

[242] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un suplemento mineral o fuente mineral. Los ejemplos de minerales incluyen, sin limitación: cloruro, sodio, calcio, hierro, cromo, cobre, yodo, zinc, magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio y selenio. Las formas adecuadas de cualquiera de los minerales anteriores incluyen sales minerales solubles, sales minerales ligeramente solubles, sales minerales insolubles, minerales quelados, complejos minerales, minerales no reactivos tales como minerales carbonilo, minerales reducidos y combinaciones de los mismos.

[243] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un suplemento vitamínico. La al menos una vitamina puede ser vitaminas solubles en grasa o solubles en agua. Las vitaminas adecuadas incluyen, pero sin limitación, vitamina C, vitamina A, vitamina E, vitamina B12, vitamina K, riboflavina, niacina, vitamina D, vitamina B6, ácido fólico, piridoxina, tiamina, ácido pantoténico y biotina. Las formas adecuadas de cualquiera de los anteriores son sales de la vitamina, derivados de la vitamina, compuestos que tienen la misma actividad o similar a la de la vitamina y metabolitos de la vitamina.

[244] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un excipiente. Los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados incluyen un agente

tampón, un conservante, un estabilizador, un aglutinante, un agente de compactación, un lubricante, un potenciador de la dispersión, un agente de disgregación, un agente aromatizante, un edulcorante y un agente colorante.

[245] En algunas realizaciones, el excipiente es un agente tampón. Los ejemplos no limitantes de agentes tampón adecuados incluyen citrato de sodio, carbonato de magnesio, bicarbonato de magnesio, carbonato de calcio y bicarbonato de calcio.

[246] En algunas realizaciones, el excipiente comprende un conservante. Los ejemplos no limitantes de conservantes adecuados incluyen antioxidantes, tales como alfa-tocoferol y ascorbato, y antimicrobianos, tales como parabenos, clorobutanol, y fenol.

[247] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un aglutinante como un excipiente. Los ejemplos no limitantes de aglutinantes adecuados incluyen almidones, almidones pregelatinizados, gelatina, polivinilpirrolidona, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, poliacrilamidas, poliviniloxoazolidona, poli(alcoholes vinílicos), alcohol de ácido graso C₁₂-C₁₈, polietilenglicol, polioles, sacáridos, oligosacáridos, y combinaciones de los mismos.

[248] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un lubricante como un excipiente. Los ejemplos no limitantes de lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, aceites vegetales hidrogenados, esterotex, monoestearato de polioxietileno, talco, polietilenglicol, benzoato de sodio, laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio y aceite mineral ligero.

[249] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un potenciador de dispersión como un

excipiente. Los ejemplos no limitantes de dispersantes adecuados incluyen almidón, ácido algínico, polivinilpirrolidonas, goma guar, caolín, bentonita, celulosa de madera purificada, almidón glicolato de sodio, silicato isoamorfo y celulosa microcristalina como tensioactivos emulsionantes con alto contenido de HLB.

[250] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un disgregante como un excipiente. En algunas realizaciones, el disgregante es un disgregante no efervescente. Los ejemplos no limitantes de disgregantes no efervescentes adecuados incluyen almidones tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidones pregelatinizados y modificados de los mismos, edulcorantes, arcillas, como bentonita, celulosa microcristalina, alginatos, almidón glicolato de sodio, gomas como agar, guar, algarroba, karaya, pectina y tragacanto. En algunas realizaciones el disgregante es un disgregante efervescente. Los ejemplos no limitantes de disgregantes efervescentes adecuados incluyen bicarbonato de sodio en combinación con ácido cítrico, y bicarbonato de sodio en combinación con ácido tartárico.

[251] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un producto alimenticio (p. ej., un alimento o bebida) tal como un alimento saludable o bebida, un alimento o bebida para bebés, un alimento o bebida para mujeres embarazadas, atletas, personas mayores u otro grupo específico, un alimento funcional, una bebida, un alimento o bebida para uso específico de salud, un suplemento dietético, un alimento o bebida para pacientes, o un alimento para animales. Los ejemplos específicos de los alimentos y bebidas incluyen diversas bebidas tales como zumos, bebidas refrescantes, bebidas de té, preparaciones de bebidas, bebidas de gelatina y bebidas funcionales; bebidas

alcohólicas tales como cervezas; alimentos que contienen carbohidratos tales como productos alimenticios de arroz, fideos, panes y pastas; productos de pasta tales como jamones de pescado, salchichas, productos de pasta de mariscos; productos de bolsa de retorta tales como curry, alimento condimentado con espesas salsas almidonadas y sopas chinas; sopas; productos lácteos tales como leche, bebidas lácteas, helados, quesos y yogures; productos fermentados tales como pastas de soja fermentadas, yogures, bebidas fermentadas y encurtidos; productos de frijol; diversos productos de confitería, incluyendo galletas y similares, caramelos, gomas de mascar, gominolas, postres fríos, incluyendo gelatinas, caramelos de crema y postres congelados; comidas instantáneas como sopas instantáneas y sopas instantáneas de soja; alimentos para microondas; y similares. Además, los ejemplos también incluyen alimentos y bebidas saludables preparados en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, líquidos, pastas y jaleas.

[252] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un producto alimenticio para animales, incluidos seres humanos. Los animales, además de los seres humanos, no se limitan particularmente, y la composición puede usarse para diversos ganados, aves de corral, mascotas, animales de experimentación, y similares. Los ejemplos específicos de animales incluyen cerdos, vacas, caballos, ovejas, cabras, gallinas, patos salvajes, avestruces, patos domésticos, perros, gatos, conejos, hámsteres, ratones, ratas, monos, etc., pero los animales no se limitan a los mismos.

Formas farmacéuticas

[253] Una composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) se puede formular como una forma farmacéutica sólida, p. ej., para la administración oral. La

forma farmacéutica sólida puede comprender uno o más excipientes, por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables. Las mEV en la forma farmacéutica sólida pueden ser mEV aisladas. Opcionalmente, las mEV en la forma farmacéutica sólida pueden estar liofilizadas. Opcionalmente, las mEV en la forma farmacéutica sólida se irradian con rayos gamma. La forma farmacéutica sólida puede comprender un comprimido, un minicomprimido, una cápsula, una píldora o un polvo; o una combinación de estas formas (p. ej., minicomprimidos comprendidos en una cápsula).

[254] La forma farmacéutica sólida puede comprender un comprimido (p. ej., >4 mm).

[255] La forma farmacéutica sólida puede comprender un mini comprimido (p. ej., minicomprimido del tamaño de 1-4 mm, p. ej., un minicomprimido de 2 mm o un minicomprimido de 3 mm).

[256] La forma farmacéutica sólida puede comprender una cápsula, p. ej., una cápsula de tamaño 00, tamaño 0, tamaño 1, tamaño 2, tamaño 3, tamaño 4 o tamaño 5; p. ej., una cápsula de tamaño 0.

[257] La forma farmacéutica sólida puede comprender un recubrimiento. La forma farmacéutica sólida puede comprender un recubrimiento de una sola capa, por ejemplo, recubrimiento entérico, por ejemplo, un recubrimiento basado en Eudragit, por ejemplo, EUDRAGIT L30 D-55, trietilcitrato y talco. La forma farmacéutica sólida puede comprender dos capas de recubrimiento. Por ejemplo, un recubrimiento interno puede comprender, por ejemplo, EUDRAGIT L30 D-55, trietilcitrato, talco, ácido cítrico anhidro e hidróxido de sodio y un recubrimiento externo puede comprender, por ejemplo, EUDRAGIT L30 D-55, trietilcitrato y talco. EUDRAGIT es la denominación comercial de una diversa gama de copolímeros a base de polimetacrilato. Incluye copolímeros

aniónicos, catiónicos y neutros basados en ácido metacrílico y ésteres metacrílicos/acrílicos o sus derivados. Los Eudragit son polímeros amorfos que tienen temperaturas de transición vítrea de entre 9 hasta $>150^{\circ}\text{C}$. Los Eudragit son no biodegradables, no absorbibles y no tóxicos. Eudragit L aniónico se disuelve en un $\text{pH} > 6$ y se usa para el recubrimiento entérico, mientras que Eudragit S, soluble a $\text{pH} > 7$ se usa para el direccionamiento al colon. Eudragit RL y RS, que tienen grupos de amonio cuaternarios, no son solubles en agua, pero los polímeros hinchables/permeables que son adecuados para las aplicaciones de recubrimiento pelicular de liberación sostenida. Eudragit E catiónico, insoluble a $\text{pH} \geq 5$, puede prevenir la liberación del fármaco en la saliva.

[258] La forma farmacéutica sólida (p. ej., una cápsula) puede comprender un recubrimiento de una sola capa, por ejemplo, un recubrimiento no entérico tal como HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) o gelatina.

[259] Una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) se puede formular como una suspensión, p. ej., para la administración oral o para inyección. La administración mediante inyección incluye administración intravenosa (IV), intramuscular (IM), intratumoral (IT) y subcutánea (SC). Para una suspensión, las mEV pueden encontrarse en un tampón, p. ej., un tampón farmacéuticamente aceptable, p. ej., solución salina o PBS. La suspensión puede comprender uno o más excipientes, por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables. La suspensión puede comprender, por ejemplo, sacarosa o glucosa. Las mEV en la suspensión pueden ser mEV aisladas. Opcionalmente, las mEV en la suspensión se pueden liofilizar. Opcionalmente, las mEV en la suspensión pueden irradiarse con rayos gamma.

Dosificación

[260] Para la administración oral a un sujeto humano, las dosis de mEV (tales como smEV) pueden ser, p. ej., de aproximadamente 2×10^6 a aproximadamente 2×10^{16} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{15} , de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{14} , de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{13} , de aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{14} o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 2×10^7 , aproximadamente 2×10^8 , aproximadamente 2×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 2×10^{10} , aproximadamente 2×10^{11} , aproximadamente 2×10^{12} , aproximadamente 2×10^{13} , aproximadamente 2×10^{14} o aproximadamente 1×10^{15} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^{14} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^{12} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^{10} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{10} partículas. Se puede determinar el recuento de partículas, por ejemplo, mediante NTA.

[261] Para la administración oral a un sujeto humano, las dosis de mEV (tales como smEV) pueden basarse, p. ej., en el contenido total de proteínas. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 900 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 75 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 750 mg o de

aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg o aproximadamente 750 mg de proteínas totales. Se pueden determinar las proteínas totales, p. ej., mediante un ensayo de Bradford.

[262] Para la administración mediante inyección (p. ej., administración intravenosa) a un sujeto humano, las dosis de mEV (tales como smEV) pueden ser, p. ej., de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{16} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{15} , de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{14} , de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{13} , de aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{14} o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 2×10^7 , aproximadamente 2×10^8 , aproximadamente 2×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 2×10^{10} , aproximadamente 2×10^{11} , aproximadamente 2×10^{12} , aproximadamente 2×10^{13} , aproximadamente 2×10^{14} o aproximadamente 1×10^{15} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{15} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^{14} partículas. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2×10^{13} partículas. Se puede determinar el recuento de partículas, por ejemplo, mediante NTA.

[263] Para la administración mediante inyección (p. ej., administración intravenosa), las dosis de mEV

(tales como smEV) pueden ser, p. ej., de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 900 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 75 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 750 mg o de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg o aproximadamente 750 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 700 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 350 mg de proteínas totales. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 175 mg de proteínas totales. Se pueden determinar las proteínas totales, p. ej., mediante un ensayo de Bradford.

Irradiación con radiación gamma

[264] Los polvos (p. ej., de mEV (tales como smEV)) se pueden irradiar con radiación gamma en una unidad de radiación de 17.5 kGy a temperatura ambiente.

[265] Las biomasas congeladas (p. ej., de las mEV (tales como smEV)) se pueden irradiar con gamma en una unidad de 25 kGy en la presencia de nieve carbónica.

Agentes terapéuticos adicionales

[266] En determinados aspectos, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración a un sujeto de una composición farmacéutica

descrita en el presente documento sola o en combinación con un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un esteroide y/o un agente terapéutico contra el cáncer.

[267] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) se administra al sujeto antes de que se administre el agente terapéutico adicional (p. ej., 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 composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) se administra al sujeto después de que se administra el agente terapéutico adicional (p. ej., 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 composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) y el agente terapéutico adicional se administran al sujeto de forma simultánea o casi simultánea (p. ej., las administraciones ocurren en el plazo de una hora entre sí).

[268] En algunas realizaciones, se administra un antibiótico al sujeto antes de que se administre la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) al sujeto (p. ej., 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, se

administra un antibiótico al sujeto después de que se administra la composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) al sujeto (p. ej., 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 composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) y el antibiótico se administran al sujeto de forma simultánea o casi simultánea (p. ej., las administraciones ocurren en el plazo de una hora entre sí).

[269] En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente terapéutico contra el cáncer. En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un agente quimioterápico. Los ejemplos de tales agentes quimioterápicos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de

mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina omegall y calicheamicina omegall; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteínas, aclacinomisin, actinomicina, autrarnicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicin, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido

aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; triclotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; 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; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (por ejemplo., CPT-11); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquier de los anteriores.

[270] En algunas realizaciones, el producto terapéutico contra el cáncer es un agente de inmunoterapia contra el cáncer. La inmunoterapia se refiere a un tratamiento que usa el sistema inmunitario de un sujeto para tratar el cáncer, por ejemplo, inhibidores del punto de control, vacunas contra el cáncer, citocinas, terapia celular, células CAR-T y terapia de células dendríticas. Los

ejemplos no limitantes 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 vacunas tumorales, tales como Gardasil, Cervarix, BCG, sipulencel-T, Gp100:209-217, AGS-003, DCVax-L, Algenpantucel-L, Tergenpantucel-L, TG4010, ProstAtak, Prostavac-V/R-TRICOM, Rindopepimul, acetato de péptido E75, IMA901, POL-103A, Belagenpumatucel-L, GSK1572932A, MDX-1279, GV1001, y Tecemotida. El agente de inmunoterapia puede administrarse a través de inyección (p. ej., por vía intravenosa, por vía intratumoral, por vía subcutánea, o en ganglios linfáticos), pero también puede administrarse por vía oral, por vía tópica o por aerosol. Las inmunoterapias pueden comprender adyuvantes tales como citocinas.

[271] En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es un inhibidor del punto de control inmunitario. La inhibición del punto de control inmunitario se refiere, en general, a la inhibición de los puntos de control que las células cancerosas pueden producir para prevenir o disminuir la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de proteínas de punto de control inmunitario incluyen, pero sin limitación, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, KIR, LAG3, TIM-3 o VISTA. Los inhibidores de puntos de control inmunitarios pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen e inhiben una proteína de punto de control inmunitario. Los ejemplos de inhibidores de puntos de control inmunitarios incluyen, pero sin limitación, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, STI-A1110, TSR-042, RG-7446, BMS-936559, MEDI-4736, MSB-0010718C (avelumab), AUR-012 y STI-A1010.

[272] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento incluyen la administración de dos agentes de inmunoterapia (p. ej., 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 en combinación con un inhibidor de PD-1 (tales como pembrolizumab o nivolumab o pidilizumab) o un inhibidor de CLTA-4 (tal como ipilimumab) o un inhibidor de PD-L1 (tal como avelumab).

[273] En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que, por ejemplo, se une a un antígeno asociado al cáncer. Los ejemplos de antígenos asociados al cáncer incluyen, pero sin limitación, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinin-4, alfa-fetoproteína ("AFP"), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), BCR-ABL proteína de fusión b3a2, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno carcinoembrionario ("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 elongación 2, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antígeno tumoral epitelial ("ETA"), ETV6-AML1 proteína de fusión, 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, carboxil esterasa intestinal, K-ras, Calicreína 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 también conocido

como CCDC110, LAGE-1, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasa AS, 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, Midkina, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina, Miosina clase I, N-crudo, 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, 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, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triosafosfato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirosinasal, tirosinasa ("TYR"), VEGF, WT1 y XAGE-1b/GAGED2a. En algunas realizaciones, el antígeno es un neoantígeno.

[274] En algunas realizaciones, el agente inmunoterapéutico es una vacuna contra el cáncer y/o un componente de una vacuna contra el cáncer (p. ej., un péptido antigénico y/o proteína). La vacuna contra el cáncer puede ser una vacuna de proteína, una vacuna de ácido nucleico o una combinación de las mismas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la vacuna contra el cáncer comprende un polipéptido que comprende un epítipo de un antígeno asociado al cáncer. En algunas realizaciones, la vacuna contra el 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, pero sin limitación, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinin-4, alfa-fetoproteína ("AFP"), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), BCR-ABL proteína de fusión b3a2,

beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno
 carcinoembrionario ("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 elongación 2, ENAH (hMena),
 Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antígeno tumoral epitelial ("ETA"),
 ETV6-AML1 proteína de fusión, 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, carboxil esterasa intestinal, K-ras, Calicreína
 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 también conocido
 como CCDC110, LAGE-1, proteína de fusión LDLR-
 fucosiltransferasa AS, 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, Midkina, MMP-
 2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina,
 Miosina clase I, N-crudo, 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, 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, proteína de fusión SYT-SSX1
 o -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-
 3, Triosafosfato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2,
 tirosinasal, tirosinasa ("TYR"), VEGF, WT1 y XAGE-
 1b/GAGED2a. En algunas realizaciones, el antígeno es un
 neoantígeno. En algunas realizaciones, la vacuna contra el
 cáncer se administra con un adyuvante. Los ejemplos de
 adyuvantes incluyen, pero sin limitación, una proteína
 inmunomoduladora, adyuvante 65, α -GalCer, fosfato de

aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, péptido de β -Glucano, CpG ODN ADN, GPI-0100, lípido A, lipopolisacárido, lipovant, montanida, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, Pam3CSK4, quil A, toxina del cólera (CT) y toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) enterotoxigénica incluyendo derivados de estos (CTB, mmCT, CTA1-DD, LTB, LTK63, LTR72, dmlT) y trehalosa dimicolato.

[275] En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es una proteína inmunomoduladora al sujeto. En algunas realizaciones, la proteína inmunomoduladora es una citocina o quimiocina. Los ejemplos de las proteínas moduladores inmunitarias incluyen, pero sin limitación, quimioatrayentes para los linfocitos B ("BLC"), quimiocina con motivo C-C 11 ("Eotaxina-1"), proteína quimiotáctica de eosinófilos 2 ("Eotaxina-2"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), 1-309, molécula de adhesión intercelular 1 ("ICAM-1"), Interferón alfa ("IFN-alfa"), Interferón beta ("IFN-beta") Interferón gamma ("IFN-gamma"), Interleucina-1 alfa ("IL-1 alfa"), Interleucina-1 beta ("IL-1 beta"), antagonista del receptor Interleucina 1 ("IL-1 ra"), Interleucina-2 ("IL-2"), Interleucina-4 ("IL-4"), Interleucina-5 ("IL-5"), Interleucina-6 ("IL-6"), receptor soluble de Interleucina-6 ("IL-6 sR"), Interleucina-7 ("IL-7"), Interleucina-8 ("IL-8"), Interleucina- 10 ("IL-10"), Interleucina- 11 ("IL-11"), Subunidad beta de Interleucina- 12 ("IL-12 p40" o "IL-12 p70"), Interleucina-13 ("IL-13"), Interleucina-15 ("IL-15"), Interleucina-16 ("IL-16"), Interleucina-17A-F ("IL-17A-F"), Interleucina-18 ("IL-18"), Interleucina-21 ("IL-21"), Interleucina-22 ("IL-22"), Interleucina-23 ("IL-23"), Interleucina-33 ("IL-33"), quimiocina (motivo C-C) Ligando 2 ("MCP-1"), factor estimulante de colonias de macrófagos

("M-CSF"), Monocina inducida por gamma Interferón ("MIG"), quimiocina (motivo C-C) ligando 2 ("MIP-1 alfa"), quimiocina (motivo C-C) ligando 4 ("MIP-1 beta"), proteína inflamatoria de macrófago- 1 -delta ("MIP-1 delta"), factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B ("PDGF-BB"), quimiocina (motivo C-C) ligando 5, Regulado en la Activación, Linfocito T normal expresado y secretado ("RANTES"), inhibidor de TIMP metalopeptidasa 1 ("TIMP-1"), inhibidor de TIMP metalopeptidasa 2 ("TIMP-2"), factor de necrosis tumoral, linfo toxina-alfa ("TNF alfa"), factor de necrosis tumoral, linfo toxina-beta ("TNF beta"),receptor soluble de TNF tipo 1 ("sTNFR1"), sTNFR1AR, factor neurotrófico derivado del cerebro ("BDNF"), factor de crecimiento de fibroblastos básicos ("bFGF"), proteína morfogenética ósea 4 ("BMP-4"), proteína morfogenética ósea 5 ("BMP-5"), proteína morfogenética ósea 7 ("BMP-7"), factor de crecimiento del nervio ("b-NGF"), factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), receptor del factor de crecimiento epidérmico ("EGFR"), factor de crecimiento endotelial vascular derivado de la glándula endócrina ("EG-VEGF"), factor de crecimiento de fibroblastos 4 ("FGF-4"), factor de crecimiento de queratinocito ("FGF-7"), factor de diferenciación de crecimiento 15 ("GDF-15"), factor neurotrófico derivado de la célula glial ("GDNF"), Hormona de crecimiento, factor de crecimiento similar a EGF de unión a la heparina ("HB-EGF"), factor de crecimiento de hepatocitos ("HGF"), proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 1 ("IGFBP-1"), proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 2 ("IGFBP-2"), proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 3 ("IGFBP-3"), proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 4 ("IGFBP-4"), proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 6 ("IGFBP-6"), factor de

crecimiento similar a la insulina1 ("IGF-1"), Insulina, factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF R"), receptor del factor de crecimiento nervioso ("NGF R"), Neurotrofina-3 ("NT-3"), Neurotrofina-4 ("NT-4"), factor inhibidor de osteoclastogenesis ("Osteoprotegerina"), receptores del factor de crecimiento derivados de plaquetas ("PDGF-AA"), biosíntesis de glucano de fosfatidilinositol ("PIGF"), complejo que contiene Skp, Cullin, F-box ("SCF"), receptor del factor de células madre ("SCF R"), factor de crecimiento transformante alfa ("TGFalpha"), factor de crecimiento transformante beta-1 ("TGF beta 1"), factor de crecimiento transformante beta-3 ("TGF beta 3"), factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 ("VEGFR2"), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3 ("VEGFR3"), VEGF-D 6Ckine, receptor de la cinasa de la proteína tirosina UFO ("Axl"), Betacelulina ("BTC"), quimiocina epitelial asociada con la mucosa ("CCL28"), quimiocina (motivo C-C) ligando 27 ("CTACK"), quimiocina (motivo C-X-C) ligando 16 ("CXCL16"), quimiocina de motivo C-X-C 5 ("ENA-78"), quimiocina (motivo C-C) ligando 26 ("Eotaxin-3"), quimiotáctica de la proteína de granulocitos 2 ("GCP-2"), GRO, quimiocina (motivo C-C) ligando 14 ("HCC-1"), quimiocina (motivo C-C) ligando 16 ("HCC-4"), Interleucina-9 ("IL-9"), Interleucina-17 F ("IL-17F"), proteína de unión de Interleucina-18-("IL-18 BPa"), Interleucina-28 A ("IL-28A"), Interleucina 29 ("IL-29"), Interleucina 31 ("IL-31"), quimiocina 10 de motivo C-X-C ("IP-10"), receptor de quimiocina CXCR3 ("I-TAC"), factor inhibidor de leucemia ("LIF"), Light, quimiocina (motivo C) ligando ("Lymphotactin"), proteína quimioatrayente de monocitos 2 ("MCP-2"), proteína quimioatrayente de monocitos 3 ("MCP-3"), proteína quimioatrayente de monocitos 4 ("MCP-

4"), quimiocina derivada de macrófagos ("MDC"), factor inhibidor de migración de macrófagos ("MIF"), quimiocina (motivo C-C) ligando 20 ("MIP-3 alfa"), quimiocina con motivo C-C 19 ("MIP-3 beta"), quimiocina (motivo C-C) ligando 23 ("MPIF-1"), cadena de la proteína estimulante de macrófago alfa ("MSPalpha"), proteína de ensamblaje de nucleosoma 1-similar 4 ("NAP-2"), fosfoproteína secretada 1 ("Osteopontin"), citocina reglada por la activación y pulmonar ("PARC"), factor de plaquetas 4 ("PF4"), factor-1 alfa derivado de la célula estroma ("SDF-1 alfa"), quimiocina (motivo C-C) ligando 17 ("TARC"), quimiocina expresada en el timo ("TECK"), linfopoyetina estromal tímica ("TSLP 4-IBB"), antígeno CD 166 ("ALCAM"), Grupo de diferenciación 80 ("B7-1"), fsuperfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral miembro 17 ("BCMA"), Grupo de diferenciación 14 ("CD14"), Grupo de diferenciación 30 ("CD30"), Grupo de diferenciación 40 ("CD40 ligando"), molécula de adhesión a la célula relacionada con el antígeno carcinoembrónico 1 (glucoproteína biliar) ("CEACAM-1"), Receptor de muerte 6 ("DR6"), cinasa desoxitimidina ("Dtk"), glucoproteína de la membrana de tipo 1 ("Endoglin"), cinasa de la proteína tirosina receptora erbB-3 ("ErbB3"), molécula de adhesión del leucocito endotelial 1 ("E-Selectin"), antígeno de apoptosis 1 ("Fas"), cinasa tirosina similar a Fms 3 ("Flt-3L"), superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral miembro 1 ("GITR"), superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral miembro 14 ("HVEM"), molécula de adhesión intercelular 3 ("ICAM-3"), IL-1 R4, IL-1 RI, IL-10 Rbeta, IL-17R, IL-2Rgamma, IL-21R, proteína de la membrana del lisosoma 2 ("LIMPII"), lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo ("Lipocalin-2"), CD62L ("L-Selectina"), endotelio linfático ("LYVE-1"), secuencia relacionada con el polipéptido de MHC clase I A ("MICA"), secuencia relacionada

con el polipéptido de MHC clase I B ("MICB"), NRG1-betal, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas del tipo beta ("PDGF Rbeta"), moléculas de adhesión celular endotelial de plaquetas ("PECAM-1"), RAGE, receptor celular del virus de la Hepatitis A 1 ("TIM-1"), superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral miembro IOC ("TRAIL R3"), dominio de unión de transglutaminasa de la proteína Trappin ("Trappin-2"), receptor de urocinasa ("uPAR"), proteína de adhesión celular vascular 1 ("VCAM-1"), XEDARActivin A, proteína relacionada con Agouti ("AgRP"), Ribonucleasa 5 ("Angiogenin"), Angiopoyetina 1, Angiostatina, Cateprina S, CD40, proteína IB de la familia críptica ("Cripto-1"), DAN, proteína relacionada con Dickkopf 1 ("DKK-1"), E-Cadherina, molécula de adhesión celular epitelial ("EpCAM"), ligando Fas (FasL o CD95L), Fcγ RIIB/C, Follistatina, Galectina-7, molécula de adhesión intercelular 2 ("ICAM-2"), IL-13 R1, IL-13R2, IL-17B, IL-2 Ra, IL-2 Rb, IL-23, LAP, molécula de adhesión celular neuronal ("NrCAM"), inhibidor del activador de plasminógeno 1 ("PAI-1"), receptores del factor de crecimiento derivados de plaquetas ("PDGF-AB"), Resistina, factor derivado de la célula estromal 1 ("SDF-1 beta"), sgpl30, proteína relacionada con frizzled secretada 2 ("ShhN"), lectinas del tipo inmunoglobulina de unión al ácido siálico ("Siglec-5"), ST2, factor de crecimiento-beta transformante 2 ("TGF beta 2"), Tie-2, Trombopoyetina ("TPO"), superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral miembro 10D ("TRAIL R4"), receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 ("TREM-1"), factor de crecimiento endotelial vascular C ("VEGF-C"), VEGFR1Adiponectin, Adipsina ("AND"), alfa-fetoproteína ("AFP"), similar a angiopoyetina 4 ("ANGPTL4"), Beta-2-microglobulina ("B2M"), molécula de adhesión celular basal ("BCAM"), antígeno de carbohidrato 125 ("CA125"),

antígeno de cáncer 15-3 ("CA15-3"), antígeno
 carcinoembriónico ("CEA"), proteína del receptor cAMP
 ("CRP"), receptor del factor de crecimiento epidérmico
 humano 2 ("ErbB2"), Follistatina, hormona estimulante de
 folículos ("FSH"), quimiocina (C-X-C motif) ligando 1 ("GRO
 alfa"), gonadotropina coriónica humana ("beta HCG"),
 receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1
 ("IGF-1 sR"), IL-1 sRII, IL-3, IL-18 Rb, IL-21, Leptina,
 metaloproteinasa matriz 1 ("MMP-1"), metaloproteinasa matriz
 2 ("MMP-2"), metaloproteinasa matriz 3 ("MMP-3"),
 metaloproteinasa matriz 8 ("MMP-8"), metaloproteinasa matriz
 9 ("MMP-9"), metaloproteinasa matriz 10 ("MMP-10"),
 metaloproteinasa matriz 13 ("MMP-13"), molécula de adhesión
 celular neural ("NCAM-1"), Entactina ("Nidogen-1"), enolasa
 específicas de las neuronas ("NSE"), Oncostatina M ("OSM"),
 Procalcitonina, Prolactina, antígeno específico de la
 próstata ("PSA"), lectina similar a Ig de unión al ácido
 siálico 9 ("Siglec-9"), ADAM 17 endopeptidasa ("TACE"),
 Tiroglobulina, inhibidor de la metaloproteinasa inhibitor 4
 ("TIMP-4"), TSH2B4, proteína que contiene el dominio de
 desintegrina y metaloproteinasa 9 ("ADAM-9"), Angiopoyetina
 2, superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral
 miembro 13/ familia de fosfoproteína nuclear rica en leucina
 ácida 32 miembro B ("APRIL"), proteína morfogenética ósea 2
 ("BMP-2"), proteína morfogenética ósea 9 ("BMP-9"),
 Complement component 5a ("C5a"), Catepsina L, CD200, CD97,
 Quemerina, superfamilia del receptor del factor de necrosis
 tumoral miembro 6B ("DcR3"), proteína de unión de ácidos
 grasos 2 ("FABP2"), proteína de activación de fibroblastos,
 alfa ("FAP"), factor de crecimiento de fibroblastos 19 ("FGF-
 19"), Galectina-3, receptor del factor de crecimiento de
 hepatocitos ("HGF R"), IFN-gammalfa/beta R2, factor de
 crecimiento similar a la insulina 2 ("IGF-2"), receptor del

factor de crecimiento similar a la insulina 2 ("IGF-2 R"), receptor 6 de Interleucina-1 ("IL-1R6"), Interleucina 24 ("IL-24"), Interleucina 33 ("IL-33", Kallikrein 14, Asparaginil endopeptidasa ("Legumain"), receptor de la lipoproteína oxidada de densidad baja 1 ("LOX-1"), lectina de unión a la manosa ("MBL"), Neprilisina ("NEP"), Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) ("Notch-1"), Nefroblastoma sobreexpresado ("NOV"), Osteoactivina, proteína de la muerte celular programada 1 ("PD-1"), N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa ("PGRP-5"), Serpina A4, proteína relacionada con frizzled secretada 3 ("sFRP-3"), Trombomodulina, receptor de tipo Toll 2 ("TLR2"), superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral miembro 10A ("TRAIL R1"), Transferrina ("TRF"), WIF-1ACE-2, albúmina, AMICA, Angiopoyetina 4, factor de activación de linfocito B ("BAFF"), antígeno de carbohidrato 19-9 ("CA19-9"), CD 163, Clusterina, CRT AM, quimiocina (C-X-C motif) ligando 14 ("CXCL14"), cistatína C, Decorina ("DCN"), proteína relacionada a Dickkopf 3 ("Dkk-3"), proteína similar a delta 1 ("DLL1"), Fetuina A, factor de crecimiento de unión a heparina 1 ("aFGF"), receptor de folato alfa ("FOLR1"), Furina, proteína de clasificación asociada a GPCR 1 ("GASP-1"), proteína de clasificación asociada a GPCR 2 ("GASP-2"), receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF R"), hepsina proteasa de serina ("HAI-2"), Receptor de Interleucina-17B ("IL-17B R"), Interleucina 27 ("IL-27"), genes de activación del linfocito 3 ("LAG-3"), Apolipoproteína A-V ("LDL R"), Pepsinogen I, proteína de unión de retinol 4 ("RBP4"), SOST, proteoglucana de sulfato de heparán ("Syndecan-1"), fsuperfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral miembro 13B ("TACI"), inhibidor de la vía del factor tisular ("TFPI"), TSP-1, superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b

("TRAIL R2"), TRANCE, Troponina I, activador del plasminógeno de urocinasa ("uPA"), Cadherina 5, tipo 2 o VE-cadherina (vascular endotelial) también conocido como CD144 ("VE-Cadherina"), proteína de la vía de señalización inducible de WNT1 1 ("WISP-1") y activador del receptor del factor nuclear κ B ("RANK").

[276] En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un compuesto antineoplásico. Los compuestos anticancerosos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, alemtuzumab (Campath®), alitretinoína (Panretin®), anastrozol (Arimidex®), bevacizumab (Avastin®), bexaroteno (Targretin®), bortezomib (Velcade®), bosutinib (Bosulif®), brentuximab vedotina (Adcetris®), cabozantinib (Cometriq™), carfilzomib (Kyprolis™), cetuximab (Erbitux®), crizotinib (Xalkori®), dasatinib (Sprycel®), denileukin diftitox (Ontak®), cloridrato de erlotinib (Tarceva®), everolimus (Afinitor®), exemestano (Aromasin®), fulvestrant (Faslodex®), gefitinib (Iressa®), ibritumomab tiuxetán (Zevalin®), mesilato de imatinib (Gleevec®), ipilimumab (Yervoy™), ditosilato de lapatinib (Tykerb®), letrozol (Femara®), nilotinib (Tasigna®), ofatumumab (Arzerra®), panitumumab (Vectibix®), clorhidrato de pazopanib (Votrient®), pertuzumab (Perjeta™), pralatrexato (Folotyn®), regorafenib (Stivarga®), rituximab (Rituxan®), romidepsina (Istodax®), tosilato de dorafenib (Nexavar®), malato de sunitinib (Sutent®), tamoxifeno, temsirolimus (Torisel®), toremifeno (Fareston®), tositumomab y ¹³¹I-tositumomab (Bexxar®), trastuzumab (Herceptin®), tretinoína (Vesanoid®), vandetanib (Caprelsa®), vemurafenib (Zelboraf®), vorinostat (Zolinza®), y zivaflibercept (Zaltrap®).

[277] Los compuestos anticancerosos a modo de ejemplo que modifican la función de proteínas que regulan la expresión génica y otras funciones celulares (p. ej.,

inhibidores de HDAC, ligantes del receptor retinoide) son vorinostat (Zolinza®), bexaroteno (Targretin®) y romidepsina (Istodax®), alitretinoína (Panretin®), y tretinoína (Vesanoid®).

[278] Los compuestos anticancerosos a modo de ejemplo que inducen apoptosis (p. ej., inhibidores del proteasoma, antifolatos) son bortezomib (Velcade®), carfilzomib (Kyprolis™), y pralatrexato (Folotyn®).

[279] Los compuestos anticancerosos a modo de ejemplo que aumentan la respuesta inmunitaria antitumoral (p. ej., anti CD20, anti CD52; antígeno asociado a linfocitos T anti-citotóxicos-4) son rituximab (Rituxan®), alemtuzumab (Campath®), ofatumumab (Arzerra®), e ipilimumab (Yervoy™).

[280] Los compuestos anticancerosos a modo de ejemplo que administran agentes tóxicos a las células cancerosas (p. ej., fusiones de radionúclidos anti-CD20; Fusiones de toxina IL-2-difteria; anti-CD30- fusiones de monometilauristatina E (MMAE)) son tositumomab y ¹³¹I-tositumomab (Bexxar®) e ibritumomab tiuxetán (Zevalin®), denileukin diftitox (Ontak®), y brentuximab vedotina (Adcetris®).

[281] Otros compuestos anticancerosos a modo de ejemplo son inhibidores de molécula pequeña y conjugado de los mismos de, por ejemplo, janocinasa, ALK, Bcl-2, PARP, PI3K, VEGF receptor, Braf, MEK, CDK, y HSP90.

[282] Los ejemplos de compuestos anticancerígenos basados en platino incluyen, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino y lipoplatino. Otros fármacos basados en metales adecuados para el tratamiento incluyen, pero sin limitación compuestos a base de rutenio, derivados de ferroceno, compuestos a base de titanio, y compuestos a base de galio.

[283] En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un resto radiactivo que comprende un radionúclido. Los radionúclidos ilustrativos incluyen, pero sin limitación 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.

[284] En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un antibiótico. Por ejemplo, si se detecta la presencia de bacterias asociadas al cáncer y/o se detecta un perfil de microbioma asociado al cáncer de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, pueden administrarse antibióticos para eliminar las bacterias asociadas al cáncer del sujeto. "Antibióticos" se refiere, ampliamente, a compuestos que pueden inhibir o prevenir una infección bacteriana. Los antibióticos pueden clasificarse de varias maneras, incluyendo su uso para infecciones específicas, su mecanismo de acción, su biodisponibilidad o su espectro de microbios diana (p. ej., bacterias gramnegativas frente a grampositivas, bacterias aerobias frente a anaeróbicas, etc.) y se pueden usar para destruir bacterias específicas en áreas 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 utilizar antibióticos para dirigirse de manera selectiva a bacterias de un nicho específico. En algunas realizaciones, los

antibióticos que se sabe que tratan una infección particular que incluye un nicho de cáncer se pueden utilizar para dirigirse a los microbios asociados con el cáncer, incluidas las bacterias asociadas con el cáncer en ese nicho. En otras realizaciones, los antibióticos se administran después de la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV). En algunas realizaciones, los antibióticos se administran antes de la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV).

[285] En algunos aspectos, los antibióticos pueden seleccionarse basándose en sus propiedades bactericidas o bacteriostáticas. Los antibióticos bactericidas incluyen mecanismos de acción que alteran la pared celular (p. ej., β -lactámicos), la membrana celular (p. ej., daptomicina) o ADN bacteriano (p. ej., fluoroquinolonas). Los agentes bacteriostáticos inhiben la replicación bacteriana e incluyen sulfonamidas, tetraciclinas y macrólidos, y actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Además, si bien algunos fármacos pueden ser bactericidas en determinados organismos y bacteriostáticos en otros, conocer el organismo diana le permite a un experto en la técnica seleccionar un antibiótico con las propiedades apropiadas. En determinadas condiciones de tratamiento, los antibióticos bacteriostáticos inhiben la actividad de los antibióticos bactericidas. Por tanto, en determinadas realizaciones, no se combinan antibióticos bactericidas y bacteriostáticos.

[286] Los antibióticos incluyen, pero sin limitación, aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefemos, carbapenémicos, cefalosporinas, glicopéptidos, lincosamidas, lipopéptidos, macrólidos, monobactámicos, nitrofuranos, oxazolidononas, penicilinas, antibióticos polipeptídicos, quinolonas, fluoroquinolona, sulfonamidas,

tetraciclinas y compuestos antimicobacterianos, y combinaciones de los mismos.

[287] Los aminoglucósidos incluyen, pero sin limitación, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina, paromomicina y espectinomomicina. Los aminoglucósidos son eficaces, por ejemplo, contra bacterias gramnegativas, tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Francisella tularensis*, y contra determinadas bacterias aerobias, pero menos eficaces contra anaerobios estrictos/facultativos. Se cree que los aminoglicósidos se unen a la subunidad ribosómica bacteriana 30S o 50S inhibiendo así la síntesis de proteínas bacterianas.

[288] Las ansamicinas incluyen, pero sin limitación, geldanamicina, herbimicina, rifamicina y estreptovaricina. Se cree que la geldanamicina y la herbimicina inhiben o alteran la función de la proteína de choque térmico 90.

[289] Los carbacefems incluyen, pero sin limitación, loracarbef. Se cree que los carbacefemos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.

[290] Los carbapenémicos incluyen, pero sin limitación, ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina, y meropenem. Los carbapenémicos son bactericidas tanto para bacterias grampositivas como para gramnegativas como antibióticos de amplio espectro. Se cree que los carbapenémicos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.

[291] Las cefalosporinas incluyen, pero no se limitan a, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalotina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno,

ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, ceftarolina fosamil y ceftobiprol. Las cefalosporinas seleccionadas son eficaces, p. ej., contra bacterias gramnegativas y contra bacterias grampositivas, incluida *Pseudomonas*, determinadas cefalosporinas son eficaces contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Se cree que las cefalosporinas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al interrumpir la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas.

[292] Los glucopéptidos incluyen, pero sin limitación, teicoplanina, vancomicina y telavancina. Los glucopéptidos son eficaces, p. ej., contra bacterias grampositivas aeróbicas y anaeróbicas, incluido MRSA y *Clostridium difficile*. Se cree que los glicopéptidos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al interrumpir la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas.

[293] Las lincosamidas incluyen, pero sin limitación, clindamicina y lincomicina. Las lincosamidas son eficaces, p. ej., contra bacterias anaerobias, así como *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Se cree que las lincosamidas se unen a la subunidad ribosómica bacteriana 50S inhibiendo así la síntesis de proteínas bacterianas.

[294] Los lipopéptidos incluyen, pero sin limitación, daptomicina. Los lipopéptidos son eficaces, p. ej., contra bacterias grampositivas. Se cree que los lipopéptidos se unen a la membrana bacteriana y provocan una rápida despolarización.

[295] Los macrólidos incluyen, pero sin limitación, azitromicina, claritromicina, dicitromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espiramicina. Los macrólidos son eficaces, p. ej., contra *Streptococcus* y *Mycoplasma*. Se cree que los macrólidos se

unen a la subunidad ribosómica bacteriana 50S inhibiendo así la síntesis de proteínas bacterianas.

[296] Las monobactamas incluyen, pero sin limitación, aztreonam. Las monobactamas son eficaces, por ejemplo, contra bacterias gramnegativas. Se cree que las monobactamas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al interrumpir la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas.

[297] Los nitrofuranos incluyen, pero sin limitación, furazolidona y nitrofurantoína.

[298] Las oxazolidononas incluyen, pero sin limitación, linezolid, posizolid, radezolid y torezolid. Se cree que las oxazolidononas son inhibidores de la síntesis de proteínas.

[299] Las penicilinas incluyen, pero sin limitación, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina, temocilina y ticarcilina. Las penicilinas son eficaces, por ejemplo, contra bacterias grampositivas, anaerobios facultativos, por ejemplo, *Streptococcus*, *Borrelia* y *Treponema*. Se cree que las penicilinas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al interrumpir la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas.

[300] Las combinaciones de penicilina incluyen, pero sin limitación, amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y ticarcilina/clavulanato.

[301] Los antibióticos polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, bacitracina, colistina, y polimixina B y E. Los antibióticos polipeptídicos son eficaces, p. ej., contra bacterias gramnegativas. Se cree que determinados

antibióticos polipeptídicos inhiben el pirofosfato de isoprenilo involucrado en la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas, mientras que otros desestabilizan la membrana externa bacteriana al desplazar los contraiones bacterianos.

[302] Las quinolonas y fluoroquinolonas incluyen, pero sin limitación, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, gemifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, ácido nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, sparxacina, temarfloxacino. Las quinolonas/fluoroquinolonas son eficaces, p. ej., contra *Streptococcus* y *Neisseria*. Se cree que las quinolonas/fluoroquinolonas inhiben la ADN girasa bacteriana o la topoisomerasa IV, inhibiendo así la replicación y transcripción del ADN.

[303] Las sulfonamidas incluyen, pero sin limitación, mafenida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfadimetoxina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfonamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol), y sulfonamidocrisoidina. Se cree que las sulfonamidas inhiben la síntesis de folato mediante inhibición competitiva de la dihidropteroato sintetasa, inhibiendo de ese modo la síntesis de ácido nucleico.

[304] Las tetraciclinas incluyen, pero no se limitan a, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina. Las tetraciclinas son eficaces, p. ej., contra bacterias gramnegativas. Se cree que las tetraciclinas se unen a la subunidad ribosómica bacteriana 30S inhibiendo así la síntesis de proteínas bacterianas.

[305] Los compuestos antimicobacterianos incluyen, pero sin limitación, clofazimina, dapsona, capreomicina,

cicloserina, etambutol, etionamida, isoniazid, pirazinamida, rifampicina, rifabutina, rifapentina, y estreptomycin.

[306] Los antibióticos adecuados también incluyen arsfenamina, cloranfenicol, fosfomicina, ácido fusídico, metronidazol, mupirocina, platensimicina, quinupristina/dalfopristina, tigeciclina, tinidazol, trimetoprima amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam, anfomicina-ristocetina, azitromicina, bacitracina, buforina II, carbomicina, cecropina Pl, claritromicina, eritromicinas, furazolidona, ácido fusídico, fusidato de Na, gramacidina, imipenem, indolicidina, josamicina, magainan II, metronidazol, nitroimidazoles, mikamicina, mutacina B-Ny266, mutacina B-JH1 140, mutacina J-T8, nisina, nisina A, novobiocina, oleandomicina, ostreogricina, piperacilina/tazobactam, pristinamicina, ramoplanina, ranalexina, reuterina, rifaximina, rosamicina, rosaramicina, espectinomicina, espiramicina, estafilomicina, estreptogramina, estreptogramina A, sinergistina, taurolidina, teicoplanina, telitromicina, ticarcilina/ácido clavulánico, triacetiloleandomicina, tilosina, tirocidina, tirotricina, vancomicina, vemamicina, y virginiamicina.

[307] En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente inmunosupresor, un DMARD, un fármaco para el control del dolor, un esteroide, un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE), o un antagonista de citocinas, y combinaciones de los mismos. Los agentes representativos incluyen, pero sin limitación, ciclosporina, retinoides, corticosteroides, derivado de ácido propiónico, derivado de ácido acético, derivados de ácido enólico, derivados de ácido fenámico, inhibidores de Cox-2, lumiracoxib, ibuprofeno, salicilato magnésico de colina, fenoprofeno, salsalato, difunisal, tolmetina, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, indometacina,

sulindaco, etodolaco, ketorolaco, nabumetona, naproxeno, valdecoxib, etoricoxib, MK0966; rofecoxib, acetaminofeno, celecoxib, diclofenaco, tramadol, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefanámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, tolfenámico, valdecoxib, parecoxib, etodolaco, indometacina, aspirina, ibuprofeno, firocoxib, metotraxato (MTX), medicamentos antipalúdicos (por ejemplo, hidroxicloroquina y cloroquina), sulfasalazina, leflunomida, azatioprina, ciclosporina, sales de oro, minociclina, ciclofosfamida, D-penicilamina, minociclina, auranofina, tacrolimus, miocrisina, clorambucilo, antagonistas de TNF alfa (por ejemplo, antagonistas de TNF alfa o antagonistas 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®; MabThera®), ABATACEPT (Orencia®), TOCILIZUMAB (RoActemra/Actemra®), antagonistas de integrinas (TYSABRI® (natalizumab)), antagonistas de IL-1 (ACZ885 (Ilaris)), Anakinra (Kinere t®)), antagonistas de CD4, antagonistas de IL-23, antagonistas de IL-20, antagonistas de IL-6, antagonistas de BLYS (por ejemplo, Atacicept, Benlysta®/LymphoStat-B® (belimumab)), inhibidores de p38, antagonistas de CD20 (Ocrelizumab, Ofatumumab (Arzerra®)), antagonistas de interferón gamma (Fontolizumab), prednisolona, prednisona, dexametasona, cortisol, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, betametasona, triamcinolona, beclometasoma, fludrocortisona, desoxicorticosterona, aldosterona, Doxiciclina, vancomicina, pioglitazona, SBI-087, SCIO-469, Cura-100, Oncoxina + Viusid, TwHF, Metoxsaleno, Vitamina D - ergocalciferol, Milnaciprano, Paclitaxel, rosig tazone, Tacrolimus (Prograf®), RADOOL,

rapamune, rapamicina, fostamatinib, Fentanilo, XOMA 052, Fostamatinib disódico, rosiglitazone, Curcumina (Longvida™), Rosuvastatina, Maraviroc, ramipril, Milnaciprán, Cobiprostona, somatropina, vector de terapia génica tgAAC94, MK0359, GW856553, esomeprazol, everolimus, trastuzumab, inhibidores de JAK1 y JAK2, inhibidores de pan JAK, por ejemplo, piridona tetracíclica 6 (P6), 325, PF-956980, denosumab, antagonistas de IL-6, antagonistas de CD20, antagonistas de CTLA4, antagonistas de IL-8, antagonistas de IL-21, antagonistas de IL-22, antagonistas de integrinas (Tysabri® (natalizumab)), antagonistas de VEGF, antagonistas de CXCL, antagonistas de MMP, antagonistas de defensina, antagonistas de IL-1 (incluyendo los antagonistas beta de IL-1) y antagonistas de IL-23 (por ejemplo, señuelos de receptor, anticuerpos antagonistas).

[308] En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente inmunosupresor. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolin sódico, antileucotrienos, fármacos anti-colinérgicos para rinitis, antagonistas de TLR, inhibidores de inflammasoma, descongestionantes anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos anti-IgE monoclonales, vacunas (p. ej., vacunas usadas para vacunación donde la cantidad de un alérgeno aumenta gradualmente), inhibidores de citocinas, tales como anticuerpos anti-IL-6, inhibidores de TNF tales como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept, y combinaciones de los mismos.

Administración

[309] En determinados aspectos, se proporciona en el presente documento un método de suministro de una composición farmacéutica descrita en el presente documento (p. ej., una composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) 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 agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende las mEV (tales como smEV) coformuladas con el agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) se coadministra con el agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra sujeto antes de la administración de la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) (p. ej., 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 agente terapéutico adicional se administra al sujeto después de la administración de la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) (p. ej., 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 usa el mismo modo de suministro para suministrar las dos composiciones farmacéuticas que comprenden las mEV (tales

como smEV) y el agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, se usan diferentes modos de suministro para administrar la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) y el agente terapéutico adicional. Por ejemplo, en algunas realizaciones la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) se administra por vía oral mientras que el agente terapéutico adicional se administra mediante inyección (p. ej., una inyección intravenosa, intramuscular y/o intratumoral).

[310] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra una vez al día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula para una dosis diaria. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula para una dosis de dos veces al día, donde cada dosis es la mitad de la dosis diaria.

[311] En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas descritos en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier otro tratamiento anticancerígeno convencional, tales como, por ejemplo, terapia por radiación y resección quirúrgica del tumor. Se pueden aplicar estos tratamientos según sea necesario y/o según se indiquen y pueden ocurrir antes, junto con o después de la administración de la composición farmacéutica que comprende las mEV (tales como smEV) o formas de dosificación descritas en el presente documento.

[312] El régimen de dosificación puede ser cualquiera de una diversidad de métodos y cantidades y puede determinarse por un experto en la técnica de acuerdo con

factores clínicos conocidos. Como se sabe en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente pueden depender de muchos factores, incluidas la especie, el tamaño, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, la inmunocompetencia, la salud general, el microorganismo particular a administrar, la duración y la vía de administración del sujeto, el tipo y fase de la enfermedad, por ejemplo, el tamaño del tumor y otros compuestos, como los medicamentos que se administran de manera concurrente o casi concurrente. Además de los factores anteriores, dichos niveles pueden verse afectados por la infectividad del microorganismo, y la naturaleza del microorganismo, como puede determinar un experto en la materia. En los métodos actuales, los niveles de dosificación mínimos apropiados de microorganismos pueden ser niveles suficientes para que el microorganismo sobreviva, prolifere y se replique. La dosis de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) descrita en el presente documento puede establecerse o ajustarse adecuadamente de acuerdo con la forma farmacéutica, la ruta de administración, el grado o etapa de una enfermedad objetivo, y similares. Por ejemplo, la dosis eficaz general de los agentes puede variar entre 0.01 mg/kg de peso 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 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 eso.

[313] En algunas realizaciones, la dosis administrada a un sujeto es suficiente para prevenir la enfermedad (p. ej., enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad metabólica, disbiosis o cáncer), retrasar su aparición, ralentizar o detener su progresión, o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. Un experto en la materia reconocerá que la dosificación dependerá de una variedad de factores que incluyen la fuerza del agente particular (p. ej., un agente terapéutico) empleado, así como la edad, especie, condición y peso corporal del sujeto. El tamaño de la dosis también se determinará por la vía, el momento, la frecuencia de administración, así como la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un agente terapéutico particular y el efecto fisiológico deseado.

[314] Las dosis y los regímenes de dosificación adecuados pueden determinarse mediante técnicas convencionales de búsqueda de intervalos conocidas por los expertos en la materia. En general, el tratamiento se inicia con dosis menores, que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. A partir de entonces, la dosis se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. Puede determinarse un protocolo de dosis y tratamiento eficaz por medios rutinarios y convencionales, comenzando, por ejemplo, con una dosis baja en animales de laboratorio y luego aumentando la dosis mientras se controlan los efectos y variando sistemáticamente el régimen de dosificación. Los estudios en animales se usan comúnmente para determinar la dosis máxima tolerable ("MTD") de agente bioactivo por kilogramo de peso. Los expertos en la materia extrapolan regularmente dosis

para la eficacia, evitando la toxicidad, en otras especies, incluyendo los seres humanos.

[315] De acuerdo con lo anterior, en las aplicaciones terapéuticas, las dosis de los agentes terapéuticos utilizados de acuerdo con la invención varían según el agente activo, la edad, el peso, la condición clínica del paciente receptor y la experiencia y el criterio del médico o practicar la administración de la terapia, entre otros factores que afectan la dosis seleccionada. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, la dosis debería ser suficiente para dar como resultado la regresión lenta y preferente, el crecimiento de un tumor y, más preferentemente, que cause la completa regresión del cáncer o la reducción en el tamaño o la cantidad de metástasis. Como otro ejemplo, la dosis debería ser suficiente para dar como resultado la ralentización de la progresión de la enfermedad para la que se está tratando sujeto y, preferentemente, el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad para la que se está tratando el sujeto.

[316] Las administraciones independientes pueden incluir cualquier número de dos o más administraciones, incluidas dos, tres, cuatro, cinco o seis administraciones. Un experto en la materia puede determinar fácilmente el número de administraciones que hay que realizar o la conveniencia de realizar una o más administraciones adicionales de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica para controlar los métodos terapéuticos y otros métodos de control 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 puede determinarse mediante el control del sujeto, y, basándose en los

resultados del control, determinar si proporcionar o no una o más administraciones adicionales. La decisión de proporcionar o no una o más administraciones adicionales puede basarse en una variedad de resultados de control.

[317] El período de tiempo entre administraciones puede ser cualquiera de una variedad de períodos de tiempo. El período de tiempo entre administraciones puede ser una función de cualquiera de una variedad de factores, incluyendo las etapas de control, como se describe en relación con el número de administraciones, el período de tiempo para que un sujeto genere una respuesta inmunitaria. En un ejemplo, el periodo de tiempo puede ser una función del periodo de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunitaria; por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser más que el periodo de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunitaria, 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 periodo de tiempo puede ser inferior al periodo de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunitaria, como menos de aproximadamente una semana, menos de aproximadamente diez días, menos de aproximadamente dos semanas, o menos de aproximadamente un mes.

[318] En algunas realizaciones, la administración de un agente terapéutico adicional en combinación con la composición farmacéutica descrita en el presente documento reduce los efectos adversos y/o mejora la eficacia del agente terapéutico adicional.

[319] La dosis eficaz de un agente terapéutico adicional descrito en el presente documento es la cantidad del agente terapéutico adicional que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto particular, composición, y modo de administración, con la menor toxicidad

para el sujeto. El nivel de dosificación eficaz puede identificarse usando los métodos descritos en el presente documento y dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares administradas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción de cada compuesto empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en la combinación con las composiciones o los agentes particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y el historial médico previo del sujeto tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. En general, una dosis eficaz de un agente terapéutico adicional será la cantidad del agente terapéutico adicional que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente.

[320] La toxicidad de un agente terapéutico adicional es el nivel de efectos adversos que experimenta el sujeto durante y después del tratamiento. Los acontecimientos adversos asociados con la toxicidad de la terapia adicional pueden incluir, pero sin limitación, dolor abdominal, indigestión ácida, reflujo ácido, reacciones alérgicas, alopecia, anafilaxia, anemia, ansiedad, falta de apetito, artralgias, astenia, ataxia, azotemia, pérdida de equilibrio, dolor óseo, hemorragia, coágulos sanguíneos, presión arterial baja, presión arterial elevada, dificultad para respirar, bronquitis, hematomas, recuento bajo de glóbulos blancos, recuento bajo de glóbulos rojos, recuento bajo de plaquetas, cardiotoxicidad, cistitis, cistitis hemorrágica, arritmias, enfermedad de la válvula cardíaca, miocardiopatía, enfermedad de la arteria coronaria,

cataratas, neurotoxicidad central, deterioro cognitivo, confusión, conjuntivitis, constipación, tos, calambres, cistitis, trombosis venosa profunda, deshidratación, depresión, diarrea, mareos, boca seca, piel seca, dispepsia, disnea, edema, desequilibrio electrolítico, esofagitis, fatiga, pérdida de fertilidad, fiebre, flatulencia, enrojecimiento, reflujo gástrico, enfermedad por reflujo gastroesofágico, dolor genital, granulocitopenia, ginecomastia, glaucoma, pérdida de cabello, síndrome de pies y manos, dolor de cabeza, pérdida de audición, insuficiencia cardíaca, palpitaciones del corazón, acidez estomacal, hematoma, cistitis hemorrágica, hepatotoxicidad, hiperamilasemia, hipercalcemia, hipercloremia, hiperglucemia, hipercalcemia, hiperlipasemia, hipermagnesemia, hipernatremia, hiperfosfatemia, hiperpigmentación, hipertrigliceridemia, hiperuricemia, hipoalbuminemia, hipocalcemia, hipocloremia, hipoglucemia, hipocalemia, hipomagnesemia, hiponatremia, hipofosfatemia, impotencia, infección, sitio de inyección reacciones, insomnio, deficiencia de hierro, picazón, dolor en las articulaciones, insuficiencia renal, leucopenia, disfunción hepática, pérdida de memoria, menopausia, llagas en la boca, mucositis, dolor muscular, mialgias, mielosupresión, miocarditis, fiebre neutropénica, náuseas, nefrotoxicidad, neutropenia, hemorragias nasales, entumecimiento, ototoxicidad, dolor, eritrodistesia palmo-plantar, pancitopenia, pericarditis, neuropatía periférica, faringitis, ftofobia, fotosensibilidad, neumonía, neumonitis, proteinuria, embolia pulmonar, fibrosis pulmonar, toxicidad pulmonar, erupción cutánea, latidos cardíacos rápidos, sangrado rectal, inquietud, rinitis, convulsiones, dificultad para respirar, sinusitis, trombocitopenia, tinnitus, infección del tracto urinario,

sangrado vaginal, sequedad vaginal, vértigo, retención de agua, debilidad, pérdida de peso, aumento de peso y xerostomía. En general, la toxicidad es aceptable si los beneficios para el sujeto logrados a través de la terapia superan los acontecimientos adversos experimentados por el sujeto debido a la terapia.

Trastornos inmunitarios

[321] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento se refieren al tratamiento o 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 una enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa). En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es psoriasis. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es dermatitis atópica.

[322] Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar a cualquier sujeto que lo necesite. Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto que lo necesita" incluye cualquier sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado con una respuesta inmunitaria patológica (p. ej., una enfermedad inflamatoria intestinal), así como cualquier sujeto con una mayor probabilidad de adquirir una enfermedad o trastorno.

[323] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, como una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de (reducción, parcial o completamente, los efectos adversos de) una enfermedad autoinmune, tal como enfermedad intestinal inflamatoria crónica, lupus eritematoso

sistémico, psoriasis, Síndrome de Muckle-Wells, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, o enfermedad de Hashimoto; una enfermedad alérgica, tal como una alergia a alimentos, polinosis, o asma; una enfermedad infecciosa, tal como una infección con *Clostridium difficile*; una enfermedad inflamatoria tal como una enfermedad inflamatoria mediada por TNF (p. ej., una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, tal como reservoritis, un estado inflamatorio cardiovascular, tal como aterosclerosis, o una enfermedad pulmonar inflamatoria, tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica); una composición farmacéutica para suprimir el rechazo en trasplante de órganos u otras situaciones en las que podría producirse rechazo de tejido; un suplemento, alimento, o bebida para mejorar las funciones inmunes; o un reactivo para suprimir la proliferación o función de células inmunes.

[324] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento son útiles para el tratamiento de la inflamación. En determinadas realizaciones, la inflamación de cualquier tejido y órgano del cuerpo, incluida la inflamación musculoesquelética, la inflamación vascular, la inflamación neuronal, la inflamación del sistema digestivo, la inflamación ocular, la inflamación del sistema reproductivo y otras inflamaciones, como se discute a continuación.

[325] Los trastornos inmunitarios del sistema musculoesquelético incluyen, pero sin limitación, las afecciones que afectan a las articulaciones esqueléticas, incluidas las articulaciones de la mano, muñeca, codo, hombro, mandíbula, columna vertebral, cuello, cadera, rodilla, tobillo, pie y afecciones que afectan a tejidos que conectan los músculos a los huesos, tales como los tendones. Los ejemplos de dichos trastornos inmunitarios, que pueden

tratarse con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, artritis (incluida, por ejemplo, la artrosis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, infecciosa aguda y crónica artritis, artritis asociada a gota y pseudogota, y artritis idiopática juvenil), tendinitis, sinovitis, tenosinovitis, bursitis, fibrositis (fibromialgia), epicondilitis, miositis, osteítis (incluida, por ejemplo, la enfermedad de Paget, osteítis pubis, osteítis fibrosa quística).

[326] Los trastornos inmunitarios oculares se refieren a un trastorno inmunitario que afecta a cualquier estructura del ojo, incluidos los párpados. Los ejemplos de trastornos inmunitarios oculares que pueden tratarse con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, blefaritis, blefarocalasia, conjuntivitis, dacrioadenitis, queratitis, queratoconjuntivitis seca (ojo seco), escleritis, triquiasis, y uveítis.

[327] Los ejemplos de trastornos inmunitarios del sistema nervioso que pueden tratarse con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, encefalitis, síndrome de Guillain-Barré, meningitis, neuromiotonía, narcolepsia, esclerosis múltiple, mielitis y esquizofrenia. Los ejemplos de inflamación de la vasculatura o del sistema linfático que pueden tratarse con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan, artroesclerosis, artritis, flebitis, vasculitis y linfangitis.

[328] Los ejemplos de trastornos inmunitarios del sistema digestivo que pueden tratarse con los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente

documento incluyen, pero sin limitación, colangitis, colecistitis, enteritis, enterocolitis, gastritis, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria intestinal, ileítis y proctitis. Las enteropatías inflamatorias incluyen, por ejemplo, determinadas formas reconocidas en la técnica de un grupo de afecciones relacionadas. Se conocen varias formas principales de enteropatías inflamatorias, siendo la enfermedad de Crohn (enteropatía regional, por ejemplo, formas inactivas y activas) y la colitis ulcerosa (por ejemplo, formas inactivas y activas) los más comunes de estos trastornos. Además, la enteropatía inflamatoria abarca el síndrome del intestino irritable, la colitis microscópica, la enteritis linfocítica-plasmocítica, la enfermedad celíaca, la colitis colágena, la colitis linfocítica y la enterocolitis eosinofílica. Otras formas menos comunes de EII incluyen colitis indeterminada, colitis pseudomembranosa (colitis necrotizante), enfermedad inflamatoria intestinal isquémica, enfermedad de Behcet, sarcoidosis, esclerodermia, displasia asociada a EII, displasia asociada a masas o lesiones, y colangitis esclerosante primaria.

[329] Los ejemplos de trastornos inmunitarios del sistema reproductivo que pueden tratarse con los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, cervicitis, corioamnionitis, endometritis, epididimitis, onfalitis, ooforitis, orquitis, salpingitis, absceso tubo-ovárico, uretritis, vaginitis, vulvitis y vulvodinia.

[330] Los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden usarse para tratar las afecciones autoinmunitarias que tienen un componente inflamatorio. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, alopecia diseminada aguda universalizada, enfermedad de Behcet, enfermedad de Chagas, síndrome de

fatiga crónica, disautonomía, encefalomiелitis, espondilitis anquilosante, anemia aplásica, hidradenitis supurativa, hepatitis autoinmune, ooforitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus tipo 1, arteritis de células gigantes, síndrome de goodpasture, enfermedad de Grave, Síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso, colitis microscópica, poliarteritis microscópica, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Muckle-Wells, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de opsoclono mioclónico, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, poliarteritis nodosa, polimialgia, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, Síndrome de Sjögren, arteritis temporal, granulomatosis de Wegener, anemia hemolítica autoinmune cálida, cistitis intersticial, enfermedad de Lyme, morfea, psoriasis, sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa, y vitíligo.

[331] Los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades de hipersensibilidad mediada por linfocitos T que tienen un componente inflamatorio. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, hipersensibilidad de contacto, dermatitis de contacto (incluyendo la debida a hiedra venenosa), urticaria, alergias cutáneas, alergias respiratorias (fiebre del heno, rinitis alérgica, alergia al polvo doméstico) y enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca).

[332] Otros trastornos inmunitarios que pueden tratarse con los métodos y composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, apendicitis, dermatitis, dermatomiositis, endocarditis, fibrositis, gingivitis, glositis, hepatitis, hidradenitis supurativa, iritis, laringitis, mastitis, miocarditis, nefritis, otitis,

pancreatitis, parotiditis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, neumonitis, prostatitis, pielonefritis, y estomatitis, rechazo de trasplante (implicando órganos como riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas (p. ej., células de islotes), médula ósea, córnea, intestino delgado, aloinjertos de piel, homoinjertos de piel, xenoinjertos de válvula cardíaca, enfermedad del suero, enfermedad de injerto contra hospedador), pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, síndrome de Sèzary, hiperplasia suprarrenal congénita, tiroiditis no supurativa, hipercalcemia asociada con cáncer, pénfigo, dermatitis ampollosa 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 zoster oftálmico, iritis y oiridociclitis, coriorretinitis, neuritis óptica, sarcoidosis sintomática, fulminante o quimioterapia de tuberculosis pulmonar diseminada, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, trombocitopenia secundaria en adultos, anemia hemolítica (autoinmune) adquirida, leucemia y linfomas en adultos, leucemia aguda de la infancia, enteritis regional, vasculitis autoinmune, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rechazo de trasplante de órgano sólido, septicemia. Los tratamientos preferidos incluyen tratamiento de rechazo de trasplante, artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, asma, enteropatía inflamatoria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, e inflamación que acompaña a estados infecciosos (por ejemplo, septicemia).

Trastornos metabólicos

[333] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se refieren al tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno metabólicos, tales como diabetes tipo II, disfunción de la tolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, hipercolesterolemia, hipertensión, hiperlipoproteínemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, cetoacidosis, hipoglucemia, trastornos trombóticos, dislipidemia, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), esteatohepatitis no alcohólica (ENA) o una enfermedad relacionada. En algunas realizaciones, la enfermedad relacionada es una enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedad renal, nefropatía, neuropatía diabética, retinopatía diabética, disfunción sexual, dermatopatía, dispepsia o edema. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento se refieren al tratamiento de la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y esteatohepatitis no alcohólica (ENA).

[334] Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar a cualquier sujeto que lo necesite. Como se usa en el presente documento, un "sujeto que lo necesita" incluye cualquier sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno metabólico, así como cualquier sujeto con un aumento de la probabilidad de adquirir dicha enfermedad o trastorno.

[335] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden usar, por ejemplo, para prevenir o tratar (reducir, parcial o completamente, los efectos adversos de) una enfermedad metabólica, tales como diabetes tipo II, disfunción de la tolerancia a la glucosa,

resistencia a la insulina, obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, hipercolesterolemia, hipertensión, hiperlipoproteinemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, cetoacidosis, hipoglucemia, trastornos trombóticos, dislipidemia, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), esteatohepatitis no alcohólica (ENA) o una enfermedad relacionada. En algunas realizaciones, la enfermedad relacionada es una enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedad renal, nefropatía, neuropatía diabética, retinopatía diabética, disfunción sexual, dermatopatía, dispepsia o edema.

Cáncer

[336] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento se refieren al tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, cualquier cáncer puede tratarse usando los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse por métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, seno, colon, esófago, gastrointestinal, encía, 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 a estos: neoplasma, maligno; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células fusiformes y gigantes; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; linfoepitelial carcinoma; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, tumor maligno;

colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado y colangiocarcinoma; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquiolaloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometriode; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de paget, mamario; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma maligno; tumor de células granulosa, maligno; y roblastoma maligno; carcinoma de células de sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiosarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario;

rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma del estroma; tumor mixto maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filodes maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; Struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; chordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; Linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, macrocítico, difuso; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basofílica; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia

megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

[337] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticos proporcionados en el presente documento se refieren al tratamiento de una leucemia. El término "leucemia" incluye enfermedades malignas variables progresivas de los órganos/sistemas hematopoyéticos y normalmente se caracterizan por una proliferación distorsionada y el desarrollo de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de leucemia incluyen, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de linfocitos T del adulto, leucemia aleucémica, leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de células blásticas, leucemia bovina, leucemia bovina, leucemia crónica, leucemia bovina leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica, leucemia indiferenciada, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, y leucemia promielocítica.

[338] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticos proporcionados en el presente documento se refieren al tratamiento de un carcinoma. El término "carcinoma" se refiere a un crecimiento maligno compuesto por células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes, y/o resisten señales de muerte celular fisiológicas y no fisiológicas y dan lugar a metástasis. Los tipos de carcinomas ilustrativos no limitantes incluyen, carcinoma acinar, carcinoma mucinoso, carcinoma adenoide quístico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma basocelular, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma basoescamoso, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, carcinoma comedo, carcinoma de cuerpo, carcinoma cribiforme, carcinoma en cuirasse, carcinoma cutaneum, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma de conducto, carcinoma durum, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epiennoide, adenoides epiteliales de carcinoma, carcinoma exofítico, carcinoma ex ulceras, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoidales, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de cuerdas, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectodo, carcinoma de células de transición, carcinoma tuberoso, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso, carcinoma velloso, carcinoma gigantocelular, carcinoma

glandular, carcinoma de células granulosas, carcinoma de matriz capilar, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, Carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipernefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, Carcinoma de Krompecher, carcinoma de células Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma molle, carcinoma mucinoso, carcinoma mucipario, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de la mucosa, carcinoma mucoso, mixomas de carcinoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células de avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultaceo, carcinoma de células renales de riñón, carcinoma de células de reserva, sarcomatodes de carcinoma, carcinoma de Schneider, carcinoma escirroso, y carcinoma de escroto.

[339] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticos proporcionados en el presente documento se refieren al tratamiento de un sarcoma. El término "sarcoma" se refiere en general a un tumor que está compuesto de una sustancia como el tejido conectivo embrionario y generalmente está compuesto de células compactas incrustadas en una sustancia fibrilar, heterogénea u homogénea. Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma endometrial, sarcoma del estroma, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de

partes blandas, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioides, sarcoma de cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado idiopático múltiple, 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 de mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectático.

[340] Las neoplasias ilustrativas adicionales que pueden tratarse usando los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinoma pancreático maligno, carcinoide maligno, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, tiroides cáncer, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer cervical, cáncer de endometrio, plasmacitoma, cáncer colorrectal, cáncer rectal y cáncer cortical suprarrenal.

[341] En algunas realizaciones, el cáncer tratado es un melanoma. El término "melanoma" pretende significar un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los ejemplos no limitantes de melanomas son melanoma Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma lentigo maligno, melanoma maligno, melanoma acral-lentiginoso, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma nodular melanoma subgénico, y melanoma de extensión superficial.

[342] En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo).

[343] En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer colorrectal (p. ej., cáncer colorrectal con estabilidad microsatelital (MSS)).

[344] En algunas realizaciones, el cáncer comprende carcinoma de células renales.

[345] En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer de pulmón (p. ej., cáncer pulmonar no microcítico).

[346] En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer de vejiga.

[347] En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer gastroesofágico.

[348] Las categorías particulares de tumores que pueden tratarse usando los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen trastornos linfoproliferativos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de huesos, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de piel, cáncer de riñón, así como metástasis de todo lo anterior. Los tipos particulares de tumores incluyen carcinoma hepatocelular, hepatoma, hepatoblastoma, 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 de células escamosas pulmonares, carcinoma de células basales, adenocarcinoma (bien diferenciado, moderadamente diferenciado, poco

diferenciado o indiferenciado), carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma de células renales, hipernefroma, adenocarcinoma hipernefroide, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms tumor testicular, carcinoma de pulmón incluyendo células pequeñas, carcinoma de pulmón no microcítico y macrocítico, carcinoma de vejiga, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, retinoblastoma, neuroblastoma, carcinoma de colon, carcinoma rectal, neoplasias hematopoyéticas que incluyen todos los tipos de leucemia y linfoma, incluidos: leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de mastocitos, mieloma múltiple, linfoma mieloide, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin plasmacitoma, cáncer colorrectal y cáncer rectal.

[349] Los cánceres tratados en determinadas realizaciones también incluyen lesiones precancerosas, p. ej., queratosis actínica (queratosis solar), lunares (nevos displásicos), quelitis acitínica (labio de granjero), cuernos cutáneos, esófago de Barrett, gastritis atrófica, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, liquen plano, fibrosis submucosa oral, actínica (solar) elastosis y displasia cervical.

[350] Los cánceres tratados en algunas realizaciones incluyen tumores no cancerosos o benignos, por ejemplo, de origen endodérmico, ectodérmico o mesenquimatoso, que incluyen, pero sin limitación, colangioma, pólipo colónico, adenoma, papiloma, cistadenoma, adenoma de células hepáticas, mola hidatidiforme, adenoma tubular renal, papiloma de células escamosas, pólipo gástrico, hemangioma, osteoma, condroma, lipoma, fibroma,

linfangioma, leiomioma, rabdomioma, astrocitoma, nevo, meningioma y ganglioneuroma.

Otras enfermedades y trastornos

[351] En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticos descritos en el presente documento se refieren al tratamiento de enfermedades hepáticas. Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Alagille, hepatopatía alcohólica, deficiencia de alfa-1 antitripsina, hepatitis autoinmune, tumores hepáticos benignos, atresia biliar, cirrosis, galactosemia, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, encefalopatía hepática, precoatía precohepática (ICP), deficiencia de lipasa ácida lisosómica (LAL-D), quistes hepáticos, cáncer de hígado, ictericia neonatal, colangitis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), síndrome de Reye, enfermedad de almacenamiento de glicógeno tipo I, y enfermedad de Wilson.

[352] Los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades neurodegenerativas y neurológicas. En determinadas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa y/o neurológica es enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad priónica, enfermedad de Huntington, enfermedades de las neuronas motoras (EMN), ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal, distonía, hipertensión idiopática intracraneal, epilepsia, enfermedad del sistema nervioso, enfermedad del sistema nervioso central, trastornos del movimiento, esclerosis múltiple, encefalopatía, neuropatía periférica o disfunción cognitiva postoperatoria.

Disbiosis

[353] El microbioma intestinal (también denominado "microbiota intestinal") puede tener un impacto

significativo en la salud de un individuo a través de la actividad microbiana y la influencia (local y/o distal) en células inmunes y otras del hospedador (Walker, W.A., disbiosis. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Capítulo 25. 2017; Weiss y Thierry, Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (2017) 74(16):2959-2977. Zurich Open Repository and Archive, doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>).

[354] Una homeostasis saludable del microbioma intestinal del hospedador a veces se denomina "eubiosis" o "normobiosis", mientras que un cambio perjudicial en la composición del microbioma del hospedador y/o su diversidad puede conducir a un desequilibrio no saludable en el microbioma, o una "disbiosis" (Hooks y O'Malley. *Dysbiosis and its discontents*. American Society for Microbiology. oct 2017. Vol. 8. Publicación 5. mBio 8:e01492-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01492-17>). La disbiosis, asociada a efectos inflamatorios o inmunitarios locales o distales del hospedador, puede producirse cuando la homeostasis del microbioma se pierde o disminuye, dando como resultado: mayor susceptibilidad a los patógenos; actividad metabólica bacteriana del hospedador alterada; inducción de la actividad proinflamatoria del hospedador y/o reducción de la actividad antiinflamatoria del hospedador. Dichos efectos están mediados en parte por interacciones entre células inmunitarias del hospedador (por ejemplo, linfocitos T, células dendríticas, mastocitos, linfocitos NK, linfocitos epiteliales intestinales (IEC), macrófagos y fagocitos) y citocinas, y otras sustancias liberadas por dichas células y otras células hospedadoras.

[355] Puede producirse una disbiosis dentro del tracto gastrointestinal (una "disbiosis gastrointestinal" o

"disbiosis intestinal") o puede producirse fuera de la luz del tracto gastrointestinal (una "disbiosis distal"). La disbiosis gastrointestinal a menudo se asocia con una reducción en la integridad de la barrera epitelial intestinal, una reducción de la integridad de la unión cerrada y una mayor permeabilidad intestinal. Citi, S. Intestinal Barriers protect against disease, *Science* 359:1098-99 (2018); Srinivasan et al., TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J. Lab. Autom.* 20:107-126 (2015). Una disbiosis gastrointestinal puede tener efectos fisiológicos e inmunitarios dentro y fuera del tracto gastrointestinal.

[356] La presencia de disbiosis se puede asociar con una gran variedad de enfermedades y afecciones que incluyen: infección, cáncer, trastornos autoinmunes (p. ej., lupus eritematoso sistémico (LES)) o trastornos inflamatorios (p. ej., trastornos funcionales gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), enfermedades neuroinflamatorias (p. ej., esclerosis múltiple), trastornos del trasplante (p. ej., enfermedad de injerto contra hospedador), enfermedad del hígado graso, diabetes tipo I, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, enfermedad celíaca, fibrosis quística, trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC), y otras enfermedades y estados asociados con disfunción del sistema inmunitario. Lynch et al., The Human Microbiome in Health and Disease, *N. Engl. J. Med.* 375:2369-79 (2016), Carding et al., Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* (2015); 26: 10: 3402/mehd.v26.2619; Levy et al., Dysbiosis and the Immune System, *Nature Reviews Immunology* 17:219 (Abril de 2017)

[357] En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas ilustrativas divulgadas en el presente documento pueden tratar una disbiosis y sus efectos modificando la actividad inmune presente en el sitio de la disbiosis. Tal como se describe en el presente documento, tales composiciones pueden modificar una disbiosis a través de los efectos sobre las células inmunitarias del hospedador, produciendo, por ejemplo, un aumento en la secreción de citocinas antiinflamatorias y/o una disminución en la secreción de citocinas proinflamatorias, reduciendo la inflamación en el sujeto receptor o mediante cambios en la producción de metabolitos.

[358] Las composiciones farmacéuticas ilustrativas divulgadas en el presente documento que son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con una disbiosis contienen uno o más tipos de mEV (vesículas extracelulares microbianas) derivadas de las bacterias inmunomoduladoras (p. ej., bacterias antiinflamatorias). Dichas composiciones pueden afectar a la función inmunitaria del hospedador receptor, en el tracto gastrointestinal, y/o un efecto sistémico en sitios distales fuera del tracto gastrointestinal del sujeto.

[359] Las composiciones farmacéuticas ilustrativas divulgadas en el presente documento que son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con una disbiosis contienen una población de bacterias inmunomoduladoras de una sola especie bacteriana (p. ej., una sola cepa) (p. ej., bacterias antiinflamatorias) y/o una población de mEV derivada de bacterias inmunomoduladoras de una sola especie bacteriana (p. ej., una sola cepa) (p. ej., bacterias antiinflamatorias). Dichas composiciones pueden afectar a la función inmunitaria del hospedador receptor, en el tracto

gastrointestinal y/o un efecto sistémico en sitios distales fuera del tracto gastrointestinal del sujeto.

[360] En una realización, se administran las composiciones farmacéuticas que contienen una población aislada de mEV derivados de bacterias inmunomoduladoras (p. ej., células bacterianas antiinflamatorias) (p. ej., por vía oral) a un receptor mamífero en una cantidad eficaz para tratar una disbiosis y uno o más de sus efectos en el recipiente. La disbiosis puede ser una disbiosis del tracto gastrointestinal o disbiosis distal.

[361] En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tratar una disbiosis gastrointestinal y uno o más de sus efectos en las células inmunitarias del hospedador, lo que resulta en un aumento en la secreción de citocinas antiinflamatorias y/o una disminución en la secreción de citocinas proinflamatorias, reduciendo la inflamación en el sujeto receptor.

[362] En otra realización, las composiciones farmacéuticas pueden tratar una disbiosis gastrointestinal y uno o más de sus efectos modulando la respuesta inmunitaria del receptor a través de la modulación celular y de citocinas para reducir la permeabilidad intestinal al aumentar la integridad de la barrera epitelial intestinal.

[363] En otra realización, las composiciones farmacéuticas pueden tratar una disbiosis distal y uno o más de sus efectos modulando la respuesta inmunitaria del receptor en el sitio de la disbiosis a través de la modulación de células inmunitarias del hospedador.

[364] Otras composiciones farmacéuticas ilustrativas son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con una disbiosis y dichas composiciones contienen uno o más tipos de bacterias o mEV que pueden alterar las

proporciones relativas de subpoblaciones de células inmunes del hospedador, por ejemplo, subpoblaciones de linfocitos T, células linfoides inmunes, células dendríticas, células NK y otras células inmunes, o la función de las mismas, en el receptor.

[365] Otras composiciones farmacéuticas ilustrativas son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con una disbiosis y dichas composiciones contienen una población de las mEV de una sola especie de bacteria inmunomoduladora (p. ej., células bacterianas antiinflamatorias) (p. ej., una sola cepa) que pueden alterar las proporciones relativas de subpoblaciones de células inmunes, por ejemplo, subpoblaciones de linfocitos T, células linfoides inmunitarias, células NK y otras células inmunitarias, o la función de las mismas, en el receptor.

[366] En una realización, la invención proporciona métodos de tratamiento de una disbiosis gastrointestinal y uno o más de sus efectos mediante administración por vía oral a un sujeto que lo necesita de una composición farmacéutica que altera la población de microbioma que existe en el sitio de la disbiosis. La composición farmacéutica puede contener uno o más tipos de mEV de las bacterias inmunomoduladoras o una población de mEV de una sola especie bacteriana inmunomoduladora (p. ej., células bacterianas antiinflamatorias) (p. ej., una sola cepa).

[367] En una realización, la invención proporciona métodos de tratamiento de una disbiosis distal y uno o más de sus efectos mediante administración por vía oral a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que altera la respuesta inmunitaria del sujeto fuera del tracto gastrointestinal. La composición farmacéutica puede contener uno o más tipos de mEV de las bacterias inmunomoduladoras (p. ej., células bacterianas antiinflamatorias) o una

población de mEV de una sola especie bacteriana inmunomoduladora (p. ej., células bacterianas antiinflamatorias) (p. ej., una sola cepa).

[368] En realizaciones de ejemplo, las composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de trastornos asociados con una disbiosis que estimulan la secreción de una o más citocinas antiinflamatorias mediante células inmunitarias del hospedador. Las citocinas proinflamatorias incluyen, pero sin limitación, IL-10, IL-13, IL-9, IL-4, IL-5, TGF β , y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones ilustrativas, las composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de trastornos asociados con una disbiosis que disminuyen (por ejemplo, inhiben) la secreción de una o más citocinas proinflamatorias mediante las células inmunitarias del hospedador. Las citocinas proinflamatorias incluyen, pero sin limitación, IFN γ , IL-12p70, IL-1 α , IL-6, IL-8, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , TNF α , y combinaciones de los mismos. Otras citocinas ilustrativas se conocen en la técnica y se describen en el presente documento.

[369] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con una disbiosis en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar (p. ej., administración oral) al sujeto una composición terapéutica en forma de un probiótico o alimento médico que comprende bacterias o mEV en una cantidad suficiente para alterar el microbioma en el sitio de la disbiosis, de modo que se trata el trastorno asociado con la disbiosis.

[370] En otra realización, puede usarse una composición terapéutica de la presente invención en forma de un probiótico o alimento médico para prevenir o retrasar la

aparición de una disbiosis en un sujeto en riesgo de desarrollar una disbiosis.

Métodos de preparación de bacterias mejoradas

[371] En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos para crear bacterias diseñadas para la producción de las mEV (tales como smEV) descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, las bacterias modificadas por ingeniería se modifican para mejorar determinadas propiedades deseables. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las bacterias diseñadas se modifican para mejorar el efecto inmunomodulador y/o terapéutico de las mEV (tales como smEV) (p. ej., ya sea solo o en combinación con otro agente terapéutico), para reducir la toxicidad y/o mejorar la fabricación bacteriana y/o mEV (tales como smEV) (p. ej., mayor tolerancia al oxígeno, mejor tolerancia a la congelación y descongelación, tiempos de generación más cortos). Las bacterias modificadas por ingeniería pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por transposón, desactivaciones, activaciones, mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis química, mutagénesis por luz ultravioleta, transformación (químicamente o por electroporación), transducción de fagos, evolución dirigida, CRISPR/Cas9, o cualquier combinación de los mismos.

[372] 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 la exposición de la bacteria a una condición ambiental y selección de bacterias con supervivencia mejorada y/o crecimiento en la condición ambiental. En algunas realizaciones, el método comprende una selección de bacterias mutagenizadas usando un

ensayo que identifica la bacteria mejorada. En algunas realizaciones, el método comprende además mutagenizar las bacterias (p. ej., por exposición a mutágenos químicos y/o radiación UV) o exponerlas a un agente terapéutico (p. ej., antibiótico) seguido de un ensayo para detectar bacterias que tienen el fenotipo deseado (p. ej., un ensayo *in vivo*, un ensayo *ex vivo* o un ensayo *in vitro*).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación y preparación de las membranas a partir de bacterias para obtener vesículas extracelulares microbianas procesadas (pmEV)

Purificación

[373] Las vesículas extracelulares microbianas procesadas (pmEV) se purifican y preparan a partir de cultivos bacterianos (p. ej., bacterias enumeradas en la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3) usando métodos conocidos para los expertos en la técnica (Thein et al., 2010. Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies. J. Proteome Res. 3 de diciembre de 2010; 9(12): 6135-47. Doi: 10.1021/pr1002438. Epub 2010 Oct. 28; Sandrini et al. 2014. Fractionation by Ultracentrifugation of Gram negative cytoplasmic and membrane proteins. Bio-Protocol. Vol. 4 (21) Doi: 10.21769/BioProtoc.1287).

[374] Como alternativa, se purificaron las pmEV mediante métodos adaptados de Thein et al. Por ejemplo, los cultivos bacterianos se centrifugan a 10,000-15,500 x g durante 10-30 minutos la temperatura ambiente o a 4 °C. Se desechan los sobrenadantes y se congelan los sedimentos de las células a -80 °C. Se descongelan los sedimentos de las células en hielo y se resuspenden en Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 y se pueden complementar con 1 mg/ml DNasa I y/o NaCl 100 mM. Las células descongeladas se incuban en 500 ug/ml de lisozima, 40 ug/ml de liostafina y/o 1 mg/ml de DNasaI

durante 40 minutos Para facilitar la lisis celular. Pueden usarse enzimas adicionales para facilitar el proceso de lisis (p. ej., EDTA (5 mM), PMSF (Sigma Aldrich) y/o benzamidina (Sigma Aldrich). Las células luego se lisan usando un Emulsiflex C-3 (Avestin, Inc.) en condiciones recomendadas por el fabricante. Como alternativa, se pueden congelar los sedimentos a -80 °C y descongelarse nuevamente antes de la lisis. Se sedimentan residuos y células sin lisar mediante centrifugación a 10,000-12,500 x g durante 15 minutos a 4 °C. Luego se centrifugan los sobrenadantes a 120,000 x g durante 1 hora a 4 °C. Se resuspenden los sedimentos en carbonato de sodio 100 mM helado, pH 11, se incuban con agitación durante 1 hora a 4 °C. Como alternativa, los sedimentos se centrifugan a 120,000 x g durante 1 hora a 4 °C en carbonato de sodio inmediatamente después de la resuspensión. Los sedimentos se resuspenden en Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 complementado con NaCl 100 mM, se vuelven a centrifugar a 120,000 x g durante 20 minutos a 4 °C y luego se resuspenden en Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 complementado con hasta o aproximadamente NaCl 100 mM o en PBS. Las muestras se almacenan a -20 °C. Para proteger la preparación de las pmEV durante las etapas de congelación y descongelación, se pueden agregar 250 mM de sacarosa y hasta 500 mM de NaCl a la preparación final para estabilizar las vesículas en la preparación de las pmEV.

[375] Como alternativa, se obtienen pmEV mediante métodos adaptados a partir de Sandrini et al, 2014. Después, se centrifugan cultivos bacterianos a 10,000-15,500 x g durante 10-15 minutos a temperatura ambiente o a 4 °C, se congelan los sedimentos de células a -80 °C y se descartan los sobrenadantes. Luego, se descongelan los sedimentos de las células en hielo y se resuspenden en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM complementado con lisozima 0.1 mg/ml. Luego

se incuban las muestras con mezclado a temperatura ambiente o a 37 °C durante 30 min. En una etapa adicional, se congelan de nuevo las muestras a -80 °C y se descongelan de nuevo en hielo. Se añade DNasa I a una concentración final de 1.6 mg/ml y mgCl₂ a una concentración final de 100 mM. Se tratan con ultrasonidos las muestras usando un aparato de ultrasonidos QSonica Q500 con 7 ciclos de 30 s en y 30 s apagado. Se sedimentan residuos y células sin lisar mediante centrifugación a 10,000 x g durante 15 min a 4 °C. Luego se centrifugan los sobrenadantes a 110,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se resuspenden los sedimentos en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, y se incuban de 30 a 60 minutos con mezclado a temperatura ambiente. Se centrifugan las muestras a 110,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se resuspenden los sedimentos en PBS y se almacenan a -20 °C.

[376] Opcionalmente, las pmEV se pueden separar de otros componentes bacterianos y residuos usando métodos conocidos en la técnica. Se puede usar la cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) para la purificación de pmEV. Los métodos de separación adicional que se pueden usar incluyen el fraccionamiento de flujo del campo, el filtrado microfluídico, la clasificación libre de contacto y/o la cromatografía de enriquecimiento de inmunoafinidad. Como alternativa, el fraccionamiento de gradiente de densidad de resolución alta se puede usar para separar las partículas de pmEV según la densidad.

Preparación

[377] Se centrifugan cultivos bacterianos a 10,000-15,500 x g durante 10-30 minutos a temperatura ambiente o a 4 °C. Se descartan los sobrenadantes y se congelan los sedimentos de las células a -80 °C. Los sedimentos de las células se descongelan en hielo y se resuspenden en Tris-HCl

100 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, 500 ug/ml de lisozima y/o 40 ug/ml de lisostafina para facilitar la lisis celular; hasta 0.5 mg/ml de DNasaI para reducir el tamaño del ADN de genómica y EDTA (5 mM), PMSF (1 mM, Sigma Aldrich) y Benzamidina (1 mM, Sigma Aldrich) para inhibir las proteasas. Las células luego se lisan usando un Emulsiflex C-3 (Avestin, Inc.) en condiciones recomendadas por el fabricante. Como alternativa, se pueden congelar los sedimentos a -80 °C y descongelarse nuevamente antes de la lisis. Se sedimentan residuos y células sin lisar mediante centrifugación a 10,000-12,500 x g a durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes están sujetos a la cromatografía de exclusión por tamaño (Sephacrose 4 FF, GE Healthcare) usando un instrumento FPLC (AKTA Pure 150, GE Healthcare) con PBS y ejecutando el tampón complementado con hasta 0.3 M de NaCl. Se recopilan las pmEV puras en el volumen del espacio de columna, se concentran y almacenan -20 °C. Se puede realizar la concentración mediante varios métodos. Por ejemplo, se puede usar la ultracentrifugación (1401 x g, 1 hora, 4 °C, seguido de la resuspensión en un volumen pequeño de PBS). Para proteger la preparación de las pmEV durante las etapas de congelación y descongelación, se pueden agregar 250 mM de sacarosa y hasta 500 mM de NaCl a la preparación final para estabilizar las vesículas en la preparación de las pmEV. Los métodos de separación adicional que se pueden usar incluyen el fraccionamiento de flujo del campo, el filtrado microfluídico, la clasificación libre de contacto y/o la cromatografía de enriquecimiento de inmutioafinidad. Otras técnicas que se pueden emplear usando métodos conocidos en las técnicas incluyen evaporación de la película golpeada, destilación molecular, destilación de pase corto y/o filtración de flujo tangencial.

[378] En algunas instancias, se ponderan las pmEV y se administran en varias dosis (en ug/ml). Opcionalmente, se evalúan las pmEV para el recuento de partículas y distribución de tamaño usando el análisis de rastreo de nanopartícula (NTA), usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un instrumento Malvern NS300 se puede usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se describe en Bachurski et al. 2019. Journal of Extracellular Vesicles. Vol. 8(1). Como alternativa, para las pmEV, las proteínas totales se pueden medir usando los ensayos de Bio-rad (n.º de cat. 5000205) realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y administrados en varias dosis según el contenido/la dosis de la proteína.

[379] Para todos los estudios descritos a continuación, las pmEV se pueden irradiar, calentar y/o liofilizar antes de la administración (como se describe en el Ejemplo 49).

Ejemplo 2: Un modelo de carcinoma colorrectal

[380] Para estudiar la eficacia de las pmEV en un modelo tumoral, una de las muchas estirpes celulares el cáncer se pueden usar de acuerdo con los modelos del tumor de roedores conocidos en la técnica.

[381] Por ejemplo, se obtienen ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY) u otro proveedor. Se resuspenden 100,000 células tumorales colorrectales CT-26 (ATCC CRL-2638) en PBS estéril y se inoculan en presencia de Matrigel al 50 %. Se inyectan por vía subcutánea las células tumorales CT-26 en un flanco trasero de cada ratón. Cuando los volúmenes del tumor alcanzan un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de la célula tumoral), se distribuyen los animales en varios grupos de tratamiento (p. ej., vehículo; pmEV de Veillonella, pmEV de

Bifidobacteria, con o sin anticuerpo anti-PD-1). Los anticuerpos se administran por vía intraperitoneal (i.p.) a 200 µg/factor (100 µl volumen final) cada cuatro días, desde el día 1, durante un total de 3 veces (Q4Dx3) y las pmEV se administran por vía oral o intravenosa y en dosis variadas y en tiempos variados. Por ejemplo, las pmEV (5 µg) se inyectan por vía intravenosa (i.v.) cada tres días, desde el día 1 durante un total de 4 veces (Q3Dx4) y se evalúan los ratones para el crecimiento del tumor.

[382] Cuando los volúmenes tumorales alcanzan un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de las células tumorales), los animales se distribuyen en los siguientes grupos: 1) Vehículo; 2) pmEV de *Neisseria Meningitidis* aisladas de la vacuna Bexsero®; y 3) anticuerpo anti-PD-1. Se administran por vía intraperitoneal (i.p.) los anticuerpos a 200 µg/ratón (100 µl de volumen final) cada cuatro días, comenzando el día 1, y las pmEV *Neisseria Meningitidis* se administran por vía intraperitoneal (ip) diariamente, comenzando el día 1 hasta la conclusión del estudio.

[383] Cuando los volúmenes tumorales alcanzan un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de las células tumorales), los animales se distribuyeron en los siguientes grupos: 1) vehículo; 2) anticuerpo anti-PD-1; 3) pmEV *B. animalis ssp. lactis* (recuento de partículas de 7.0 e+10); 4) pmEV *Anaerostipes hadrus* (recuento de partículas de 7.0 e+10); 5) pmEV *S. pyogenes* (recuento de partículas de 3.0 e+10); 6) pmEV *P. benzoelyticum* (recuento de partículas de 3.0 e+10); 7) pmEV *Hungatella sp.* (recuento de partículas de 7.0 e+10); 8) pmEV *S. aureus* (recuento de partículas de 7.0 e+10); y 9) pmEV *R. gnavus* (recuento de partículas de 7.0 e+10). Se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) los anticuerpos a 200 µg/ratón

(100 µl de volumen final) cada cuatro días, comenzando el día 1, y se inyectaron pmEV por vía intravenosa (i.v.) diariamente, comenzando el día 1 hasta la conclusión del estudio y tumores medidos para el crecimiento. El día 11 todos los grupos de las pmEV mostraron una inhibición del crecimiento del tumor (**Figuras 1-7**). Los grupos de pmEV *B. animalis ssp. lactis* (**Figura 1**), pmEV *Anaerostipes hadrus* (**Figura 2**), pmEV *S. pyogenes* (**Figura 3**), pmEV *P. benzoelyticum* (**Figura 4**) y pmEV *Hungatella sp.* (**Figura 5**) todos mostraron la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de anti-PD-1, mientras que los grupos de pmEV *S. aureus* y pmEV *R. gnavus* mostraron inhibición de crecimiento tumoral mejor que la que se observa en el grupo de anti-PD-1 (**Figuras 6 y 7**). En un estudio similar de respuesta a la dosis, la dosis más alta de pmEV *B. animalis lactis* demostró la mayor eficacia, aunque las pmEV *Megasphaera massiliensis* mostraron una eficacia significativa en una dosis más baja (**Figura 8**). Se realiza la prueba de Welch para el tratamiento frente al vehículo.

[384] Otro estudio demostró una eficacia significativa de las pmEV más temprano que el día 11. Los grupos de pmEV *R. gnavus* 7.0E+10 (**Figuras 9 y 10**), pmEV *B. animalis ssp. lactis* 2.0E+11 (**Figuras 11 y 12**) y pmEV *P. distasonis* 7.0E+10 (**Figuras 13 y 14**) todos mostraron eficacia de forma temprana, el día 9.

Ejemplo 3: Administración de las composiciones de pmEV para tratar modelos de tumor de ratón

[385] Como se describe en el Ejemplo 2, se genera un modelo de cáncer de ratón inyectando por vía subcutánea una línea celular tumoral de una muestra de tumor derivada del paciente y permitiendo que se injerte en ratones sanos. Los métodos proporcionados en el presente documento se pueden realizar usando una de varias estirpes celulares del tumor

diferentes que incluyen, a mero título enunciativo: Células B16-F10 o B16-F10-SIY como modelo ortotópico de melanoma, células Panc02 como modelo ortotópico de cáncer pancreático (Maletzki et al., 2008, Gut 57:483-491), células LLC1 como modelo ortotópico de cáncer de pulmón y RM-1 como modelo ortotópico de cáncer de próstata. Como ejemplo, pero sin limitación, los métodos para estudiar la eficacia de las pmEV en el modelo B16-F10 se proporcionan en profundidad el presente documento.

[386] Un modelo de melanoma espontáneo de ratón con melanoma espontáneo con una frecuencia metastásica muy alta se usa para evaluar la capacidad de las bacterias para reducir el crecimiento tumoral y la propagación de metástasis. Las pmEV elegidas para este ensayo son composiciones que muestran activación mejorada de subconjuntos de células inmunes y estimulan la destrucción mejorada de células tumorales *in vitro*. Se obtiene la línea celular de melanoma de ratón B16-F10 de la ATCC. Las células se cultivan *in vitro* como una monofase en medio RPMI, complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales que crecen exponencialmente se recogen mediante tripsinización, se lavan tres veces con PBS frío 1x, y se prepara una suspensión de 5E6 células/ml para la administración. Se usan ratones C57BL/6 hembra para este experimento. Los ratones tienen 6-8 semanas de edad y pesan aproximadamente 16-20 g. Para el desarrollo del tumor, cada ratón se inyecta SC en el flanco con 100 µl de la suspensión de células B16-F10. Se anestesia a los ratones con ketamina y xilazina antes del trasplante de células. Los animales utilizados en el experimento pueden comenzar con un tratamiento antibiótico 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 potable del día 2 al 5 y una inyección intraperitoneal de clindamicina (10 mg/kg) el día 7 después de la inyección del tumor.

[387] Se mide el tamaño del tumor primario del flanco con un calibrador cada 2-3 días y el volumen del tumor se calcula usando la siguiente fórmula: volumen del tumor = ancho del tumor × longitud del tumor × 0.5. Después de que el tumor primario alcanza aproximadamente 100 mm³, los animales se clasifican en varios grupos según su peso corporal. Luego se toman aleatoriamente los ratones de cada grupo y se asignan a un grupo de tratamiento. Las composiciones de las pmEV se preparan como se describió anteriormente. Los ratones se inocularon oralmente por sonda gástrica con aproximadamente 7.0e+09 a 3.0e+12 partículas de pmEV. Como alternativa, las pmEV se administran por vía intravenosa. Los ratones reciben las pmEV diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente, o en cualquier otro programa de dosificación durante el período de tratamiento. Se pueden inyectar por vía intravenosa a los ratones con las pmEV en la vena de la cola o se inyectan directamente en el tumor. Se puede inyectar a los ratones pmEV, con o sin bacterias vivas, con o sin bacterias destruidas o inactivadas/debilitadas. Pueden inyectarse o administrarse oralmente por sonda gástrica a los ratones semanalmente o una vez al mes. Los ratones pueden recibir combinaciones de pmEV purificadas y bacterias vivas para maximizar el potencial de matar tumores. Se alojan todos los ratones en condiciones específicas libres de patógenos siguiendo protocolos aprobados. El tamaño del tumor, el peso del ratón y la temperatura corporal se controlan cada 3-4 días y los ratones se sacrifican humanamente 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 toman muestras de sangre semanalmente y se realiza una necropsia completa en condiciones estériles al terminar el protocolo.

[388] Pueden visualizarse las células cancerosas fácilmente en el modelo de melanoma B16-F10 de ratón debido a su producción de melanina. Siguiendo protocolos estándar, se recogen muestras de tejido de ganglios linfáticos y órganos de la región del cuello y el tórax y se analiza la presencia de micro y macro metástasis usando la siguiente regla de clasificación. Un órgano se clasifica como positivo para metástasis si se encuentran al menos dos lesiones micro-metastásicas y una macro-metastásica por ganglio linfático u órgano. Las micro-metástasis se detectan al teñir las secciones de tejido linfoide embebido en parafina con hematoxilina-eosina siguiendo protocolos estándar conocidos por un experto en la técnica. El número total de metástasis se correlaciona con el volumen del tumor primario y se observa que el volumen del tumor se correlaciona significativamente con el tiempo de crecimiento tumoral y el número de macro y micro metástasis en los ganglios linfáticos y los órganos viscerales y también con la suma de todas las metástasis observadas. Se identifican veinticinco sitios metastásicos diferentes como se describió previamente (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).

[389] Se analizan adicionalmente las muestras de tejido tumoral para detectar linfocitos infiltrantes de tumores. Pueden aislarse los linfocitos T citotóxicos CD8 + mediante FACS y luego pueden analizarse adicionalmente usando micromatrices p/MHC de clase I personalizadas para

revelar su especificidad antigénica (véase por ejemplo Deviren G., et al., Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays, J. Mol. Recognit., 2007 enero-febrero;20(1):32-8). Los linfocitos T CD4+ pueden analizarse usando micromatrices personalizadas p/MHC de clase II.

[390] En varios puntos de tiempo, se sacrifican ratones y se pueden extirpar tumores, ganglios linfáticos u otros tejidos para análisis de citometría de flujo *ex vivo* usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tumores se disocian usando un cóctel de enzimas de disociación tumoral Miltenyi según las instrucciones del fabricante. Se registran los pesos de los tumores y se colocan los tumores se cortan y luego en tubos de 15 ml que contienen el cóctel de enzimas y se colocan en hielo. Luego, las muestras se colocan en un agitador suave a 37 °C durante 45 minutos y se inactivan con hasta 15 ml de RPMI completo. Cada suspensión celular se cuela a través de un filtro de 70 µm en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos. Se resuspenden las células en tampón FACS y se lavan para eliminar los restos restantes. Si es necesario, se vuelven a filtrar las muestras a través de un segundo filtro de 70 µm en un tubo nuevo. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de células paninmunes CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Rorγt, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se

limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo con células inmunes obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunes purificadas infiltradas de tumor CD45+ obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones tumorales para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[391] También se realiza el mismo experimento con un modelo de ratón de metástasis múltiples de melanoma pulmonar. La línea celular de melanoma de ratón B16-BL6 se obtiene de la ATCC y las células se cultivan *in vitro* tal como se describe anteriormente. Se usan ratones C57BL/6 hembra para este experimento. Los ratones tienen 6-8 semanas de edad y pesan aproximadamente 16-20 g. Para el desarrollo del tumor, cada ratón se inyecta en la vena de la cola con 100 µl de una suspensión de 2E6 células/ml de células B16-BL6. Las células tumorales que se injertan tras la inyección IV terminan en los pulmones.

[392] Se sacrifican humanamente los ratones después de 9 días. Se pesan y se analizan los pulmones para detectar la presencia de nódulos pulmonares en la superficie pulmonar. Se blanquean los pulmones extraídos con la solución de Fekete, que no blanquea los nódulos tumorales debido a la melanina en las células B16, aunque una pequeña fracción de los nódulos es amelanótica (es decir, blanca). Se cuenta cuidadosamente el número de nódulos tumorales para determinar la carga tumoral en los ratones. Normalmente, se encuentran 200-250 nódulos pulmonares en los pulmones de los ratones del grupo de control (es decir, sonda de PBS).

[393] Se calcula el porcentaje de carga tumoral para los tres grupos de tratamiento. Se define el porcentaje

de carga tumoral como el número medio de nódulos pulmonares en las superficies pulmonares de los ratones que pertenecen a un grupo de tratamiento dividido por el número medio de nódulos pulmonares en las superficies pulmonares de los ratones del grupo de control.

[394] Las biopsias tumorales y las muestras de sangre se envían para el análisis metabólico mediante las técnicas LCMS u otros métodos conocidos en la técnica. Los niveles diferenciales de aminoácidos, azúcares, lactato, entre otros metabolitos, entre los grupos de prueba demuestran la capacidad de la composición microbiana para alterar el estado metabólico del tumor.

Secuenciación de ARN para determinar el mecanismo de acción

[395] Se purifican las células dendríticas de tumores, placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos. Se lleva a cabo el análisis de secuenciación de ARN y se analiza según las técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica (Z. Hou. *Scientific Reports*. 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015)). En el análisis, se coloca atención específica en los genes de la vía inflamatoria innata, incluidos los TLR, CLR, NLR, STING, citocinas, quimiocinas, procesamiento de antígenos y vías de presentación, presentación cruzada y coestimulación de linfocitos T.

[396] En lugar de ser sacrificados, pueden reexponerse algunos ratones con una inyección de células tumorales en el costado contralateral (u otra área) para determinar el impacto de la respuesta de memoria del sistema inmune en el crecimiento del tumor.

Ejemplo 4: Administración de las pmEV para tratar los modelos de tumor de ratones en combinación con la inhibición de PD-1 o PD-L1

[397] Para determinar la eficacia de las pmEV en modelos de tumor de ratón, en combinación con inhibición de PD-1 o PD-L1, se puede usar un modelo de tumor de ratón como se describe arriba.

[398] Las pmEV se evalúan por su eficacia en el modelo de tumor de ratón, ya sea solo o en combinación con células bacterianas completas y con o sin anti-PD-1 o anti-PD-L1. Las pmEV, células bacterianas, y/o anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administran en varios puntos temporales y en dosis variadas. Por ejemplo, el día 10 después de la inyección del tumor, o después de que el volumen del tumor alcanza 100 mm³, se tratan los ratones solo con pmEV o en combinación con anti-PD-1 o anti-PD-L1.

[399] Las pmEV se pueden administrar a los ratones por vía oral, intravenosa o intratumoral. Por ejemplo, se inyecta a algunos ratones por vía intravenosa con cualquiera entre 7.0e+09 y 3.0e+12 partículas de pmEV. Aunque algunos ratones reciben las pmEV mediante inyección i.v., otros pueden recibirlas mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), mediante administración por vía nasal, por sonda oral u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a 1-1x10¹²:1 (pmEV: células bacterianas).

[400] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV. También se inyectan a algunos grupos de ratones con dosis efectivas de inhibidor del punto de control. Por ejemplo, los ratones reciben 100 μ g de mAb anti-PD-L1 (clon 10f.9g2, BioXCell) u otro mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 en 100 μ l de PBS, y algunos ratones reciben el vehículo y/u otro control apropiado (por ejemplo control de anticuerpos). Se inyectan el mAb a los ratones 3, 6, y 9 días después de la inyección inicial. Para evaluar si la inhibición del punto de control y la inmunoterapia con pmEV tienen un efecto antitumoral aditivo, se incluyen ratones control que reciben mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 en el panel de control estándar. Se pueden evaluar los puntos finales primarios (tamaño del tumor) y secundarios (linfocitos infiltrantes del tumor y análisis de citocinas), y algunos grupos de ratones se vuelven a plantear con una posterior inoculación de células tumorales para evaluar el efecto del tratamiento en la respuesta de la memoria.

Ejemplo 5: pmEV en un modelo de ratón de hipersensibilidad del tipo retardado (DTH)

[401] La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es un modelo animal de dermatitis atópica (o dermatitis alérgica de contacto), según lo revisado por 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 han usado varias variaciones del modelo de DTH y se conocen bien 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).

[402] Se puede inducir DTH en una variedad de cepas de ratas y ratones usando varios haptenos o antígenos, por ejemplo, un antígeno emulsionado con un adyuvante. La DTH se caracteriza por la sensibilización, así como una reacción mediada por linfocitos T específicos de antígeno que produce eritema, edema e infiltración celular, especialmente infiltración de células presentadoras de antígeno (APC), eosinófilos, linfocitos T CD4+ activados y linfocitos Th2 que expresan citocinas.

[403] En general, los ratones se preparan con un antígeno administrado en el contexto de un adyuvante (p. ej., adyuvante completo de Freund) para inducir una respuesta inmunitaria secundaria (o memoria) medida por la inflamación y el título de anticuerpos específicos de antígeno.

[404] La dexametasona, un corticoesteroide, es un antiinflamatorio conocido que mejora las reacciones de DTH en ratones, y sirve como control positivo para suprimir la inflamación en este modelo (Taube y Carlsten, "Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice". *Inflamm Res*. 2000. 49(10): 548-52). Para el grupo de control positivo, se preparó una solución madre de 17 mg/ml de dexametasona el día 0 diluyendo 6.8 mg de dexametasona en 400 µl de etanol

al 96 %. Para cada día de dosificación, se prepara una solución de trabajo diluyendo la solución madre 100 veces en PBS estéril para obtener una concentración final de 0.17 mg/ml en un vial con tabique para la administración intraperitoneal. Los ratones tratados con dexametasona reciben 100 µl de dexametasona i.p. (5 ml/kg de una solución de 0.17 mg/ml). La sacarosa congelada sirve como control negativo (vehículo). En el estudio descrito a continuación, se administraron las dosis diarias del vehículo, dexametasona (control positivo) y pmEV.

[405] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en el modelo de ratón de DTH, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6 de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor. A los grupos de ratones se les administran cuatro inyecciones subcutáneas (s.c.) en cuatro sitios en la parte posterior (superior e inferior) de antígeno (p. ej., ovoalbúmina (OVA)) o hemocianina de lapa californiana (KLH) a una dosis eficaz (p. ej., 50 µl de volumen total por sitio). Para una respuesta de DTH, a los animales se les inyectan por vía intradérmica (i.d.) en las orejas bajo anestesia con ketamina/xilazina (aproximadamente 50 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente). Algunos ratones sirven como animales de control. Se inducen algunos grupos de ratones con 10 µl por oreja (control del vehículo (DMSO al 0.01 % en solución salina) en la oreja izquierda y antígeno (21.2 µg (12 nmol) en la oreja derecha) en el día 8. Para medir la inflamación de la oreja, se mide el espesor de la oreja de los animales sujetándolos con la mano usando un micrómetro Mitutoyo. Se mide el espesor de la oreja antes de la inducción intradérmica como el nivel basal para cada animal individual. Posteriormente, se mide el espesor de la

oreja dos veces después de la inducción intradérmica, aproximadamente a las 24 y 48 horas (es decir, los días 9 y 10).

[406] Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, o bien en el momento del cebado o bien alrededor del tiempo de la inducción de DTH. Por ejemplo, pueden administrarse las pmEV al mismo momento que las inyecciones subcutáneas (día 0), o pueden administrarse antes de, o después de, la inyección intradérmica. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0×10^9 a 3.0×10^{12} partículas de pmEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de inyección i.v., otros ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal, la administración oral, administración tópica, inyección intradérmica (i.d.), u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 0), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}:1$ (pmEV: células bacterianas).

[407] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas

puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[408] Para las pmEV, la proteína total se mide usando ensayos Bio-rad (n.º de CAT 5000205) realizados por instrucciones del fabricante.

[409] Se prepararon recientemente la emulsión de hemocianina de lapa californiana (KLH) y adyuvante de Freund completo (CFA) en el día de inmunización (día 0). Con este fin, se pesan 8 mg de polvo KLH y se resuspende completamente en 16 ml de solución salina. Se preparó una emulsión mezclando el KLH/solución salina con un volumen igual de solución de CFA (p. ej., 10 ml de KLH/solución salina + 10 ml de solución de CFA) usando jeringas y un conector luer lock. Se mezcló vigorosamente KLH y CFA durante varios minutos para formar una emulsión de color blanco para obtener la máxima estabilidad. Se realizó una prueba de la bota para controlar si se obtenía una emulsión homogénea.

[410] El día 0, ratones hembra C57Bl/6J, aproximadamente 7 semanas de edad, se prepararon con antígeno KLH en CFA mediante inmunización subcutánea (4 sitios, 50 µl por sitio). Se evaluaron las pmEV *P. histicola* administradas por vía oral en dosificaciones bajas ($6.0E+07$), medias ($6.0E+09$) y elevadas ($6.0E+11$).

[411] El día 8, los ratones se desafiaron por vía intradérmica (i.d.) con 10 µg de KLH en solución salina (en un volumen de 10 µl) en el oído izquierdo. El grosor de la oreja se midió 24 horas después de la exposición al antígeno (**Figura 15**). Según lo determinado por el grosor de la oreja,

las pmEV *P. histicola* fueron eficaces al suprimir la inflamación.

[412] Para estudios sobre inflamación futuros, pueden tratarse algunos grupos de ratones con agente antiinflamatorio o (p. ej. anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF u otro tratamiento) y/o un tratamiento apropiado de control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[413] En varios puntos temporales, se pueden tomar muestras de suero. Se pueden sacrificar otros grupos de ratones y pueden extirparse los ganglios linfáticos, el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), el intestino delgado, el colon y otros tejidos para estudios histológicos, histológicos ex vivo, análisis citométrico de flujo de citocinas y/o usando métodos conocidos en la técnica. Se desangran algunos ratones desde el plexo orbital con anestesia con O₂/CO₂ y se realizan ensayos ELISA.

[414] Los tejidos se pueden disociar usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de células panmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Rorγ-t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, TNFa, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFNγ, GM-CSF, G-CSF, M-CSF,

MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citocinas puede realizarse en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[415] Se pueden extirpar las orejas de los animales sacrificados y se colocan en un cóctel inhibidor de proteasa frío sin EDTA (Roche). Se homogenizan las orejas usando disrupción con perlas y se analiza la presencia de diversas citocinas en los sobrenadantes mediante el kit Luminex (EMD Millipore) según las instrucciones del fabricante. Además, se disocian los ganglios linfáticos cervicales a través de un filtro celular, se lavan y se tiñen para FoxP3 (PE-FJK-16s) y CD25 (FITC-PC61.5) usando métodos conocidos en la técnica.

[416] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de DTH, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse con el antígeno de exposición un tiempo después y se analizaron a los ratones por su propensión a DTH y gravedad de la respuesta.

Ejemplo 6: pmEV en un modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

[417] EAE es un modelo animal bien estudiado de esclerosis múltiple, según lo revisado por 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 con mielina, mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T encefalitogénicas activadas, o el uso de ratones

transgénicos TCR susceptibles a EAE, como se discute en Mangalam *et al.*, (Two discreet 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).

[418] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en el modelo de roedor de EAE, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Además, las pmEV se pueden administrar por vía oral o mediante administración intravenosa. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY). A los grupos de ratones se les administran dos inyecciones subcutáneas (s.c.) en dos sitios en la parte posterior (superior e inferior) de 0.1 ml de glicoproteína de oligodendrocitos 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 mató la emulsión de Mycobacterium tuberculosis H37Ra/ml). Aproximadamente 1-2 horas después de lo anterior, se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) a los ratones con 200 ng de toxina de tos ferina (PTx) en 0.1 ml de PBS (2 ug/ml). Se administra una inyección IP adicional de PTx el día 2. Como alternativa, se usa una cantidad apropiada de un péptido de mielina alternativo (p. ej., proteína proteolípida (PLP)) para inducir EAE. Algunos animales sirven como controles sin tratar. La gravedad de EAE se evalúa y se asigna un puntuación de discapacidad diariamente a partir del día 4 según los métodos conocidos en la técnica (Mangalam *et al.* 2012).

[419] Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, o bien en el momento de la inmunización o bien después de la inmunización con EAE. Por ejemplo, pueden

administrarse pmEV al mismo tiempo que la inmunización (día 1), o pueden administrarse ante los primeros signos de discapacidad (p. ej., cola flácida), o durante EAE grave. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0×10^9 a 3.0×10^{12} partículas de pmEV por dosis. Aunque algunos ratones reciben las pmEV mediante inyección i.v., otros pueden recibirlas mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), mediante administración por vía nasal, por sonda oral u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}:1$ (pmEV: células bacterianas).

[420] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[421] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios adicionales o agentes terapéuticos EAE (por ejemplo anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, vitamina D, esteroides, agentes antiinflamatorios u otros tratamientos), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[422] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[423] En diversos puntos de tiempo, se sacrifican los ratones y pueden extirparse los sitios de inflamación (p. ej., cerebro y médula espinal), los ganglios linfáticos u otros tejidos para un análisis citológico *ex vivo* histológico, de citocinas y/o de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no

se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo con células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas del sistema nervioso central (SNC) CD45+ purificadas obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[424] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse con un desencadenante de la enfermedad (p. ej., linfocitos T encefalitogénicos activados o inyección de nuevo de péptidos inductores de EAE). Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad de EAE después de la reexposición.

Ejemplo 7: pmEV en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA)

[425] La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal comúnmente utilizado para estudiar la artritis reumatoide (AR), según lo descrito por Caplazi *et al.* (Mouse models of rheumatoid arthritis. *Veterinary Pathology*. 1 de sept. de 2015. 52(5): 819-826) (véase 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 de oct. de 2015; 5(20): e1626).

[426] Entre otras versiones del modelo de roedor de CIA, un modelo implica inmunizar ratones HLA-DQ8 Tg con colágeno de tipo II de pollo como se describe por Taneja *et al.* (*J. Immunology*. 2007. 56: 69-78; véase también Taneja *et*

al. J. Immunology 2008. 181: 2869-2877; y Taneja et al. Arthritis Rheum., 2007. 56: 69-78). La purificación del CII de pollo ha sido descrita por Taneja et al. (Arthritis Rheum., 2007. 56: 69-78). Se monitorizan los ratones para detectar el comienzo y la progresión de la enfermedad de la CIA después de la inmunización, y se evalúa la gravedad de la enfermedad y "califica" según lo descrito por Wooley, J. Exp. Med. 1981. 154: 688-700.

[427] Se inmunizan los ratones para la inducción de CIA y se separan en varios grupos de tratamiento. Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en CIA, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

[428] Se inicia el tratamiento con pmEV en el momento de la inmunización con colágeno o después de la inmunización. Por ejemplo, en algunos grupos, se pueden administrar las pmEV en el mismo momento que la inmunización (día 1) o se pueden administrar las pmEV ante los primeros signos de enfermedad o ante la aparición de síntomas graves. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0×10^9 a 3.0×10^{12} partículas de pmEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres

días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[429] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[430] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios adicionales o agentes terapéuticos CIA (p. ej., anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, vitamina D, esteroides, agentes antiinflamatorios u otros tratamientos), y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[431] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[432] En diversos puntos de tiempo, se obtienen muestras de suero para evaluar los niveles de anticuerpos IgG CII anti-pollo y anti-ratón usando un ELISA estándar

(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). Además, se sacrifica a algunos ratones y pueden extirparse los sitios de inflamación (por ejemplo, la cápsula sinovial), los ganglios linfáticos u otros tejidos para el análisis histológico, de citocinas y/o por citometría de flujo utilizando métodos conocidos en la técnica. Se analizan el líquido sinovial y la cápsula sinovial para determinar la infiltración de células plasmáticas y la presencia de anticuerpos usando técnicas conocidas en la técnica. Además, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante para examinar los perfiles de los infiltrados celulares. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas en la cápsula sinovial CD45 + obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la

inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[433] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse con un desencadenante de la enfermedad (p. ej., inyección de nuevo con péptidos inductores de CIA). Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad de CIA después del reexposición.

Ejemplo 8: pmEV en un modelo de colitis de ratón

[434] La colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) es un modelo animal de colitis bien estudiado, según lo revisado por 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 Chassaing *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 4 de feb de 2014; 104: Unidad 15.25).

[435] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de colitis inducida por DSS, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros agentes antiinflamatorios.

[436] Los grupos de ratones se tratan con DSS para inducir colitis como se conoce en la técnica (Randhawa *et 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, se obtienen ratones C57Bl/6 macho de 6-8 semanas de edad de Charles River Labs, Taconic, u otro proveedor. Se induce colitis añadiendo DSS al 3 % (MP Biomedicals, n.º de Cat. 0260110) al agua de bebida. Algunos ratones no reciben DSS en el agua de bebida y sirven como controles sin tratar. Algunos ratones reciben

agua durante cinco (5) días. Algunos ratones pueden recibir DSS por una duración más corta o más de cinco (5) días. Se controlan los ratones y se califican usando un índice de actividad de discapacidad conocido en la técnica basado en la pérdida de peso (p. ej., sin pérdida de peso (puntuación 0); 1-5 % de pérdida de peso (puntuación 1); 5-10 % de pérdida de peso (puntuación 2)); consistencia de las heces (por ejemplo normal (puntuación 0); heces sueltas (puntuación 2); diarrea (puntuación 4)); y sangrado (p. ej., sin sangre (puntuación 0), hemocultivo positivo (puntuación 1); hemocultivo positivo y sangrado de sedimento visual (puntuación 2); sangre alrededor del ano, sangrado severo (puntuación 4)).

[437] Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, o bien el día 1 de la administración de DSS, o bien en algún momento posterior. Por ejemplo, pueden administrarse las pmEV al mismo tiempo que la iniciación de DSS (día 1), o pueden administrarse tras los primeros signos de la enfermedad (por ejemplo pérdida de peso o diarrea), o durante las fases de colitis grave. Se observan diariamente el peso, la morbilidad, la supervivencia, la presencia de diarrea y/o heces con sangre en los ratones.

[438] Las pmEV se administran en varias dosis y a intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 y 3.0×10^{12} partículas de las pmEV. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres

días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[439] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[440] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agente antiinflamatorio adicional o (por ejemplo anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, u otro tratamiento), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[441] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones reciben DSS sin recibir antibióticos de antemano.

[442] En diversos puntos de tiempo, los ratones se someten a endoscopia por video usando un endoscopio para animales pequeños (Karl Storz Endoskope, Alemania) bajo anestesia con isoflurano. Se registran imágenes fijas y

videos para evaluar la extensión de la colitis y la respuesta al tratamiento. Se puntúa la colitis usando criterios conocidos en la técnica. Se recoge el material fecal para estudio.

[443] En varios puntos de tiempo, se sacrifican ratones y se recogen el colon, el intestino delgado, el bazo y los ganglios linfáticos (p. ej., los ganglios linfáticos mesentéricos). Adicionalmente, se extrae la sangre en tubos de separación de suero. Se evalúa el daño tisular mediante estudios histológicos que evalúan, pero sin limitación, arquitectura de la cripta, grado de infiltración de células inflamatorias y agotamiento de células caliciformes.

[444] Pueden extirparse el tracto gastrointestinal (GI), los ganglios linfáticos y/u otros tejidos para un análisis histológico, de citocinas y por citometría de flujo *ex vivo* usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se recogen y pueden disociarse los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en

células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del tubo GI CD45+ obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[445] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección frente a la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a un desencadenante de la enfermedad. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la gravedad de colitis después de la reexposición.

Ejemplo 9: pmEV en un modelo de ratón de diabetes tipo 1 (T1D)

[446] La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca a los islotes de Langerhans del páncreas, destruyendo así la capacidad del cuerpo para producir insulina.

[447] Hay diversos modelos de modelos animales de T1D, según la revisión de 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*. jun de 2012; 166(3): 877-894. Existen modelos para T1D inducida químicamente, T1D inducida por patógenos, así como modelos en los que los ratones desarrollan espontáneamente T1D.

[448] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de T1D, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

[449] Dependiendo del método de inducción de T1D y/o si el desarrollo de T1D es espontáneo, el tratamiento

con pmEV se inicia en algún momento, o bien en el momento de la inducción o bien después de la inducción, o antes del inicio (o tras el inicio) de T1D que se produce de manera espontánea. pmEV se administra en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0×10^9 a 3.0×10^{12} partículas de pmEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día, mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[450] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[451] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con tratamientos adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo de control) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[452] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[453] Se controla la glucosa en sangre quincenalmente antes del inicio del experimento. En diversos puntos de tiempo posteriores, se mide la glucosa en sangre sin ayuno. En diversos puntos de tiempo, se sacrifican los ratones y pueden extirparse el sitio como el páncreas, los ganglios linfáticos u otros tejidos para un análisis citológico ex vivo histológico, de citocinas y/o de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias de infiltración de tejidos purificadas obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control. También puede evaluarse la producción de anticuerpos mediante ELISA.

[454] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a un desencadenante de la enfermedad, o evaluarse la susceptibilidad a la recaída. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la aparición de diabetes y la gravedad después de la reexposición (o recaída espontánea).

Ejemplo 10: pmEV en un modelo de ratón de colangitis esclerosante primaria (PSC)

[455] La colangitis esclerosante primaria (PSC) es una enfermedad hepática crónica que daña lentamente los conductos biliares y causa una cirrosis terminal. Se asocia con enteropatía inflamatoria (EI).

[456] Existen varios modelos animales de PSC, según la revisión de Fickert et al. (Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). J Hepatol. jun. de 2014 60(6): 1290-1303; véase también Pollheimer y 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 enfermedad en los modelos de PSC incluye inducción química (p. ej.,

colangitis inducida por 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocollidina (DDC)), inducida por patógenos (por ejemplo *Cryptosporidium parvum*), obstrucción biliar experimental (p. ej., ligación de conducto biliar común (CBDL)), y modelo de ratón transgénico de lesión biliar impulsada por antígeno (p. ej., ratones transgénicos Ova-Bil). Por ejemplo, se realiza la ligación del conducto biliar según lo descrito por Georgiev et al. (Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. Br J Surg. 2008. 95(5): 646-56), o se induce la enfermedad por la exposición a DCC según lo descrito por Fickert et al. (A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. Am J Path. Vol 171(2): 525-536).

[457] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de PSC, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de algún otro agente terapéutico.

Colangitis inducida por DCC

[458] Por ejemplo, se obtienen ratones C57bl/6 de 6-8 semanas de edad de Taconic u otro proveedor. Se alimentan los ratones con una dieta complementada con DCC al 0.1 % durante diversas duraciones. Algunos grupos reciben complementos de DCC durante 1 semana, otros durante 4 semanas, otros durante 8 semanas. Algunos grupos de ratones pueden recibir una dieta complementada con DCC durante un periodo de tiempo y luego se les permite recuperarse, y reciben a partir de entonces una dieta normal. Puede estudiarse la capacidad de estos ratones para recuperarse de la enfermedad y/o su susceptibilidad a las recaídas tras la exposición posterior a DCC. Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, o bien en el momento de la alimentación con DCC o posterior a la exposición inicial a DCC. Por ejemplo, pueden administrarse las pmEV el día 1 o

pueden administrarse un tiempo después. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Como alternativa, algunos ratones pueden recibir entre $7.0e+09$ y $3.0e+12$ partículas de pmEV. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[459] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[460] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con agentes adicionales y/o un control apropiado (p. ej.,

vehículo o anticuerpo) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[461] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos. En diversos puntos de tiempo, se analizan las muestras de suero para ALT, AP, bilirrubina, y niveles de ácido biliar (BA) en suero.

[462] En diversos puntos de tiempo, se sacrifican ratones, se registran los pesos corporal y hepático, y pueden extirparse sitios de inflamación (por ejemplo hígado, intestino delgado, bazo), ganglios linfáticos u otros tejidos para caracterización histomorfológica *ex vivo*, citocina y/o análisis de citometría de flujo utilizando 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, se tiñen los conductos biliares para detectar la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MadCAM-1. Se tiñen algunos tejidos para el examen histológico, mientras que otros se disocian utilizando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluyen el marcador de células paninmunes CD45, los marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3,

Roryt, Granzima 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 de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 las citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas *ex vivo*.

[463] Se prepara el tejido hepático para el análisis histológico, por ejemplo, usando tinción con rojo sirio seguido de cuantificación del área fibrótica. Al final del tratamiento, se extrae sangre para el análisis plasmático de las enzimas hepáticas, por ejemplo, AST o ALT, y para determinar los niveles de bilirrubina. Puede medirse el contenido hepático de hidroxiprolina usando protocolos establecidos. Puede realizarse el análisis de expresión génica hepática de marcadores de inflamación y fibrosis mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, MCP-1, alfa-SMA, Coll1a1, y TIMP. Las mediciones de metabolitos pueden realizarse en plasma, tejidos y muestras fecales usando métodos de metabolómica establecidos. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones hepáticas para medir neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

[464] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección contra la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a DCC en otro momento. Se analizan los ratones para determinar la

susceptibilidad a la colangitis y la gravedad de colangitis después de la reexposición.

Colangitis inducida por BDL

[465] Como alternativa, se someten a prueba pmEV para determinar su eficacia en colangitis inducidas por BDL. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6J con 6-8 semanas de edad de Taconic u otro proveedor. Después de un período de aclimatación, se somete a los ratones a un procedimiento quirúrgico para realizar una ligación del conducto biliar (BDL). Algunos animales de control reciben una cirugía simulada. El procedimiento de BDL causa daño hepático, inflamación y fibrosis a los 7-21 días.

[466] Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, o bien en el momento de la cirugía o bien algún tiempo después de la cirugía. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0×10^9 a 3.0×10^{12} partículas de pmEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones reciben las pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción

de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[467] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[468] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con agentes adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[469] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos. En diversos puntos de tiempo, se analizan las muestras de suero para ALT, AP, bilirrubina, y niveles de ácido biliar (BA) en suero.

[470] En diversos puntos de tiempo, se sacrifican ratones, se registran los pesos corporal y hepático, y pueden extirparse sitios de inflamación (por ejemplo hígado, intestino delgado, bazo), ganglios linfáticos u otros tejidos para caracterización histomorfológica ex vivo, citocina y/o análisis de citometría de flujo utilizando 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, se tiñen los conductos biliares para detectar la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MadCAM-1. Se tiñen algunos tejidos para el examen histológico, mientras que otros se disocian utilizando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluyen el marcador de células paninmunes CD45, los marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima 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 de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 las citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas ex vivo.

[471] Se prepara el tejido hepático para el análisis histológico, por ejemplo, usando tinción con rojo sirio seguido de cuantificación del área fibrótica. Al final del tratamiento, se extrae sangre para el análisis plasmático de las enzimas hepáticas, por ejemplo, AST o ALT, y para determinar los niveles de bilirrubina. Puede medirse el contenido hepático de hidroxiprolina usando protocolos

establecidos. Puede realizarse el análisis de expresión génica hepática de marcadores de inflamación y fibrosis mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, MCP-1, alfa-SMA, Col1a1, y TIMP. Las mediciones de metabolitos pueden realizarse en plasma, tejidos y muestras fecales usando métodos de metabolómica establecidos. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones hepáticas para medir neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

[472] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, puede analizarse la recuperación de algunos ratones.

Ejemplo 11: pmEV en un modelo de ratón de esteatohepatitis no alcohólica (ENA)

[473] La esteatohepatitis no alcohólica (ENA) es una forma grave de la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), donde la acumulación de grasa hepática (esteatosis) y la inflamación provocan lesiones hepáticas y muerte de células hepatocitarias (hinchazón).

[474] Existen diversos modelos animales de ENA, tal como se revisa por Ibrahim *et al.* (Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflamm. Dig Dis Sci. mayo 2016. 61(5): 1325-1336; véase también Lau *et al.* Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances enero 2017 241(1): 36-44).

[475] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de ENA, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otro agente terapéutico. Por ejemplo, los ratones C57Bl/6J de 8-10 semanas de edad, obtenidos de Taconic (Germantown,

NY), u otro proveedor, se colocan en una dieta deficiente en metionina colina (MCD) durante un período de 4-8 semanas durante el cual se desarrollan las características ENA, incluyendo la esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis.

[476] Las pmEV de *P. histicola* se someten a prueba para determinar su eficacia en un modelo de ENA de ratón, o bien solo o bien en combinación entre sí, en proporciones variables, con o sin la adición de otro agente terapéutico. Por ejemplo, los ratones C57Bl/6J de 8 semanas de edad, obtenidos de Charles River (Francia), u otro proveedor, se aclimatan durante un período de 5 días, se aleatorizan en grupos de 10 ratones basados en peso corporal, y se colocan en una dieta con deficiencia de metionina y colina (MCD) por ejemplo A02082002B de Research Diets (EE. UU.), durante un período de 4 semanas durante el cual se desarrollaron características de ENA, que incluyen esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis. Se alimentan los ratones de control de comida con una dieta de comida normal, por ejemplo RM1 (E) 801492 de SDS Diets (R.U.). El control de alimentos, la dieta MCD y el agua se proporcionan a voluntad.

[477] Un sistema de puntuación NAS adaptado de Kleiner et al. (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. jun. de 2005 41(6): 1313-1321) se usa para determinar el grado de esteatosis (puntuación 0-3), inflamación lobular (puntuación 0-3), hinchazón de hepatocitos (puntuación 0-3) y fibrosis (puntuación 0-4). Se puede calcular una puntuación NAS de ratón individual sumando la puntuación de esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis (puntuación de 0-13). Además, los niveles de plasma AST y ALT se determinan utilizando un instrumento Pentra 400 de Horiba (EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. Los niveles de colesterol total hepático, triglicéridos,

ácidos grasos, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa también se determinan utilizando métodos conocidos en la técnica.

[478] En otros estudios, el análisis de la expresión génica hepática de inflamación, fibrosis, esteatosis, estrés ER, o marcadores de estrés oxidativo puede realizarse mediante qRT-PCR utilizando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero sin limitación, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, α -SMA, Col11a1, CHOP, y NRF2.

[479] En otros estudios, el análisis de la expresión génica hepática de inflamación, fibrosis, esteatosis, estrés ER, o marcadores de estrés oxidativo puede realizarse mediante qRT-PCR utilizando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero sin limitación, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, α -SMA, Col11a1, CHOP, y NRF2.

[480] El tratamiento con pmEV se inicia en algún momento, ya sea al comienzo de la dieta, o en algún momento después de la iniciación de la dieta (p. ej., una semana después). Por ejemplo, pueden administrarse las pmEV al inicio del mismo día como el inicio de la dieta de MCD. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0e+09 a 3.0e+12 partículas de pmEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos

alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[481] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[482] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con terapéutica(s) de ENA adicionales (p. ej., Agonistas FXR, agonistas PPAR, antagonistas CCR2/5 u otro tratamiento) y/o control apropiado en diversos puntos temporales y dosis efectivas.

[483] En diversos puntos de tiempo y/o al final del tratamiento, se sacrifican los ratones y pueden extirparse el hígado, el intestino, la sangre, las heces u otros tejidos para análisis histológicos, bioquímicos, moleculares o de citocinas y/o citometría de flujo ex vivo utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tejidos del hígado se pesan y preparan para el análisis histológico, que puede comprender la tinción con H&E, rojo sirio, y la determinación de la puntuación de actividad de ENA (NAS). En diversos puntos de tiempo, se extrae sangre para el análisis de plasma de enzimas hepáticas, por ejemplo, AST o ALT, usando ensayos

estándar. Además, el contenido hepático de colesterol, triglicéridos o ácidos grasos puede medirse utilizando protocolos establecidos. El análisis de la expresión génica hepática de marcadores de la inflamación, fibrosis, esteatosis, estrés ER, o estrés oxidativo puede realizarse mediante qRT-PCR utilizando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero sin limitación, IL-6, MCP-1, alfa-SMA, Col11a1, CHOP y NRF2. Las mediciones de metabolitos pueden realizarse en plasma, tejidos y muestras fecales usando métodos de metabolómica bioquímicos y basados en espectrometría de masas establecidos. Las citocinas séricas se pueden analizar incluyendo, pero no se limitan a, 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 las citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones hepáticas o intestinales para medir los neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

[484] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, puede analizarse la recuperación de algunos ratones.

Ejemplo 12: pmEV en un modelo de ratón de psoriasis

[485] La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica mediada por linfocitos T. La denominada psoriasis "tipo placa" es la forma más común de psoriasis y se caracteriza por escamas secas, placas rojas y engrosamiento de la piel debido a la infiltración de células inmunitarias en la dermis y la epidermis. Varios modelos animales han contribuido a la comprensión de esta enfermedad,

según lo revisado por 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 1 de mayo. 182(9): 5836-45).

[486] La psoriasis puede inducirse en una variedad de modelos de ratones, incluyendo los que usan modelos transgénicos, deficientes, o de xenoinjerto, así como la aplicación tópica de imiquimod (IMQ), un ligando TLR7/8.

[487] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en el modelo de ratón de psoriasis, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6 o Balb/c de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor. Se afeitan el lomo y la oreja derecha de los ratones. Los grupos de ratones reciben una dosis tópica diaria de 62.5 mg de crema IMQ comercialmente disponible (5 %) (Aldara; 3M Pharmaceuticals). Se aplica la dosis a las áreas afeitadas durante 5 o 6 días consecutivos. A intervalos regulares, los ratones reciben una puntuación según su eritema, formación de escamas y engrosamiento en una escala de 0 a 4, según lo descrito por van der Fits *et al.* (2009). Los ratones se monitorizaron para determinar el espesor de la oreja usando un micrómetro Mitutoyo.

[488] Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, ya sea en el momento de la primera aplicación de IMQ, o algo después. Por ejemplo, pueden administrarse las pmEV al mismo momento que las inyecciones subcutáneas (día 0), o pueden administrarse antes de, o después de, la aplicación. Las pmEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o

20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de 7.0×10^9 a 3.0×10^{12} partículas de pmEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben pmEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir pmEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día (por ejemplo a partir del día 0), mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}:1$ (pmEV: células bacterianas).

[489] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[490] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios (por ejemplo anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, u otro tratamiento), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[491] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[492] En varios puntos temporales, se toman muestras de la piel de la espalda y las orejas para el análisis por tinción de criosecciones utilizando métodos conocidos en la técnica. Se sacrifican otros grupos de ratones y pueden extirparse los ganglios linfáticos, el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), el intestino delgado, el colon y otros tejidos para estudios histológicos, histológicos ex vivo, de citocinas y/o análisis de citometría de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Pueden disociarse algunos tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las muestras de criosección, muestras de tejido, o células obtenidas ex vivo para su análisis por citometría de flujo utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, Tbet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas en la piel CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[493] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección contra la psoriasis, en lugar de sacrificarse, algunos ratones pueden estudiarse para evaluar la recuperación, o se pueden volver a estimular con IMQ. Se analiza la susceptibilidad a la psoriasis y la gravedad de la respuesta en los grupos de ratones reexpuestos.

Ejemplo 13: pmEV en un modelo de ratón de obesidad (DIO)

[494] Hay varios modelos animales de DIO, como se revisó por Tschop et al. (A guide to analysis of mouse energy metabolism. Nat. Methods. 2012; 9(1):57-63) y Ayala et al. (Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. Disease Models and Mechanisms. 2010; 3:525-534) y proporcionados por Physiogenex.

[495] Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de DIO, ya sea sola o en combinación con otras células bacterianas completas (vivas, destruidas, irradiadas y/o inactivadas, etc.) con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

[496] Dependiendo del método de inducción de DIO y/o si el desarrollo de DIO es espontáneo, el tratamiento con pmEV se inicia en algún momento, o bien en el momento de la inducción o bien después de la inducción, o antes del inicio (o tras el inicio) de T1D que se produce de manera espontánea. pmEV se administra en dosis variadas y a

intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con pmEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de pmEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben de $7.0\text{e}+09$ a $3.0\text{e}+12$ partículas de pmEV por dosis. Aunque algunos ratones reciben las pmEV mediante inyección i.v., otros pueden recibirlas mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), mediante administración por vía nasal, por sonda oral u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir pmEV cada día, mientras que otros pueden recibir pmEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de pmEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de pmEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (pmEV: células bacterianas) a $1\text{-}1\text{x}10^{12}$:1 (pmEV: células bacterianas).

[497] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre $1\text{x}10^4$ y $5\text{x}10^9$ células bacterianas en una administración separada de la administración de MP. Al igual que con las pmEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

[498] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con tratamientos adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo de control) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[499] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[500] Se controla la glucosa en sangre quincenalmente antes del inicio del experimento. En diversos puntos de tiempo posteriores, se mide la glucosa en sangre sin ayuno. En diversos puntos de tiempo, se sacrifican los ratones y pueden extirparse el sitio como el páncreas, los ganglios linfáticos u otros tejidos para un análisis citológico ex vivo histológico, de citocinas y/o de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células

inmunitarias de infiltración de tejidos purificadas obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control. También puede evaluarse la producción de anticuerpos mediante ELISA.

[501] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a un desencadenante de la enfermedad, o evaluarse la susceptibilidad a la recaída. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la aparición de diabetes y la gravedad después de la reexposición (o recaída espontánea).

Ejemplo 14: Marcaje de pmEV bacterianas

[502] Las pmEV se pueden etiquetar para rastrear su biodistribución *in vivo* y para cuantificar y rastrear la ubicación celular en varias preparaciones y en ensayos realizados con células de mamífero. Por ejemplo, las pmEV pueden radiomarcarse, incubarse con colorantes, marcarse con fluorescencia, marcarse con luminiscencia o marcarse con conjugados que contienen metales e isótopos de metales.

[503] Por ejemplo, se pueden incubar pmEV con colorantes conjugados con grupos funcionales tales como NHS-éster, grupos de química click, estreptavidina o biotina. La reacción del marcado puede producirse a una variedad de temperaturas durante minutos u horas y con o sin agitación o rotación. Luego, la reacción puede detenerse añadiendo un reactivo tal como seroalbúmina bovina (BSA), o un agente similar dependiendo del protocolo y una molécula de colorante libre o unida eliminada por ultracentrifugación, filtración, filtración centrífuga, purificación por columna de afinidad

o diálisis. Las etapas de lavado adicionales que implican lavar tampones y agitar con vórtex o puede emplearse la agitación para asegurar la eliminación completa de moléculas de colorantes libres tales como se describe en Su Chul Jang et al, Small. 11, N.º 4, 456-461(2017).

[504] Opcionalmente, se pueden concentrar las pmEV a 5.0 E12 partículas/ml (300 ug) y diluir hasta 1.8 mo usando un tampón PBS 2X concentrado a pH 8.2 y se sedimentaron mediante centrifugación a 165,000 x g a 4 °C usando una ultracentrífuga de laboratorio. El sedimento se vuelve a suspender en 300 ul de 2X PBS pH 8.2 y se agrega un tinte fluorescente de éster de NHS a una concentración final de 0.2 mM de una solución madre de tinte 10 mM (disuelta en DMSO). La muestra se agita suavemente a 24 °C durante 1.5 horas y luego se incuba durante la noche a 4 °C. Se elimina el tinte libre sin reaccionar mediante 2 etapas repetidas de dilución/sedimentación como se ha descrito anteriormente, usando un tampón 1X PBS y volviendo a suspender en un volumen final de 300 ul.

[505] Las pmEV marcadas con fluorescencia se detectan en células u órganos, o en muestras *in vitro* y/o *ex vivo* mediante microscopía confocal, análisis de seguimiento de nanopartículas, citometría de flujo, clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o sistema de imágenes fluorescentes como Odyssey CLx, LICOR (véase, por ejemplo, Wiklander et al. 2015. J. Extracellular Vesicles. 4:10.3402/jev.v4.26316). Adicionalmente, las pmEV marcadas con fluorescencia se detectan en animales enteros y/o órganos disecados y tejidos usando un instrumento como el IVIS spectrum CT (Perkin Elmer) o Pearl Imager, como en H-I. Choi, et al. Experimental & Molecular Medicine. 49: e330 (2017).

[506] Las pmEV pueden marcarse con conjugados que contienen metales e isótopos de metales usando los protocolos

descritos anteriormente. Se pueden administrar las pmEV conjugadas con metal a animales *in vivo*. Después, se pueden recoger las células a partir de órganos en varios puntos temporales y analizarse *ex vivo*. Como alternativa, las células de origen animal, humanas o líneas celulares inmortalizadas pueden tratarse con pmEV marcadas con metal *in vitro* y las células se marcan posteriormente con anticuerpos conjugados con metales y se fenotipan usando un instrumento de citometría por tiempo de vuelo (CyTOF), tal como el sistema Helios CyTOF (Fluidigm) o se obtienen imágenes y se analizan usando un instrumento de formación de imágenes de masa de citometría, tal como el Hyperion Imaging System (Fluidigm). Adicionalmente, las pmEV pueden marcarse con un radioisótopo para seguir la biodistribución de pmEV (véase, por ejemplo, Miller et al., Nanoscale. 7 de mayo de 2014;6(9):4928-35).

Ejemplo 15: Microscopía electrónica de transmisión para visualizar las pmEV bacterianas

[507] Se preparan las pmEV a partir de cultivos de lotes bacterianos. Se puede usar el microscopio electrónico de transmisión (TEM) para visualizar las pmEV bacterianas purificadas (S. Bin Park, et al. PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011). Las pmEV se montan sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono con un tamaño de malla de 300 o 400 (Electron Microscopy Sciences, EE. UU) durante 2 minutos y se lavan con agua desionizada. Las pmEV se tiñen negativamente usando acetato de uranilo al 2 % (p/v) durante 20 s - 1 min. Las rejillas de cobre se lavan con agua estéril y se secan. Se adquieren las imágenes usando un microscopio electrónico de transmisión con un voltaje de aceleración de 100-120 kV. Las pmEV aparentan un diámetro de 20-600 nm y son densas a los electrones. Se seleccionan 10-50 campos en cada rejilla.

Ejemplo 16: Elaboración de perfiles de la composición y el contenido de las pmEV

[508] Las pmEV pueden caracterizarse mediante uno cualquiera de diversos métodos que incluyen, pero sin limitación, caracterización NanoSight, electroforesis en gel SDS-PAGE, transferencia de Western, ELISA, cromatografía líquida-espectrometría de masas y espectrometría de masas, dispersión dinámica de luz, niveles de lípidos, proteínas totales, relaciones lípido a proteína, análisis de ácido nucleico y/o potencial zeta.

Caracterización de las pmEV mediante NanoSight

[509] Se utiliza el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) para caracterizar la distribución del tamaño de las pmEV bacterianas purificadas. Las preparaciones de pmEV purificadas se analizan en una máquina NanoSight (Malvern Instruments) para evaluar el tamaño y la concentración de pmEV.

Electroforesis en gel SDS-PAGE

[510] Para identificar los componentes proteicos de las pmEV purificadas, las muestras se analizan en un gel, por ejemplo un gel Bolt Bis-Tris Plus 4-12 % (Thermo-Fisher Scientific), usando técnicas estándar. Se hierven las muestras en tampón de muestra de SDS 1x durante 10 minutos, se enfrían a 4 °C y luego se centrifugan a 16,000 x g durante 1 minuto. Posteriormente, las muestras se procesan en un gel de SDS-PAGE y se tiñen usando una de varias técnicas estándar (p. ej., tinción argéntica, azul de Coomassie, azul de código de gel) para la visualización de bandas.

Análisis de inmunotransferencia

[511] Para identificar y cuantificar los componentes proteínicos específicos de las pmEV purificadas, las proteínas de las pmEV se separan mediante SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente y se someten a un análisis por

transferencia Western (Cvjetkovic et al., *Sci. Rep.* **6**, 36338 (2016)) y se cuantifican a través de ELISA.

Proteómica de pmEV y Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas (CL-EM/EM) y Espectrometría de masas (EM)

[512] Las proteínas presentes en las pmEV se identifican cuantifican mediante técnicas de espectrometría de masas. Se pueden preparar las proteínas MP para CL-EM/EM usando técnicas estándar que incluyen reducción de proteínas usando solución de ditioneitol (DTT) y digestión de proteínas usando enzimas como LysC y tripsina como se describe en Erickson et al., 2017 (*Molecular Cell*, VOLUMEN 65, PUBLICACIÓN 2, P361-370, 19 DE ENERO DE 2017). Como alternativa, se preparan péptidos tal como se describe por Liu et al. 2010 (*JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, junio de 2010, pág. 2852-2860 Vol. 192, No. 11), Kieselbach y Oscarsson 2017 (*Data Brief.* 2017 feb; 10: 426-431.), Vildhede et al, 2018 (*Drug Metabolism and Disposition* 8 de febrero de 2018). Después de la digestión, se analizan las preparaciones de péptidos directamente en dispositivos de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas para la identificación de proteínas dentro de una sola muestra. Para la cuantificación relativa de proteínas entre muestras, los digeridos de péptidos de diferentes muestras se marcan con etiquetas isobáricas usando el kit iTRAQ Reagent-8plex Multiplex (Applied Biosystems, Foster City, CA) o reactivos de etiquetas TMT 10plex y 11plex (Thermo Fischer Scientific, San José, CA, EE.UU.). Se marca cada producto de digestión de péptido con una etiqueta isobárica diferente y luego se combinan los productos de digestión marcados en una mezcla de muestra. Se analiza la mezcla de péptidos combinada por CL-EM/EM para identificación y cuantificación. Se realiza una búsqueda en la base de datos usando los datos CL-EM/EM

para identificar los péptidos marcados y las proteínas correspondientes. En el caso del marcado isobárico, la fragmentación del marcador adjunto genera un ion indicador de baja masa molecular que se utiliza para obtener una cuantificación relativa de los péptidos y proteínas presentes en cada pmEV.

[513] Adicionalmente, se determina el contenido metabólico usando técnicas de cromatografía de líquidos combinadas con espectrometría de masas. Existe una variedad de técnicas para determinar el contenido metabólico de diversas muestras y un experto en la materia que implica extracción de solventes, separación cromatográfica y una variedad de técnicas de ionización acopladas a la determinación de masas (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 de triple cuadrupolo 4000 QTRAP (AB SCIEX) con una bomba de la serie 1100 (Agilent) y un muestreador automático HTS PAL (Leap Technologies). Se extraen muestras de medios u otras mezclas metabólicas complejas (~10 µl) usando nueve volúmenes de 74.9: 24.9: 0.2 (v/v/v) acetonitrilo/metanol/ácido fórmico que contiene patrones internos estables marcados con isótopos (valina-d8, Isotec; y fenilalanina-d8, Cambridge Isotope Laboratories). Los patrones pueden ajustarse o modificarse dependiendo de los metabolitos de interés. Se centrifugan las muestras (10 minutos, 9,000 g, 4 °C), y se envían los sobrenadantes (10 µl) a CLEM inyectando la disolución en la columna HILIC (150 × 2.1 mm, 3 µm de tamaño de partícula). Se eluye la columna haciendo fluir una fase móvil al 5 % [formiato de amonio 10 mM, ácido fórmico al 0.1 % en agua] durante 1 minuto a una velocidad de 250 µl/min

seguido de un gradiente lineal durante 10 minutos a una solución de fase móvil al 40 % [acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 %]. Se establece el voltaje de pulverización iónica en 4.5 kV y la temperatura de la fuente es de 450 °C.

[514] Se analizan los datos usando software disponible comercialmente como Multiquant 1.2 de AB SCIEX para integración de pico de espectro de masas. Los picos de interés deben seleccionarse manualmente y compararse con los patrones para confirmar la identidad del pico. Se realiza la cuantificación con estándares apropiados para determinar el número de metabolitos presentes en los medios iniciales, después del condicionamiento bacteriano y después del crecimiento de las células tumorales. También puede utilizarse una estrategia de metabolómica no dirigida usando bases de datos de metabolitos, como, entre otras, la base de datos NIST, para la identificación máxima.

Dispersión dinámica de la luz (DLS)

[515] Las mediciones de DLS, incluida la distribución de partículas de diferentes tamaños en diferentes preparaciones de pmEV, se toman usando instrumentos como DynaPro NanoStar (Wyatt Technology) y Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Niveles de lípidos

[516] Los niveles de lípidos se cuantifican usando FM4-64 (Life Technologies), por métodos similares a los descritos por A.J. McBroom *et al.* *J Bacteriol* 188:5385-5392. y A. Frias, *et al.* *Microb Ecol.* 59:476-486 (2010). Se incuban las muestras con FM4-64 (3.3 µg/ml en PBS durante 10 minutos a 37 °C en la oscuridad). Después de la excitación a 515 nm, se mide la emisión a 635 nm usando un lector de placas Spectramax M5 (Molecular Devices). Se determinan las concentraciones absolutas mediante la comparación de muestras desconocidas con patrones (tales como vesículas de

palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG)) de concentraciones conocidas. Se puede usar la lipidómica para identificar los lípidos presentes en las pmEV.

Proteínas totales

[517] Se cuantifican los niveles de proteínas mediante ensayos estándar como los ensayos de Bradford y BCA. Se ejecutan los ensayos de Bradford usando Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad), según los protocolos del fabricante. Se realizan los ensayos de BCA usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo-Fisher Scientific). Se determinan las concentraciones absolutas por comparación con una curva patrón generada a partir de BSA de concentraciones conocidas. Como alternativa, se puede calcular la concentración de la proteína usando la ecuación de Beer-Lambert usando la absorbancia de la muestra a 280 nm (A₂₈₀) según lo medido en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo-Fisher Scientific). Además, se puede usar la proteómica para identificar las proteínas en la muestra.

Razones de lípido:proteína

[518] Se generan las razones de lípido:proteína dividiendo las concentraciones de lípido por proteínas. Estos proporcionan una medida de la pureza de las vesículas en comparación con la proteína libre en cada preparación.

Análisis de ácido nucleico

[519] Se extraen los ácidos nucleicos de las pmEV y se cuantifican usando un fluorómetro Qubit. Se evalúa la distribución del tamaño usando un BioAnalyzer y se secuencia el material.

Potencial zeta

[520] Se mide el potencial zeta de diferentes preparaciones usando **instrumentos** tales como el Zetasizer ZS (Malvern Instruments).

Ejemplo 17: Detección *in vitro* de pmEV para la activación mejorada de células dendríticas

[521] Se considera que las respuestas inmunitarias *in vitro* estimular los mecanismos mediante los cuales se inducen las respuestas inmunitarias *in vivo*, p. ej., como respuesta a un microentorno de cáncer. En resumen, se aíslan PBMC de sangre venosa heparinizada de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente usando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) o de bazo de ratón o médula ósea usando el kit de aislamiento de células dendríticas de sangre humana a base de perlas magnéticas (Miltenyi Biotech, Cambridge, MA). Usando mAb anti-CD14 humano, se purifican los monocitos mediante Moflo y se cultivan 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, se estimula el cultivo con 0.2 ng/ml de IL-4 y 1000 U/ml de GM-CSF a 37 °C durante una semana. Como alternativa, la maduración se logra a través de la incubación con GM-CSF recombinante durante una semana o usando otros métodos conocidos a la técnica. Pueden recogerse las DC de ratón directamente del bazo usando el enriquecimiento de las células madre diferenciadas de las células hematopoyéticas. En resumen, la médula ósea se puede obtener de los fémures de ratones. Se recuperan las células y se lisan los glóbulos rojos. Se cultivan las células madre en medio de cultivo celular en GMCSF de ratón de 20 ng/ml durante 4 días. Se añade medio adicional que contiene 20 ng/ml de GM-CSF de ratón. El día 6, se eliminan el medio y las células no adherentes y se reemplazan con medio de cultivo celular recién preparado que contiene 20 ng/ml de GMCSF. El día 7 se añade una adición final de medio de cultivo celular con 20 ng/ml de GM-CSF. El día 10, se recogen las células no adherentes y se siembran en placas de cultivo celular durante

la noche y se estimulan según sea necesario. Luego, las células dendríticas se tratan con varias dosis de pmEV con o sin antibióticos. Por ejemplo, las pmEV 25-75 ug/ml durante 24 horas con antibióticos. Las composiciones de las pmEV evaluadas pueden incluir las pmEV a partir de una única especie o cepa bacteriana o una mezcla de pmEV a partir de una o más géneros, 1 o más especies o 1 o más cepas (p. ej., uno o más cepas dentro de una especie). PBS se incluye como un control negativo y LPS, anticuerpos anti-CD40, de *Bifidobacterium* spp. se usan como controles positivos. Tras la incubación, se tiñen las DC con anti CD11b, CD11c, CD103, CD8a, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC I y MHC II, y se analizan mediante citometría de flujo. Se consideran las DC que aumentan significativamente en CD40, CD80, CD83 y CD86 en comparación con los controles negativos activadas por la composición de pmEV bacteriana asociada. Se repiten estos experimentos tres veces como mínimo.

[522] Para detectar la capacidad de las células epiteliales activadas por pmEV para estimular las DC, se sigue el protocolo anterior con la adición de un cocultivo de pmEV de células epiteliales de 24 horas antes de la incubación con las DC. Se lavan las células epiteliales después de la incubación con pmEV y luego se cultivan conjuntamente con DC en ausencia de pmEV durante 24 horas antes de procesarse como anteriormente. Las líneas celulares epiteliales pueden incluir Int407, HEL293, HT29, T84 y CACO2.

[523] Como una medida adicional de la activación de DC, se extraen 100 µl de cultivo sobrenadante de los pocillos después de 24 horas de incubación de DC con pmEV o células epiteliales tratadas con pmEV y se analizan las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento secretados usando el Luminex Magpix multiplexado. Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen se prehumeden los pocillos con tampón

y se añaden 25 µl de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo 1x y se preparan 2x 200 µl de tampón de lavado en cada pocillo usando el imán. Se añaden 50 µl de tampón de incubación, 50 µl de diluyente y 50 µl de muestras y se mezclan mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavan las perlas dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añaden 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado 1X y la suspensión se incuba durante 1 hora con agitación en la oscuridad. Luego se realizan dos lavados con 200 µl con tampón de lavado. Se añaden 100 µl de reactivo SAV-RPE 1x a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan tres lavados de 200 µl y se añaden 125 µl de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

[524] Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas incluyendo 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. Se evalúan estas citocinas en muestras de origen humano y de ratón. Los aumentos de estas citocinas en las muestras tratadas con bacterias indican una producción mejorada de proteínas y citocinas del hospedador. Otras variaciones en este ensayo que examinan la capacidad de los tipos de células específicas para liberar citocinas se evalúan mediante la adquisición de estas células a través de métodos de clasificación y son reconocidos por un experto en la materia. Además, también se evalúa el ARNm de citocinas para abordar la liberación de citocinas en respuesta a una composición de pmEV.

[525] Puede repetirse este protocolo de estimulación de DC usando combinaciones de pmEV purificadas

y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 18: Selección in vitro de pmEV para la activación mejorada de la destrucción de linfocitos T CD8+ cuando se incuban con células tumorales

[526] Se describen métodos *in vitro* para la detección de pmEV que pueden activar la muerte de células tumorales por linfocitos T CD8 +. Brevemente, las DC se aíslan de PBMC humanas o bazos de ratones, usando técnicas conocidas en la técnica y se incuban *in vitro* con pmEV de cepa única, mezclas de pmEV y/o controles adecuados. Además, se obtienen los linfocitos T CD8 + a partir de PBMC humanas o bazos de ratón usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, el kit de aislamiento de linfocitos T CD8a+ de ratón a base de perlas magnéticas y el kit de aislamiento de linfocitos T CD8+ a base de perlas magnéticas (ambos de Miltenyi Biotech, Cambridge, MA). Después de la incubación de DC con las pmEV durante algún tiempo (p. ej., durante 24 horas) o incubación de DC con las células epiteliales estimuladas por pmEV, se eliminan las pmEV del cultivo celular con lavados de PBS y 100 ul de medio fresco con antibióticos se agrega a cada pocillo y 200,000 linfocitos T se agregan a cada pocillo experimental en la placa de 96 pocillos. Se añade el anticuerpo anti-CD3 una concentración final de 2 ug/ml. Se deja que los cocultivos se incuben a 37 °C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

[527] Por ejemplo, aproximadamente 72 horas en la incubación del cocultivo, se colocan en placas las células tumorales en el ensayo usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se siembran en placas 50,000 células tumorales/pocillo por pocillo en placas nuevas de 96 pocillos. Las líneas celulares tumorales de ratón usadas

pueden incluir B16.F10, SIY + B16.F10, y otras. Las líneas celulares tumorales humanas tienen un HLA compatible con el del donante, y pueden incluir líneas celulares PANC-1, UNKPC960/961, UNKC y HELA. Después de la compleción del cocultivo de 96 horas, se transfieren 100 µl de la mezcla de linfocitos T CD8 + y DC a pocillos que contienen células tumorales. Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C en condiciones de oxígeno normales. Se puede usar estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte celular.

[528] Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para medir la muerte de células tumorales y caracterizar el fenotipo de células inmunes. En resumen, se tiñen las células tumorales con colorante de viabilidad. Se usa el análisis FACS para controlar específicamente las células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (muertas). También se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo. El fenotipo citotóxico de los linfocitos T CD8 + puede caracterizarse por los siguientes métodos: a) concentración de granzima B, IFN γ y TNF α en el sobrenadante de cultivo como se describe a continuación, b) expresión de superficie en linfocitos T CD8 + de marcadores de activación tales como DC69, CD25, CD154, PD-1, TCR gamma/delta, Foxp3, T-bet, granzima B, c) tinción de citocinas intracelulares de IFN γ , granzima B, TNF α en linfocitos T CD8+. También puede evaluarse el fenotipo de los linfocitos T CD4 + mediante tinción intracelular de citocinas además de la concentración de citocinas en el sobrenadante, incluidas IFN γ , TNF α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, quimiocinas, etc.

[529] Como una medida adicional de la activación de los linfocitos T CD8 +, se extraen 100 µl de cultivo sobrenadante de los pocillos después de la incubación de 96

horas de los linfocitos T con DC y se analizan las citocinas secretadas, las quimiocinas y los factores de crecimiento utilizando el Luminex Magpix multiplexado. Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen se prehumeden los pocillos con tampón y se añaden 25 µl de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo 1x y se preparan 2x 200 µl de tampón de lavado en cada pocillo usando el imán. Se añaden 50 µl de tampón de incubación, 50 µl de diluyente y 50 µl de muestras y se mezclan mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavan las perlas dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añaden 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado 1x y la suspensión se incuba durante 1 hora con agitación en la oscuridad. Luego se realizan dos lavados con 200 µl con tampón de lavado. Se añaden 100 µl de reactivo SAV-RPE 1x a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan tres lavados de 200 µl y se añaden 125 µl de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

[530] Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas, incluyendo 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-17, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1 α , TNF α , y VEGF. Se evalúan estas citocinas en muestras de origen humano y de ratón. Los aumentos de estas citocinas en las muestras tratadas con bacterias indican una producción mejorada de proteínas y citocinas del hospedador. Otras variaciones en este ensayo que examinan la capacidad de los tipos de células específicas para liberar citocinas se evalúan mediante la adquisición de estas células a través de métodos de clasificación y son reconocidos por un experto en la materia. Además, también se evalúa el ARNm de citocinas

para abordar la liberación de citocinas en respuesta a una composición de pmEV. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria similar a la respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

[531] Puede repetirse este protocolo de estimulación de linfocitos T CD8+ utilizando combinaciones de pmEV purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 19: Selección in vitro de pmEV para una mayor destrucción de células tumorales por PBMC

[532] Varios métodos se pueden usar para seleccionar las pmEV según su capacidad para estimular las PBMC, que a su vez activan los linfocitos T CD8+ para destruir las células tumorales. Por ejemplo, se aíslan las PBMC de sangre venosa heparinizada de donantes humanos sanos mediante centrifugación en gradiente de ficoll-paque para sangre de ratón o humana, o con medios de separación de células linfocíticas (Laboratorios Cedarlane, Ontario, Canadá) de sangre de ratón. Se incuban PBMC con pmEV de una sola cepa, mezclas de pmEV y controles apropiados. Además, se obtienen los linfocitos T CD8 + de PBMC humanas o bazos de ratón. Después de la incubación de 24 horas de PBMC con pmEV, se eliminan las pmEV de las células usando lavados de PBS. Se agregan 100 ul de medio fresco con antibióticos a cada pocillo. Se agrega una cantidad adecuada de linfocitos T (p. ej., 200,000 linfocitos T) a cada pocillo experimental en la placa de 96 pocillos. Se añade el anticuerpo anti-CD3 una concentración final de 2 ug/ml. Se deja que los cocultivos se incuben a 37 °C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

[533] Por ejemplo, 72 horas después de la incubación del cocultivo, se siembran en placas 50,000 células tumorales/pocillo por pocillo en placas nuevas de 96

pocillos. Las líneas celulares tumorales de ratón usadas incluyen B16.F10, SIY + B16.F10, y otras. Las líneas celulares tumorales humanas tienen un HLA compatible con el del donante, y pueden incluir líneas celulares PANC-1, UNKPC960/961, UNKC y HELA. Después de la compleción del cocultivo de 96 horas, se transfieren 100 µl de la mezcla de linfocitos T CD8 + y PBMC a pocillos que contienen células tumorales. Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C en condiciones de oxígeno normales. Se usa la estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte celular.

[534] Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para medir la muerte de células tumorales y caracterizar el fenotipo de células inmunes. En resumen, se tiñen las células tumorales con colorante de viabilidad. Se usa el análisis FACS para controlar específicamente las células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (muertas). También se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo. El fenotipo citotóxico de los linfocitos T CD8 + puede caracterizarse por los siguientes métodos: a) concentración de granzima B, IFN γ y TNF α en el sobrenadante de cultivo como se describe a continuación, b) expresión de superficie en linfocitos T CD8 + de marcadores de activación tales como DC69, CD25, CD154, PD-1, TCR gamma/delta, Foxp3, T-bet, granzima B, c) tinción de citocinas intracelulares de IFN γ , granzima B, TNF α en linfocitos T CD8+. También puede evaluarse el fenotipo de los linfocitos T CD4 + mediante tinción intracelular de citocinas además de la concentración de citocinas en el sobrenadante, incluidas IFN γ , TNF α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, quimiocinas, etc.

[535] Como una medida adicional de la activación de los linfocitos T CD8 +, se extraen 100 µl de cultivo sobrenadante de los pocillos después de la incubación de 96

horas de los linfocitos T con DC y se analizan las citocinas secretadas, las quimiocinas y los factores de crecimiento utilizando el Luminex Magpix multiplexado. Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen se prehumeden los pocillos con tampón y se añaden 25 µl de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo 1x y se preparan 2x 200 µl de tampón de lavado en cada pocillo usando el imán. Se añaden 50 µl de tampón de incubación, 50 µl de diluyente y 50 µl de muestras y se mezclan mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavan las perlas dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añaden 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado 1X y la suspensión se incuba durante 1 hora con agitación en la oscuridad. Luego se realizan dos lavados con 200 µl con tampón de lavado. Se añaden 100 µl de reactivo SAV-RPE 1x a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan tres lavados de 200 µl y se añaden 125 µl de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

[536] Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas, incluyendo 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. Se evalúan estas citocinas en muestras de origen humano y de ratón. Los aumentos de estas citocinas en las muestras tratadas con bacterias indican una producción mejorada de proteínas y citocinas del hospedador. Otras variaciones en este ensayo que examinan la capacidad de los tipos de células específicas para liberar citocinas se evalúan mediante la adquisición de estas células a través de métodos de clasificación y son reconocidos por un experto en la materia. Además, también se evalúa el ARNm de citocinas

para abordar la liberación de citocinas en respuesta a una composición de pmEV. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria similar a la respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

[537] Puede repetirse este protocolo de estimulación de PBMC usando combinaciones de pmEV purificadas con o sin combinaciones de cepas bacterianas vivas, destruí dadas o inactivas dadas/debilitadas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 20: Detección in vitro de pmEV en células presentadoras de antígenos

[538] Las células dendríticas en la lámina propia muestrean constantemente las bacterias vivas, las bacterias muertas y los productos microbianos en la luz intestinal al extender sus dendritas a través del epitelio intestinal, que es una forma en que las pmEV producidas por bacterias en la luz intestinal pueden estimular directamente las células dendríticas. Los siguientes métodos representan una forma de evaluar la captación diferencial de las pmEV por las células presentadoras de antígenos. Opcionalmente, estos métodos pueden aplicarse para evaluar el comportamiento inmunomodulador de las pmEV administradas a un paciente.

[539] Las células dendríticas (DC) se aíslan de médula ósea, sangre o bazo de ratón o humano de acuerdo con los métodos estándar o protocolos del kit (p. ej., Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, 2001. Isolation of dendritic cells. Current Protocols in Immunology. Capítulo 3: Unidad 3.7).

[540] Para evaluar la entrada y/o la presencia de las pmEV en DC, se siembran 250,000 DC en un portaobjetos redondo en medio RPMI-1640 completo y después se incuban con pmEV de cepas bacterianas individuales o combinaciones de pmEV en diversas proporciones. Las pmEV purificadas se pueden

marcar con fluorocromos o proteínas fluorescentes. Después de la incubación durante varios puntos temporales (p. ej., 1 hora, 2 horas), se lavan las células dos veces con PBS helado y se separan de la placa con tripsina. Se permite que las células permanezcan intactas o se lisan. Luego se procesan las muestras para citometría de flujo. Las pmEV internalizadas totales se cuantifican a partir de muestras lisadas y se mide el porcentaje de células que captan las pmEV contando las células fluorescentes. Los métodos descritos anteriormente también pueden realizarse sustancialmente de la misma manera usando macrófagos o líneas celulares epiteliales (obtenidas del ATCC) en lugar de DC.

Ejemplo 21: Cribado *in vitro* de pmEV con una capacidad mejorada para activar la destrucción de células NK cuando se incuban con células diana

[541] Para demostrar la capacidad de las composiciones de pmEV seleccionadas para provocar una citotoxicidad potente de células NK en células tumorales, se usa el siguiente ensayo *in vitro*. En resumen, se obtienen las células mononucleares de sangre heparinizada de donantes humanos sanos. Opcionalmente, se realiza una etapa de expansión para aumentar el número de células NK tal como se describió anteriormente (por ejemplo véase Somanschi et al., J Vis Exp. 2011;(48):2540). Las células se pueden ajustar a una concentración de células/ml en medio RPMI-1640 que contiene el 5 % de suero humano. Se marcan las células PMNC con anticuerpos apropiados y las células NK se aíslan a través de FACS como células CD3-/CD56 + y están listas para el posterior ensayo de citotoxicidad. Como alternativa, se aíslan las células NK usando el instrumento autoMACs y el kit de aislamiento de células NK siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyl Biotec).

[542] Se cuentan las células NK en un formato de 96 pocillos con 20,000 o más células por pocillo, se incuban con pmEV de una sola cepa sin adición de células presentadoras de antígeno (p. ej., monocitos derivados del mismo donante), pmEV de mezclas de bacterias cepas, y controles apropiados. Después de 5 a 24 horas de incubación de células NK con pmEV, las pmEV se retiran de las células con lavado con PBS, las células NK se resuspenden en 10 ml de medio recién hecho con antibióticos y se agregan a placas de 96 pocillos que contienen 20,000 células tumorales diana/pocillo. Las líneas celulares tumorales de ratón usadas incluyen B16.F10, SIY + B16.F10, y otras. Las líneas celulares tumorales humanas tienen un HLA compatible con el del donante, y pueden incluir líneas celulares PANC-1, UNKPC960/961, UNKC y HELA. Se incuban placas durante 2-24 horas a 37 °C en condiciones de oxígeno normales. Se usa la estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte celular.

[543] Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para medir la muerte de células tumorales usando métodos conocidos en la técnica. En resumen, se tiñen las células tumorales con colorante de viabilidad. Se usa el análisis FACS para controlar específicamente las células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (muertas). También se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo.

[544] Puede repetirse este protocolo de estimulación de células NK usando combinaciones de pmEV purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 22: Uso de ensayos de activación inmune *in vitro* para predecir la eficacia de la inmunoterapia del cáncer *in vivo* de composiciones pmEV

[545] Los ensayos de activación inmune *in vitro* identifican pmEV que pueden estimular las células dendríticas, que a su vez activan la destrucción de linfocitos T CD8 +. Por lo tanto, los ensayos *in vitro* descritos arriba se usan como una selección predictiva de una gran cantidad de pmEV candidatas para posible actividad inmunoterapéuticas. Las pmEV que muestran una estimulación mejorada de las células dendríticas, estimulación mejorada de la destrucción de las células CD8+ T, estimulación mejorada de la destrucción de PBMC y/o estimulación mejorada de la destrucción de las células NK, se eligen preferentemente para los estudios *in vivo* de eficacia de inmunoterapia del cáncer.

Ejemplo 23: Determinación de la biodistribución de pmEV cuando se administran por vía oral a ratones

[546] Los ratones de tipo silvestre (p. ej., C57BL/6 o BALB/c) se inoculan por vía oral con la composición de pmEV de interés para determinar el perfil de biodistribución *in vivo* de las pmEV purificadas. Las pmEV se marcan para ayudar en los análisis posteriores. Como alternativa, los ratones que tienen tumores o los ratones con algún trastorno inmunitario (p. ej., lupus sistémico eritematoso, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, ENA) se pueden estudiar para la distribución *in vivo* de pmEV en un período determinado.

[547] Los ratones pueden recibir una dosis única de pmEV (p. ej., 25-100 µg) o varias dosis durante un espacio de tiempo definido (25-100 µg). Como alternativa, pueden administrarse las dosis de pmEV según el recuento de

partículas (p. ej., de $7e+08$ a $6e+11$ partículas). Los ratones se alojan en condiciones libres de microorganismos patógenos específicos siguiendo los protocolos aprobados. Como alternativa, los ratones pueden criarse y mantenerse en condiciones estériles, sin gérmenes. Pueden tomarse muestras de sangre, heces y otras muestras tisulares en los puntos de tiempo apropiados.

[548] Se sacrifica humanamente a los ratones en varios puntos de tiempo (es decir, horas a días) después de la administración de las composiciones de pmEV y se realiza una necropsia completa en condiciones estériles. Siguiendo los protocolos estándar, los ganglios linfáticos, las glándulas suprarrenales, el hígado, el colon, el intestino delgado, el ciego, el estómago, el bazo, los riñones, la vejiga, el páncreas, el corazón, la piel, los pulmones, el cerebro y otros tejidos de interés, se recogen y se usan directamente o se congelan para pruebas posteriores. Las muestras de tejido se diseccionan y homogeneizan para preparar suspensiones de células individuales siguiendo protocolos estándar conocidos por los expertos en la materia. Se cuantifica el número de pmEV presentes en la muestra mediante citometría de flujo. La cuantificación también puede continuar con el uso de la microscopía de fluorescencia después del procesamiento apropiado de todo el tejido del ratón (Vankelecom H., Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2009). Como alternativa, los animales pueden analizarse usando imágenes *in vivo* según la técnica de marcaje de pmEV.

[549] La biodistribución se puede realizar en modelos de cáncer en ratones, como CT-26 y B16, pero no se limita a ellos (véase, por ejemplo, Kim et al., *Nature Communications* vol. 8, no. 626 (2017)) o autoinmunidad como,

pero no limitado a EAE y DTH (véase, por ejemplo, Turjeman *et al.*, PLoS One 10(7): e0130442 (20105)).

Ejemplo 24: Purificación y preparación de vesículas extracelulares microbianas secretadas (smEV) a partir de bacterias

Purificación

[550] Las vesículas extracelulares microbianas secretadas (smEV) se purifican y preparan a partir de los cultivos bacterianos (p. ej., bacterias de la Tabla 1, Tabla 2 y/o Tabla 3) usando métodos conocidos para los expertos en la técnica (S. Bin Park, *et al.* PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011)).

[551] Por ejemplo, los cultivos bacterianos se centrifugan a 10,000-15,500 x g durante 10-40 minutos a 4 °C o temperatura ambiente para sedimentar las bacterias. Los sobrenadantes del cultivo se filtran posteriormente para incluir material $\leq 0.22 \mu\text{m}$ (p. ej., a través de un filtro de 0.22 μm o 0.45 μm) y para excluir las células bacterianas intactas. Los sobrenadantes filtrados se concentran posteriormente usando métodos que pueden incluir, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio, ultracentrifugación, o filtración. Brevemente, para la precipitación con sulfato de amonio, se añade lentamente sulfato de amonio 1.5-3 M al sobrenadante filtrado lentamente, mientras se agita a 4 °C. Las precipitaciones se incuban a 4 °C durante 8-48 horas y después centrifugarse a 11,000 x g durante 20-40 minutos a 4 °C. Los sedimentos contienen smEV y otros residuos. Brevemente, usando ultracentrifugación, los sobrenadantes filtrados se pueden centrifugar a 100,000-200,000 x g durante 1-16 horas a 4 °C. El sedimento de esta centrifugación contiene smEV y otros residuos. Brevemente, usando una técnica de filtración, usando un filtro de centrifugación Amicon Ultra o mediante

filtración de flujo tangencial, los sobrenadantes se filtran para retener especies de peso molecular >50, 100, 300 o 500 kDa.

[552] Como alternativa, las smEV se obtienen de cultivos de bacterias de manera continua durante la proliferación, o en puntos de tiempo seleccionados durante el crecimiento, conectando un biorreactor a un sistema de flujo tangencial alterno (ATF) (p. ej., XCell ATF de Repligen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema ATF retiene células intactas (>0.22 μm) en el biorreactor, y permite que componentes más pequeños (p. ej., smEV, proteínas libres) pasen a través de un filtro para su recolección. Por ejemplo, el sistema se puede configurar para que el filtrado <0.22 μm pase después a través de un segundo filtro de 100 kDa, lo que permite recoger especies tales como las smEV de entre 0.22 μm y 100 kDa, y bombear especies de menos de 100 kDa de vuelta al biorreactor. Como alternativa, se puede configurar el sistema para permitir que el medio en el biorreactor se vuelva a llenar y/o modificar durante el crecimiento del cultivo. Las smEV recopiladas mediante este método se pueden purificar y/o concentrar adicionalmente mediante ultracentrifugación o filtración como se ha descrito anteriormente para los sobrenadantes filtrados.

[553] Las smEV obtenidas mediante los métodos descritos anteriormente pueden purificarse adicionalmente mediante ultracentrifugación de gradiente, usando métodos que pueden incluir, pero sin limitación, el uso de un gradiente de sacarosa o un gradiente Optiprep. En resumen, al usar un método de gradiente de sacarosa, si se usara precipitación con sulfato de amonio o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, se vuelven a suspender los sedimentos en sacarosa al 60 %, Tris 30 mM, pH

8.0. Si se usó filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, el concentrado se intercambia en tampón al 60 % de sacarosa, Tris 30 mM, pH 8.0, usando una columna Amicon Ultra. Se aplican las muestras a un gradiente de sacarosa discontinuo del 35 %-60 % y se centrifugan a 200,000 x g durante 3-24 horas a 4 °C. En resumen, al usar un método de gradiente Optiprep, si se usara precipitación con sulfato de amonio o ultracentrifugación para concentrar los sobrenadantes filtrados, se resuspenden los sedimentos en Optiprep al 45 % en PBS. Si se usara filtración para concentrar el sobrenadante filtrado, se diluye el concentrado usando Optiprep al 60 % a una concentración final de Optiprep del 45 %. Se aplican las muestras a un gradiente de sacarosa discontinuo al 0-45 % y se centrifugan a 200,000 x g durante 3-24 horas a 4 °C. Como alternativa, puede usarse fraccionamiento de gradiente de densidad de alta resolución para separar a las smEV según la densidad.

Preparación

[554] Para confirmar la esterilidad e aislamiento de las preparaciones de smEV, las smEV se diluyen en serie en un medio de agar usado para el cultivo de rutina de las bacterias que se están sometiendo a prueba, y se incuban usando condiciones de rutina. Se hacen pasar preparaciones no estériles a través de un filtro de 0.22 μ m para excluir células intactas. Para aumentar adicionalmente la pureza, las smEV aisladas pueden tratarse con DNasa o proteinasa K.

[555] Como alternativa, para la preparación de las smEV usadas para inyecciones *in vivo*, las smEV purificadas se procesan como se ha descrito previamente (G. Norheim, et al. *PLoS ONE*. 10(9): e0134353 (2015)). Brevemente, después de la centrifugación en gradiente de sacarosa, las bandas que contienen las smEV se resuspenden a una concentración final de 50 μ g/ml en una solución que contiene sacarosa al

3 % u otra solución adecuada para inyección *in vivo* conocida por un experto en la materia. Esta solución también puede contener adyuvante, por ejemplo, hidróxido de aluminio a una concentración del 0-0.5 % (p/v).

[556] Para hacer que las muestras sean compatibles con pruebas adicionales (p. ej., para eliminar la sacarosa antes de la obtención de imágenes TEM o ensayos *in vitro*), las muestras se intercambian con tampón en PBS o Tris 30 mM, pH 8.0 usando filtración (p. ej., columnas Amicon Ultra), diálisis, o ultracentrifugación (después de una dilución de 15 veces o superior en PBS, 200,000 x g, 1-3 horas, 4 °C) y resuspensión en PBS.

[557] Para dos los estudios, las smEV se pueden calentar, irradiar y/o liofilizar antes de la administración (se describe en el Ejemplo 49).

Ejemplo 25: Manipulación de bacterias a través del estrés para producir varias cantidades de smEV y/o para variar el contenido de smEV

[558] Se ha demostrado que el estrés y, en particular el estrés de envoltura, aumenta la producción de smEV por algunas cepas bacterianas (I. MacDonald, M. Kuehn. *J Bacteriol* 195(13): doi: 10/1128/JB.02267-12). Con el fin de variar la producción de smEV por las bacterias, se someten a estrés las bacterias usando diversos métodos.

[559] Las bacterias pueden someterse a factores de estrés individuales o a factores de estrés en combinación. Los efectos de diferentes factores de estrés en diferentes bacterias se determinan de forma empírica mediante la variación de las condiciones de estrés y la determinación del valor de CI50 (las condiciones requeridas para inhibir el crecimiento celular al 50 %). Se produce la purificación, cuantificación y caracterización de las smEV. Se cuantifica

la producción de las smEV (1) en las muestras complejas de bacterias y smEV mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) o microscopio electrónico de transmisión (TEM); o (2) después de la purificación de smEV mediante NTA, la cuantificación de lípidos o la cuantificación de proteínas. El contenido de las smEV se evalúa siguiendo la purificación mediante los métodos descritos anteriormente.

[560] *Estrés antibiótico*

[561] Se cultivan las bacterias en condiciones de crecimiento estándar con la adición de concentraciones subletales de antibióticos. Esto puede incluir 0.1-1 µg/ml de cloranfenicol o 0.1-0.3 µg/ml de gentamicina o concentraciones similares de otros antibióticos (p. ej., ampicilina, polimixina B). Los productos antimicrobianos hospedadores tales como lisozima, defensinas y proteínas Reg se pueden usar en lugar de antibióticos. También pueden usarse péptidos antimicrobianos producidos por las bacterias, entre los que se incluyen bacteriocinas y microcinas.

[562] *Estrés de temperatura*

[563] Las bacterias se cultivan en condiciones de crecimiento estándar, pero a temperaturas más elevadas o más bajas que las habituales para su crecimiento. Como alternativa, las bacterias crecen en condiciones estándar y luego se someten a un choque de frío o un choque de calor mediante la incubación durante un período corto a temperaturas altas o bajas, respectivamente. Por ejemplo, las bacterias que proliferan a 37 °C se incuban durante 1 hora a 4 °C-18 °C para el choque de frío o a 42 °C-50 °C para el choque de calor.

[564] *Privación y limitación de nutrientes*

[565] Para inducir el estrés nutricional, se cultivan las bacterias en condiciones donde se limitan uno o más nutrientes. Las bacterias pueden estar sujetas a estrés nutricional durante todo el crecimiento o se pueden cambiar de un medio rico a un medio deficiente. Algunos ejemplos de los componentes de medios que se limitan son carbono, nitrógeno, hierro y azufre. Un medio de ejemplo es el medio mínimo M9 (Sigma-Aldrich), que contiene poca cantidad de glucosa como única fuente de carbono. Particularmente para *Prevotella spp.*, la disponibilidad de hierro se modifica alterando la concentración de hemina en los medios y/o modificando el tipo de porfirina u otro transportador de hierro presente en los medios, ya se encontró que las células cultivadas en condiciones bajas de hemina produjeron mayor cantidad de smEV (S. Stubbs *et al.* *Letters in Applied Microbiology*. 29:31-36 (1999). Los componentes de medios también se manipulan mediante la adición de quelantes, tales como EDTA y deferoxamina.

[566] *Saturación*

[567] Las bacterias crecen hasta la saturación y se incuban después del punto de saturación durante varios periodos de tiempo. Como alternativa, los medios acondicionados se usan para simular entornos de saturación durante el crecimiento exponencial. Los medios acondicionados se preparan al eliminar las células intactas de los cultivos saturados mediante centrifugación y filtración y los medios acondicionados se pueden tratar, además, para concentrar o eliminar componentes específicos.

[568] *Estrés salino*

[569] Las bacterias se cultivan o se exponen durante periodos breves a medio que contiene NaCl, sales biliares u otras sales.

[570] *Estrés de UV*

[571] El estrés de UV se logra al cultivar las bacterias bajo una lámpara de UV o al exponer las bacterias a UV usando un instrumento tal como un Stratalinker (Agilent). La radiación UV se puede administrar durante todo el período de cultivo, en breves periodos o durante un solo periodo definido después del crecimiento.

[572] *Estrés de oxígeno reactivo*

[573] Las bacterias se cultivan en presencia de concentraciones subletales de peróxido de hidrógeno (250-1,000 μM) para inducir estrés en forma de especies de oxígeno reactivo. Las bacterias anaerobias se cultivan o se exponen a concentraciones de oxígeno que son tóxicas para ellas.

[574] *Estrés por detergente*

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

[576] *Estrés de pH*

[577] Las bacterias se cultivan o se exponen durante tiempos limitados a medios de diferentes pH.

Ejemplo 26: Preparación de bacterias libres de smEV

[578] Se preparan muestras de bacterias que contienen cantidades mínimas de smEV. Se cuantifica la producción de smEV (1) en muestras complejas de bacterias y componentes extracelulares mediante NTA o TEM; o (2) después de la purificación de smEV a partir de muestras de bacterias, mediante NTA, cuantificación de lípidos o cuantificación de proteínas.

[579] a. Centrifugación y lavado: Los cultivos bacterianos se centrifugan a 11,000 x g para separar las células intactas del sobrenadante (incluidas proteínas y vesículas libres). Se lava el sedimento con tampón, tal como PBS y se almacena de una forma estable (p. ej., mezclado con glicerol, ultracongelación y se almacena a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

[580] b. ATF: Las bacterias y las smEV se separan mediante la conexión de un biorreactor a un sistema ATF. Las bacterias libres de smEV se conservan dentro del biorreactor y se pueden separar, además, de las smEV residuales mediante la centrifugación y el lavado, como se ha descrito anteriormente.

[581] c. Las bacterias crecen en condiciones que se observa que limitan la producción de smEV. Las condiciones que se pueden variar.

Ejemplo 27: Un modelo de carcinoma colorrectal

[582] Para estudiar la eficacia de smEV en un modelo tumoral, cualquiera de las muchas estirpes celulares del cáncer se puede usar de acuerdo con los modelos del tumor de roedores conocidos en la técnica. Las smEV se pueden generar a partir de cualquiera de las varias especies bacterianas, por ejemplo *Veillonella parvula* o *V. atypica*.

[583] Por ejemplo, se obtienen ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY) u otro proveedor. Se resuspenden 100,000 células tumorales colorrectales CT-26 (ATCC CRL-2638) en PBS estéril y se inoculan en presencia de Matrigel al 50 %. Se inyectan por vía subcutánea las células tumorales CT-26 en un flanco trasero de cada ratón. Cuando los volúmenes del tumor alcanzan un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de la célula tumoral), se distribuyen los animales en varios grupos de tratamiento (p. ej., vehículo; smEV de *Veillonella*, smEV de *Bifidobacteria*, con o sin anticuerpo anti-PD-1). Los anticuerpos se administran por vía intraperitoneal (i.p.) a 200 µg/factor (100 µl volumen final) cada cuatro días, desde el día 1, durante un total de 3 veces (Q4Dx3) y las smEV se administran por vía oral o intravenosa y en dosis variadas y en tiempos variados. Por ejemplo, las smEV (5 µg) se

inyectan por vía intravenosa (i.v.) cada tres días, desde el día 1 durante un total de 4 veces (Q3Dx4) y se evalúan los ratones para el crecimiento del tumor. Se inyecta por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15 o 20 ug smEV/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis.

[584] Cuando los volúmenes tumorales alcanzan un promedio de 100 mm^3 (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de las células tumorales), los animales se distribuyen en los siguientes grupos: 1) Vehículo; 2) smEV de *Neisseria Meningitidis* aisladas de la vacuna Bexsero®; y 3) anticuerpo anti-PD-1. Se administran por vía intraperitoneal (ip) los anticuerpos a $200 \text{ } \mu\text{g/ratón}$ ($100 \text{ } \mu\text{l}$ de volumen final) cada cuatro días, comenzando el día 1, y las smEV *Neisseria Meningitidis* se administran por vía intraperitoneal (ip) diariamente, comenzando el día 1 hasta la conclusión del estudio.

[585] Cuando los volúmenes tumorales alcanzan un promedio de 100 mm^3 (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de las células tumorales), los animales se distribuyeron en los siguientes grupos: 1) vehículo; 2) anticuerpo anti-PD-1; y 3) smEV *V. parvula* (7.0×10^{10} recuento de partículas). Se administraron por vía intraperitoneal (ip) los anticuerpos a $200 \text{ } \mu\text{g/ratón}$ ($100 \text{ } \mu\text{l}$ de volumen final) cada cuatro días, comenzando el día 1, y se inyectaron smEV por vía intravenosa (iv) diariamente, comenzando el día 1 hasta la conclusión del estudio y tumores medidos para el crecimiento. El día 11, el grupo de smEV *V. parvula* mostró una inhibición del crecimiento tumoral que fue significativamente mejor que la observada en el grupo anti-PD-1 (**Figura 16**). Se realiza la prueba de Welch para el tratamiento frente al vehículo. En un estudio que observa la

respuesta a la dosis de smEV purificada a partir de *V. parvula* y *V. atypica*, la dosis más alta de smEV demostró la mayor eficacia (**Figuras 17 y 18**), aunque en un estudio con smEV de *V. tobetsuensis*, las dosis más elevadas no correspondían necesariamente una eficacia superior (**Figura 19**).

Ejemplo 28: Administración de las composiciones de smEV para tratar modelos de tumor de ratón

[586] Como se describe en el Ejemplo 27, se genera un modelo de cáncer de ratón inyectando por vía subcutánea una línea celular tumoral de una muestra de tumor derivada del paciente y permitiendo que se injerte en ratones sanos. Los métodos proporcionados en el presente documento se pueden realizar usando una de varias estirpes celulares del tumor diferentes que incluyen, a mero título enunciativo: Células B16-F10 o B16-F10-SIY como modelo ortotópico de melanoma, células Panc02 como modelo ortotópico de cáncer pancreático (Maletzki *et al.*, 2008, Gut 57:483-491), células LLC1 como modelo ortotópico de cáncer de pulmón y RM-1 como modelo ortotópico de cáncer de próstata. Como ejemplo, pero sin limitación, los métodos para estudiar la eficacia de las smEV en el modelo B16-F10 se proporcionan en profundidad el presente documento.

[587] Un modelo de melanoma espontáneo de ratón con melanoma espontáneo con una frecuencia metastásica muy alta se usa para evaluar la capacidad de las bacterias para reducir el crecimiento tumoral y la propagación de metástasis. Las smEV elegidas para este ensayo son composiciones que muestran activación mejorada de subconjuntos de células inmunes y estimulan la destrucción mejorada de células tumorales *in vitro*. Se obtiene la línea celular de melanoma de ratón B16-F10 de la ATCC. Las células se cultivan *in vitro* como una monofase en medio RPMI,

complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales que crecen exponencialmente se recogen mediante tripsinización, se lavan tres veces con PBS frío 1x, y se prepara una suspensión de 5E6 células/ml para la administración. Se usan ratones C57BL/6 hembra para este experimento. Los ratones tienen 6-8 semanas de edad y pesan aproximadamente 16-20 g. Para el desarrollo del tumor, cada ratón se inyecta SC en el flanco con 100 µl de la suspensión de células B16-F10. Se anestesia a los ratones con ketamina y xilazina antes del trasplante de células. Los animales utilizados en el experimento pueden comenzar con un tratamiento antibiótico 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 potable del día 2 al 5 y una inyección intraperitoneal de clindamicina (10 mg/kg) el día 7 después de la inyección del tumor.

[588] Se mide el tamaño del tumor primario del flanco con un calibrador cada 2-3 días y el volumen del tumor se calcula usando la siguiente fórmula: volumen del tumor = ancho del tumor × longitud del tumor × 0.5. Después de que el tumor primario alcanza aproximadamente 100 mm³, los animales se clasifican en varios grupos según su peso corporal. Luego se toman aleatoriamente los ratones de cada grupo y se asignan a un grupo de tratamiento. Las composiciones de las smEV se preparan como se describió anteriormente. Los ratones se inocularon oralmente por sonda gástrica con aproximadamente 7.0e+09 to 3.0e+12 partículas de smEV. Como alternativa, las smEV se administran por vía intravenosa. Los ratones reciben las smEV diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente,

o en cualquier otro programa de dosificación durante el período de tratamiento. Se pueden inyectar por vía intravenosa a los ratones con las smEV en la vena de la cola o se inyectan directamente en el tumor. Se puede inyectar a los ratones smEV, con o sin bacterias vivas, y/o smEV con o sin bacterias destruidas o inactivadas/debilitadas. Pueden inyectarse o administrarse oralmente por sonda gástrica a los ratones semanalmente o una vez al mes. Los ratones pueden recibir combinaciones de smEV purificados y bacterias vivas para maximizar el potencial de matar tumores. Se alojan todos los ratones en condiciones específicas libres de patógenos siguiendo protocolos aprobados. El tamaño del tumor, el peso del ratón y la temperatura corporal se controlan cada 3-4 días y los ratones se sacrifican humanamente 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 toman muestras de sangre semanalmente y se realiza una necropsia completa en condiciones estériles al terminar el protocolo.

[589] Pueden visualizarse las células cancerosas fácilmente en el modelo de melanoma B16-F10 de ratón debido a su producción de melanina. Siguiendo protocolos estándar, se recogen muestras de tejido de ganglios linfáticos y órganos de la región del cuello y el tórax y se analiza la presencia de micro y macro metástasis usando la siguiente regla de clasificación. Un órgano se clasifica como positivo para metástasis si se encuentran al menos dos lesiones micro-metastásicas y una macro-metastásica por ganglio linfático u órgano. Las micro-metástasis se detectan al teñir las secciones de tejido linfoide embebido en parafina con hematoxilina-eosina siguiendo protocolos estándar conocidos por un experto en la técnica. El número total de metástasis se correlaciona con el volumen del tumor primario y se

observa que el volumen del tumor se correlaciona significativamente con el tiempo de crecimiento tumoral y el número de macro y micro metástasis en los ganglios linfáticos y los órganos viscerales y también con la suma de todas las metástasis observadas. Se identifican veinticinco sitios metastásicos diferentes como se describió previamente (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).

[590] Se analizan adicionalmente las muestras de tejido tumoral para detectar linfocitos infiltrantes de tumores. Pueden aislarse los linfocitos T citotóxicos CD8 + mediante FACS y luego pueden analizarse adicionalmente usando micromatrices p/MHC de clase I personalizadas para revelar su especificidad antigénica (véase por ejemplo Deviren G., et al., Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays, J. Mol. Recognit., 2007 enero-febrero;20(1):32-8). Los linfocitos T CD4+ pueden analizarse usando micromatrices personalizadas p/MHC de clase II.

[591] En varios puntos de tiempo, se sacrifican ratones y se pueden extirpar tumores, ganglios linfáticos u otros tejidos para análisis de citometría de flujo ex vivo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tumores se disocian usando un cóctel de enzimas de disociación tumoral Miltenyi según las instrucciones del fabricante. Se registran los pesos de los tumores y se colocan los tumores se cortan y luego en tubos de 15 ml que contienen el cóctel de enzimas y se colocan en hielo. Luego, las muestras se colocan en un agitador suave a 37 °C durante 45 minutos y se inactivan con hasta 15 ml de RPMI completo. Cada suspensión celular se cuela a través de un filtro de 70 µm en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos. Se resuspenden las células en tampón

FACS y se lavan para eliminar los restos restantes. Si es necesario, se vuelven a filtrar las muestras a través de un segundo filtro de 70 μ m en un tubo nuevo. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de células paninmunes CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo con células inmunes obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunes purificadas infiltradas de tumor CD45+ obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones tumorales para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[592] También se realiza el mismo experimento con un modelo de ratón de metástasis múltiples de melanoma pulmonar. La línea celular de melanoma de ratón B16-BL6 se obtiene de la ATCC y las células se cultivan *in vitro* tal como se describe anteriormente. Se usan ratones C57BL/6 hembra para este experimento. Los ratones tienen 6-8 semanas de edad y pesan aproximadamente 16-20 g. Para el desarrollo del tumor, cada ratón se inyecta en la vena de la cola con 100 μ l de una suspensión de 2E6 células/ml de células B16-

BL6. Las células tumorales que se injertan tras la inyección IV terminan en los pulmones.

[593] Se sacrifican humanamente los ratones después de 9 días. Se pesan y se analizan los pulmones para detectar la presencia de nódulos pulmonares en la superficie pulmonar. Se blanquean los pulmones extraídos con la solución de Fekete, que no blanquea los nódulos tumorales debido a la melanina en las células B16, aunque una pequeña fracción de los nódulos es amelanótica (es decir, blanca). Se cuenta cuidadosamente el número de nódulos tumorales para determinar la carga tumoral en los ratones. Normalmente, se encuentran 200-250 nódulos pulmonares en los pulmones de los ratones del grupo de control (es decir, sonda de PBS).

[594] Se calcula el porcentaje de carga tumoral para varios grupos de tratamiento. Se define el porcentaje de carga tumoral como el número medio de nódulos pulmonares en las superficies pulmonares de los ratones que pertenecen a un grupo de tratamiento dividido por el número medio de nódulos pulmonares en las superficies pulmonares de los ratones del grupo de control.

[595] Las biopsias tumorales y las muestras de sangre se envían para el análisis metabólico mediante las técnicas LCMS u otros métodos conocidos en la técnica. Los niveles diferenciales de aminoácidos, azúcares, lactato, entre otros metabolitos, entre los grupos de prueba demuestran la capacidad de la composición microbiana para alterar el estado metabólico del tumor.

Secuenciación de ARN para determinar el mecanismo de acción

[596] Se purifican las células dendríticas de tumores, placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos. Se lleva a cabo el análisis de secuenciación de ARN y se analiza según las técnicas estándar conocidas por un experto

en la técnica (Z. Hou. *Scientific Reports*. 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015)). En el análisis, se coloca atención específica en los genes de la vía inflamatoria innata, incluidos los TLR, CLR, NLR, STING, citocinas, quimiocinas, procesamiento de antígenos y vías de presentación, presentación cruzada y coestimulación de linfocitos T.

[597] En lugar de ser sacrificados, pueden reexponerse algunos ratones con una inyección de células tumorales en el costado contralateral (u otra área) para determinar el impacto de la respuesta de memoria del sistema inmune en el crecimiento del tumor.

Ejemplo 29: Administración de las smEV para tratar los modelos de tumor de ratones en combinación con la inhibición de PD-1 o PD-L1

[598] Para determinar la eficacia de las smEV en modelos de tumor de ratón, en combinación con inhibición de PD-1 o PD-L1, se puede usar un modelo de tumor de ratón como se describe arriba.

[599] Las smEV se evalúan por su eficacia en el modelo de tumor de ratón, ya sea solo o en combinación con células bacterianas completas y con o sin anti-PD-1 o anti-PD-L1. Las smEV, células bacterianas, y/o anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administran en varios puntos temporales y en dosis variadas. Por ejemplo, el día 10 después de la inyección del tumor, o después de que el volumen del tumor alcanza 100 mm³, se tratan los ratones solo con smEV o en combinación con anti-PD-1 o anti-PD-L1.

[600] Las smEV se pueden administrar a los ratones por vía oral, intravenosa o intratumoral. Por ejemplo, se inyecta a algunos ratones por vía intravenosa con cualquiera de 7.0e+09 a 3.0e+12 partículas de smEV. Mientras que algunos

ratones reciben smEV a través de inyección i.v., otros ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, oral, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}:1$ (smEV: células bacterianas).

[601] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[602] También se inyectan a algunos grupos de ratones con dosis efectivas de inhibidor del punto de control. Por ejemplo, los ratones reciben 100 µg de mAb anti-PD-L1 (clon 10f.9g2, BioXCell) u otro mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 en 100 µl de PBS, y algunos ratones reciben el vehículo y/u otro control apropiado (por ejemplo control de anticuerpos). Se inyectan el mAb a los ratones 3, 6, y 9 días después de la inyección inicial. Para evaluar si la inhibición del punto de control y la inmunoterapia con smEV

tienen un efecto antitumoral aditivo, se incluyen ratones control que reciben mAB anti-PD-1 o anti-PD-L1 en el panel de control estándar. Se pueden evaluar los puntos finales primarios (tamaño del tumor) y secundarios (linfocitos infiltrantes del tumor y análisis de citocinas), y algunos grupos de ratones se vuelven a plantear con una posterior inoculación de células tumorales para evaluar el efecto del tratamiento en la respuesta de la memoria.

Ejemplo 30: smEV en un modelo de ratón de hipersensibilidad del tipo retardado (DTH)

[603] La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es un modelo animal de dermatitis atópica (o dermatitis alérgica de contacto), según lo revisado por 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 han usado varias variaciones del modelo de DTH y se conocen bien 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).

[604] Se puede inducir DTH en una variedad de cepas de ratas y ratones usando varios haptenos o antígenos, por ejemplo, un antígeno emulsionado con un adyuvante. La DTH se caracteriza por la sensibilización, así como una reacción mediada por linfocitos T específicos de antígeno que produce eritema, edema e infiltración celular, especialmente infiltración de células presentadoras de antígeno (APC),

eosinófilos, linfocitos T CD4+ activados y linfocitos Th2 que expresan citocinas.

[605] En general, los ratones se preparan con un antígeno administrado en el contexto de un adyuvante (p. ej., adyuvante completo de Freund) para inducir una respuesta inmunitaria secundaria (o memoria) medida por la inflamación y el título de anticuerpos específicos de antígeno.

[606] La dexametasona, un corticoesteroide, es un antiinflamatorio conocido que mejora las reacciones de DTH en ratones, y sirve como control positivo para suprimir la inflamación en este modelo (Taube y Carlsten, "Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice". *Inflamm Res.* 2000. 49(10): 548-52). Para el grupo de control positivo, se preparó una solución madre de 17 mg/ml de dexametasona el día 0 diluyendo 6.8 mg de dexametasona en 400 µl de etanol al 96 %. Para cada día de dosificación, se prepara una solución de trabajo diluyendo la solución madre 100 veces en PBS estéril para obtener una concentración final de 0.17 mg/ml en un vial con tabique para la administración intraperitoneal. Los ratones tratados con dexametasona reciben 100 µl de dexametasona i.p. (5 ml/kg de una solución de 0.17 mg/ml). La sacarosa congelada sirve como control negativo (vehículo). En el estudio descrito a continuación, se administraron las dosis diarias del vehículo, dexametasona (control positivo) y smEV.

[607] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en el modelo de ratón de DTH, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6 de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor. A los grupos de ratones se les administran cuatro inyecciones subcutáneas (s.c.) en

cuatro sitios en la parte posterior (superior e inferior) de antígeno (p. ej., ovoalbúmina (OVA)) o hemocianina de lapa californiana (KLH) a una dosis eficaz (p. ej., 50 μ l de volumen total por sitio). Para una respuesta de DTH, a los animales se les inyectan por vía intradérmica (i.d.) en las orejas bajo anestesia con ketamina/xilazina (aproximadamente 50 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente). Algunos ratones sirven como animales de control. Se inducen algunos grupos de ratones con 10 μ l por oreja (control del vehículo (DMSO al 0.01 % en solución salina) en la oreja izquierda y antígeno (21.2 μ g (12 nmol) en la oreja derecha) en el día 8. Para medir la inflamación de la oreja, se mide el espesor de la oreja de los animales sujetándolos con la mano usando un micrómetro Mitutoyo. Se mide el espesor de la oreja antes de la inducción intradérmica como el nivel basal para cada animal individual. Posteriormente, se mide el espesor de la oreja dos veces después de la inducción intradérmica, aproximadamente a las 24 y 48 horas (es decir, los días 9 y 10).

[608] Se inicia el tratamiento con smEV en algún momento, o bien en el momento del cebado o bien alrededor del tiempo de la inducción de DTH. Por ejemplo, pueden administrarse las smEV al mismo momento que las inyecciones subcutáneas (día 0), o pueden administrarse antes de, o después de, la inyección intradérmica. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 μ g/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis.

[609] Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de inyección i.v., otros ratones pueden recibir smEV a través de la inyección intraperitoneal (i.p.), la inyección subcutánea (s.c.), la administración por vía nasal, la administración oral, administración tópica, inyección intradérmica (i.d.), u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 0), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[610] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[611] Para las smEV, la proteína total se mide usando ensayos Bio-rad (n.º de CAT 5000205) realizados por instrucciones del fabricante.

[612] Se prepararon recientemente la emulsión de hemocianina de lapa californiana (KLH) y adyuvante de Freund completo (CFA) en el día de inmunización (día 0). Con este fin, se pesan 8 mg de polvo KLH y se resuspende completamente en 16 ml de solución salina. Se preparó una emulsión

mezclando el KLH/solución salina con un volumen igual de solución de CFA (p. ej., 10 ml de KLH/solución salina + 10 ml de solución de CFA) usando jeringas y un conector luer lock. Se mezcló vigorosamente KLH y CFA durante varios minutos para formar una emulsión de color blanco para obtener la máxima estabilidad. Se realizó una prueba de la bota para controlar si se obtenía una emulsión homogénea.

[613] El día 0, ratones hembra C57Bl/6J, aproximadamente 7 semanas de edad, se prepararon con antígeno KLH en CFA mediante inmunización subcutánea (4 sitios, 50 μ l por sitio). Se evaluaron smEV de *P. histicola* y smEV de *P. histicola* liofilizadas mediante sonda gástrica u oral en dosificaciones bajas ($6.0E+07$), medias ($6.0E+09$) y altas ($6.0E+11$).

[614] El día 8, los ratones se desafiaron por vía intradérmica (i.d.) con 10 μ g de KLH en solución salina (en un volumen de 10 μ l) en el oído izquierdo. El grosor de la oreja se midió 24 horas después de la exposición al antígeno (**Figura 20**). Según lo determinado por el grosor de la oreja, las smEV *P. histicola* fueron eficaces en la eliminación de la inflamación en las formas no liofilizadas y liofilizadas.

[615] Para estudios sobre inflamación futuros, pueden tratarse algunos grupos de ratones con agente antiinflamatorio o (p. ej. anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF u otro tratamiento) y/o un tratamiento apropiado de control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[616] En varios puntos temporales, se pueden tomar muestras de suero. Se pueden sacrificar otros grupos de ratones y pueden extirparse los ganglios linfáticos, el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), el intestino delgado, el colon y otros tejidos para estudios histológicos, histológicos ex vivo, análisis citométrico de flujo de

citocinas y/o usando métodos conocidos en la técnica. Se desangran algunos ratones desde el plexo orbital con anestesia con O₂/CO₂ y se realizan ensayos ELISA.

[617] Los tejidos se pueden disociar usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de células panmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Rorγ-t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, TNFα, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL12p40, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1b, IFNγ, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIG, IP10, MIP1b, RANTES, y MCP-1. El análisis de citocinas puede realizarse en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[618] Se pueden extirpar las orejas de los animales sacrificados y se colocan en un cóctel inhibidor de proteasa frío sin EDTA (Roche). Se homogenizan las orejas usando disrupción con perlas y se analiza la presencia de diversas citocinas en los sobrenadantes mediante el kit Luminex (EMD Millipore) según las instrucciones del fabricante. Además,

se disocian los ganglios linfáticos cervicales a través de un filtro celular, se lavan y se tiñen para FoxP3 (PE-FJK-16s) y CD25 (FITC-PC61.5) usando métodos conocidos en la técnica.

[619] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de DTH, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse con el antígeno de exposición un tiempo después y se analizaron a los ratones por su propensión a DTH y gravedad de la respuesta.

Ejemplo 31: smEV en un modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

[620] EAE es un modelo animal bien estudiado de esclerosis múltiple, según lo revisado por 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 con mielina, mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T encefalitogénicas activadas, o el uso de ratones transgénicos TCR susceptibles a EAE, como se discute en Mangalam *et al.*, (Two discreet 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).

[621] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en el modelo de roedor de EAE, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Además, las smEV se pueden administrar por vía oral o mediante administración intravenosa. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6 hembra de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY). A los grupos de ratones se les administran dos

inyecciones subcutáneas (s.c.) en dos sitios en la parte posterior (superior e inferior) de 0.1 ml de glicoproteína de oligodendrocitos 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 mató la emulsión de Mycobacterium tuberculosis H37Ra/ml). Aproximadamente 1-2 horas después de lo anterior, se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) a los ratones con 200 ng de toxina de tos ferina (PTx) en 0.1 ml de PBS (2 ug/ml). Se administra una inyección IP adicional de PTx el día 2. Como alternativa, se usa una cantidad apropiada de un péptido de mielina alternativo (p. ej., proteína proteolípida (PLP)) para inducir EAE. Algunos animales sirven como controles sin tratar. La gravedad de EAE se evalúa y se asigna un puntuación de discapacidad diariamente a partir del día 4 según los métodos conocidos en la técnica (Mangalam *et al.* 2012).

[622] Se inicia el tratamiento con smEV en algún momento, o bien en el momento de la inmunización o bien después de la inmunización con EAE. Por ejemplo, pueden administrarse smEV al mismo tiempo que la inmunización (día 1), o pueden administrarse ante los primeros signos de discapacidad (p. ej., cola flácida), o durante EAE grave. Las smEV se administra en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de inyección i.v., otros ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, oral, u otros medios de

administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[623] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[624] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios adicionales o agentes terapéuticos EAE (por ejemplo anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, vitamina D, esteroides, agentes antiinflamatorios u otros tratamientos), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[625] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del

tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[626] En diversos puntos de tiempo, se sacrifican los ratones y pueden extirparse los sitios de inflamación (p. ej., cerebro y médula espinal), los ganglios linfáticos u otros tejidos para un análisis citológico *ex vivo* histológico, de citocinas y/o de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo con células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias infiltradas del sistema nervioso central (SNC) CD45+ purificadas obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[627] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados,

algunos ratones pueden reexponerse con un desencadenante de la enfermedad (p. ej., linfocitos T encefalitogénicos activados o inyección de nuevo de péptidos inductores de EAE). Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad de EAE después de la reexposición.

Ejemplo 32: smEV en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA)

[628] La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal comúnmente utilizado para estudiar la artritis reumatoide (AR), según lo descrito por Caplazi *et al.* (Mouse models of rheumatoid arthritis. *Veterinary Pathology*. 1 de sept. de 2015. 52(5): 819-826) (véase 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 de oct. de 2015; 5(20): e1626).

[629] Entre otras versiones del modelo de roedor de CIA, un modelo implica inmunizar ratones HLA-DQ8 Tg con colágeno de tipo II de pollo como se describe por Taneja *et al.* (*J. Immunology*. 2007. 56: 69-78; véase también Taneja *et al.* *J. Immunology* 2008. 181: 2869-2877; y Taneja *et al.* *Arthritis Rheum.*, 2007. 56: 69-78). La purificación del CII de pollo ha sido descrita por Taneja *et al.* (*Arthritis Rheum.*, 2007. 56: 69-78). Se monitorizan los ratones para detectar el comienzo y la progresión de la enfermedad de la CIA después de la inmunización, y se evalúa la gravedad de la enfermedad y "califica" según lo descrito por Wooley, J. *Exp. Med.* 1981. 154: 688-700.

[630] Se inmunizan los ratones para la inducción de CIA y se separan en varios grupos de tratamiento. Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en CIA, ya sea

solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

[631] Se inicia el tratamiento con smEV en el momento de la inmunización con colágeno o después de la inmunización. Por ejemplo, en algunos grupos, se pueden administrar las smEV en el mismo momento que la inmunización (día 1) o se pueden administrar las smEV ante los primeros signos de enfermedad o ante la aparición de síntomas graves. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[632] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la

dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[633] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios adicionales o agentes terapéuticos CIA (p. ej., anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, vitamina D, esteroides, agentes antiinflamatorios u otros tratamientos), y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[634] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[635] En diversos puntos de tiempo, se obtienen muestras de suero para evaluar los niveles de anticuerpos IgG CII anti-pollo y anti-ratón usando un ELISA estándar (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). Además, se sacrifica a algunos ratones y pueden extirparse los sitios de inflamación (por ejemplo, la cápsula sinovial), los ganglios linfáticos u otros tejidos para el análisis histológico, de citocinas y/o por citometría de flujo utilizando métodos conocidos en la técnica. Se analizan el líquido sinovial y la cápsula sinovial para determinar la infiltración de células plasmáticas y la presencia de anticuerpos usando técnicas

conocidas en la técnica. Además, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación de acuerdo con las instrucciones del fabricante para examinar los perfiles de los infiltrados celulares. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas en la cápsula sinovial CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[636] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse con un desencadenante de la enfermedad (p. ej., inyección de nuevo con péptidos inductores de CIA). Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad de CIA después del reexposición.

Ejemplo 33: smEV en un modelo de ratón de colitis

[637] La colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) es un modelo animal de colitis bien estudiado, según lo revisado por 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 Chassaing *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 4 de feb de 2014; 104: Unidad 15.25).

[638] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de colitis inducida por DSS, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras con o sin la adición de otros agentes antiinflamatorios.

[639] Los grupos de ratones se tratan con DSS para inducir colitis como se conoce en la técnica (Randhawa *et 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, se obtienen ratones C57Bl/6 macho de 6-8 semanas de edad de Charles River Labs, Taconic, u otro proveedor. Se induce colitis añadiendo DSS al 3 % (pmEV Biomedicals, n.º de Cat. 0260110) al agua de bebida. Algunos ratones no reciben DSS en el agua de bebida y sirven como controles sin tratar. Algunos ratones reciben agua durante cinco (5) días. Algunos ratones pueden recibir DSS por una duración más corta o más de cinco (5) días. Se controlan los ratones y se califican usando un índice de actividad de discapacidad conocido en la técnica basado en la pérdida de peso (p. ej., sin pérdida de peso (puntuación 0); 1-5 % de pérdida de peso (puntuación 1); 5-10 % de pérdida de peso (puntuación 2)); consistencia de las heces (por ejemplo normal (puntuación 0); heces sueltas (puntuación 2); diarrea (puntuación 4)); y sangrado (p. ej.,

sin sangre (puntuación 0), hemocultivo positivo (puntuación 1); hemocultivo positivo y sangrado de sedimento visual (puntuación 2); sangre alrededor del ano, sangrado severo (puntuación 4).

[640] Se inicia el tratamiento con smEV en algún momento, o bien el día 1 de la administración de DSS, o bien en algún momento posterior. Por ejemplo, pueden administrarse las smEV al mismo tiempo que la iniciación de DSS (día 1), o pueden administrarse tras los primeros signos de la enfermedad (por ejemplo pérdida de peso o diarrea), o durante las fases de colitis grave. Se observan diariamente el peso, la morbilidad, la supervivencia, la presencia de diarrea y/o heces con sangre en los ratones.

[641] Las smEV se administran en varias dosis y a intervalos definidos. Por ejemplo, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 y 3.0×10^{12} partículas de las smEV. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[642] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al

igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[643] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agente antiinflamatorio adicional o (por ejemplo anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, u otro tratamiento), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[644] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones reciben DSS sin recibir antibióticos de antemano.

[645] En diversos puntos de tiempo, los ratones se someten a endoscopia por video usando un endoscopio para animales pequeños (Karl Storz Endoskope, Alemania) bajo anestesia con isoflurano. Se registran imágenes fijas y videos para evaluar la extensión de la colitis y la respuesta al tratamiento. Se puntúa la colitis usando criterios conocidos en la técnica. Se recoge el material fecal para estudio.

[646] En varios puntos de tiempo, se sacrifican ratones y se recogen el colon, el intestino delgado, el bazo y los ganglios linfáticos (p. ej., los ganglios linfáticos mesentéricos). Adicionalmente, se extrae la sangre en tubos de separación de suero. Se evalúa el daño tisular mediante

estudios histológicos que evalúan, pero sin limitación, arquitectura de la cripta, grado de infiltración de células inflamatorias y agotamiento de células caliciformes.

[647] Pueden extirparse el tracto gastrointestinal (GI), los ganglios linfáticos y/u otros tejidos para un análisis histológico, de citocinas y por citometría de flujo *ex vivo* usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se recogen y pueden disociarse los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del tubo GI CD45+ obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[648] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección frente a la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a un

desencadenante de la enfermedad. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la gravedad de colitis después de la reexposición.

Ejemplo 34: smEV en un modelo de ratón de diabetes tipo 1 (T1D)

[649] La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca a los islotes de Langerhans del páncreas, destruyendo así la capacidad del cuerpo para producir insulina.

[650] Hay diversos modelos de modelos animales de T1D, según la revisión de 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. jun de 2012; 166(3): 877-894. Existen modelos para T1D inducida químicamente, T1D inducida por patógenos, así como modelos en los que los ratones desarrollan espontáneamente T1D.

[651] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de T1D, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

[652] Dependiendo del método de inducción de T1D y/o si el desarrollo de T1D es espontáneo, el tratamiento con smEV se inicia en algún momento, o bien en el momento de la inducción o bien después de la inducción, o antes del inicio (o tras el inicio) de T1D que se produce de manera espontánea. smEV se administra en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0e+09 to 3.0e+12 partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda

gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día, mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[653] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[654] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con tratamientos adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo de control) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[655] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del

tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[656] Se controla la glucosa en sangre quincenalmente antes del inicio del experimento. En diversos puntos de tiempo posteriores, se mide la glucosa en sangre sin ayuno. En diversos puntos de tiempo, se sacrifican los ratones y pueden extirparse el sitio como el páncreas, los ganglios linfáticos u otros tejidos para un análisis citológico ex vivo histológico, de citocinas y/o de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se disocian los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias de infiltración de tejidos purificadas obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

También puede evaluarse la producción de anticuerpos mediante ELISA.

[657] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a un desencadenante de la enfermedad, o evaluarse la susceptibilidad a la recaída. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la aparición de diabetes y la gravedad después de la reexposición (o recaída espontánea).

Ejemplo 35: smEV en un modelo de ratón de colangitis esclerosante primaria (PSC)

[658] La colangitis esclerosante primaria (PSC) es una enfermedad hepática crónica que daña lentamente los conductos biliares y causa una cirrosis terminal. Se asocia con enteropatía inflamatoria (EI).

[659] Existen varios modelos animales de PSC, según la revisión de Fickert et al. (Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). J Hepatol. jun. de 2014 60(6): 1290-1303; véase también Pollheimer y 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 enfermedad en los modelos de PSC incluye inducción química (p. ej., colangitis inducida por 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocollidina (DDC)), inducida por patógenos (por ejemplo *Cryptosporidium parvum*), obstrucción biliar experimental (p. ej., ligación de conducto biliar común (CBDL)), y modelo de ratón transgénico de lesión biliar impulsada por antígeno (p. ej., ratones transgénicos Ova-Bil). Por ejemplo, se realiza la ligación del conducto biliar según lo descrito por Georgiev et al. (Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. Br J Surg. 2008. 95(5): 646-56), o se induce la enfermedad por la

exposición a DCC según lo descrito por Fickert et al. (A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. Am J Path. Vol 171(2): 525-536.

[660] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de PSC, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras con o sin la adición de algún otro agente terapéutico.

Colangitis inducida por DCC

[661] Por ejemplo, se obtienen ratones C57bl/6 de 6-8 semanas de edad de Taconic u otro proveedor. Se alimentan los ratones con una dieta complementada con DCC al 0.1 % durante diversas duraciones. Algunos grupos reciben complementos de DCC durante 1 semana, otros durante 4 semanas, otros durante 8 semanas. Algunos grupos de ratones pueden recibir una dieta complementada con DCC durante un periodo de tiempo y luego se les permite recuperarse, y reciben a partir de entonces una dieta normal. Puede estudiarse la capacidad de estos ratones para recuperarse de la enfermedad y/o su susceptibilidad a las recaídas tras la exposición posterior a DCC. Se inicia el tratamiento con smEV en algún momento, o bien en el momento de la alimentación con DCC o posterior a la exposición inicial a DCC. Por ejemplo, pueden administrarse las smEV el día 1 o pueden administrarse un tiempo después. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Como alternativa, algunos ratones pueden recibir entre 7.0e+09 y 3.0e+12 partículas de smEV. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de

administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[662] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[663] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con agentes adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[664] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos. En diversos puntos de tiempo, se analizan las muestras de suero

para ALT, AP, bilirrubina, y niveles de ácido biliar (BA) en suero.

[665] En diversos puntos de tiempo, se sacrifican ratones, se registran los pesos corporal y hepático, y pueden extirparse sitios de inflamación (por ejemplo hígado, intestino delgado, bazo), ganglios linfáticos u otros tejidos para caracterización histomorfología ex vivo, citocina y/o análisis de citometría de flujo utilizando 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, se tiñen los conductos biliares para detectar la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MadCAM-1. Se tiñen algunos tejidos para el examen histológico, mientras que otros se disocian utilizando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluyen el marcador de células paninmunes CD45, los marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima 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 de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 las citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro

tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas ex vivo.

[666] Se prepara el tejido hepático para el análisis histológico, por ejemplo, usando tinción con rojo sirio seguido de cuantificación del área fibrótica. Al final del tratamiento, se extrae sangre para el análisis plasmático de las enzimas hepáticas, por ejemplo, AST o ALT, y para determinar los niveles de bilirrubina. Puede medirse el contenido hepático de hidroxiprolina usando protocolos establecidos. Puede realizarse el análisis de expresión génica hepática de marcadores de inflamación y fibrosis mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero sin limitación, MCP-1, alfa-SMA, Col1a1, y TIMP-. Las mediciones de metabolitos pueden realizarse en plasma, tejidos y muestras fecales usando métodos de metabolómica establecidos. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones hepáticas para medir neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

[667] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección contra la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a DCC en otro momento. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la colangitis y la gravedad de colangitis después de la reexposición.

Colangitis inducida por BDL

[668] Como alternativa, se someten a prueba smEV para determinar su eficacia en colangitis inducidas por BDL. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6J con 6-8 semanas de edad de Taconic u otro proveedor. Después de un período de aclimatación, se somete a los ratones a un procedimiento quirúrgico para realizar una ligación del conducto biliar (BDL). Algunos animales de control reciben una cirugía

simulada. El procedimiento de BDL causa daño hepático, inflamación y fibrosis a los 7-21 días.

[669] Se inicia el tratamiento con smEV en algún momento, o bien en el momento de la cirugía o bien algún tiempo después de la cirugía. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones reciben smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[670] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y

administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[671] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con agentes adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[672] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos. En diversos puntos de tiempo, se analizan las muestras de suero para ALT, AP, bilirrubina, y niveles de ácido biliar (BA) en suero.

[673] En diversos puntos de tiempo, se sacrifican ratones, se registran los pesos corporal y hepático, y pueden extirparse sitios de inflamación (por ejemplo hígado, intestino delgado, bazo), ganglios linfáticos u otros tejidos para caracterización histomorfológica ex vivo, citocina y/o análisis de citometría de flujo utilizando 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, se tiñen los conductos biliares para detectar la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MadCAM-1. Se tiñen algunos tejidos para el examen histológico, mientras que otros se disocian utilizando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-

CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que se pueden analizar incluyen el marcador de células paninmunes CD45, los marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima 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 de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 las citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas ex vivo.

[674] Se prepara el tejido hepático para el análisis histológico, por ejemplo, usando tinción con rojo sirio seguido de cuantificación del área fibrótica. Al final del tratamiento, se extrae sangre para el análisis plasmático de las enzimas hepáticas, por ejemplo, AST o ALT, y para determinar los niveles de bilirrubina. Puede medirse el contenido hepático de hidroxiprolina usando protocolos establecidos. Puede realizarse el análisis de expresión génica hepática de marcadores de inflamación y fibrosis mediante qRT-PCR usando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, MCP-1, alfa-SMA, Col1a1, y TIMP. Las mediciones de metabolitos pueden realizarse en plasma, tejidos y muestras fecales usando métodos de metabolómica establecidos. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones hepáticas para medir neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

[675] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, puede analizarse la recuperación de algunos ratones.

Ejemplo 36: smEV en un modelo de ratón de esteatohepatitis no alcohólica (ENA)

[676] La esteatohepatitis no alcohólica (ENA) es una forma grave de la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), donde la acumulación de grasa hepática (esteatosis) y la inflamación provocan lesiones hepáticas y muerte de células hepatocitarias (hinchazón).

[677] Existen diversos modelos animales de ENA, tal como se revisa por Ibrahim *et al.* (Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflamm. Dig Dis Sci. mayo 2016. 61(5): 1325-1336; véase también Lau *et al.* Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances enero 2017 241(1): 36-44).

[678] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de ENA, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras, o sin la adición de otro agente terapéutico. Por ejemplo, los ratones C57Bl/6J de 8-10 semanas de edad, obtenidos de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor, se colocan en una dieta deficiente en metionina colina (MCD) durante un período de 4-8 semanas durante el cual se desarrollan las características ENA, incluyendo la esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis.

[679] Las smEV derivadas de *P. histicola* se someten a prueba para determinar su eficacia en un modelo de ENA de ratón, o bien solo o bien en combinación entre sí, en proporciones variables, con o sin la adición de otro agente terapéutico. Por ejemplo, los ratones C57Bl/6J de 8 semanas de edad, obtenidos de Charles River (Francia), u otro

proveedor, se aclimatan durante un período de 5 días, se aleatorizan en grupos de 10 ratones basados en peso corporal, y se colocan en una dieta con deficiencia de metionina y colina (MCD) por ejemplo A02082002B de Research Diets (EE. UU.), durante un período de 4 semanas durante el cual se desarrollaron características de ENA, que incluyen esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis. Se alimentan los ratones de control de comida con una dieta de comida normal, por ejemplo RM1 (E) 801492 de SDS Diets (R.U.). El control de alimentos, la dieta MCD y el agua se proporcionan a voluntad.

[680] Un sistema de puntuación NAS adaptado de Kleiner et al. (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. jun. de 2005 41(6): 1313-1321) se usa para determinar el grado de esteatosis (puntuación 0-3), inflamación lobular (puntuación 0-3), hinchazón de hepatocitos (puntuación 0-3) y fibrosis (puntuación 0-4). Se puede calcular una puntuación NAS de ratón individual sumando la puntuación de esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis (puntuación de 0-13). Además, los niveles de plasma AST y ALT se determinan utilizando un instrumento Pentra 400 de Horiba (EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. Los niveles de colesterol total hepático, triglicéridos, ácidos grasos, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa también se determinan utilizando métodos conocidos en la técnica.

[681] En otros estudios, el análisis de la expresión génica hepática de inflamación, fibrosis, esteatosis, estrés ER, o marcadores de estrés oxidativo puede realizarse mediante qRT-PCR utilizando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero sin limitación, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, α -SMA, Col11a1, CHOP, y NRF2.

[682] El tratamiento con smEV se inicia en algún momento, ya sea al comienzo de la dieta, o en algún momento después de la iniciación de la dieta (p. ej., una semana después). Por ejemplo, pueden administrarse las smEV al inicio del mismo día como el inicio de la dieta de MCD. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 1), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}:1$ (smEV: células bacterianas).

[683] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y

administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[684] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con terapéutica(s) de ENA adicionales (p. ej., Agonistas FXR, agonistas PPAR, antagonistas CCR2/5 u otro tratamiento) y/o control apropiado en diversos puntos temporales y dosis efectivas.

[685] En diversos puntos de tiempo y/o al final del tratamiento, se sacrifican los ratones y pueden extirparse el hígado, el intestino, la sangre, las heces u otros tejidos para análisis histológicos, bioquímicos, moleculares o de citocinas y/o citometría de flujo *ex vivo* utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los tejidos del hígado se pesan y preparan para el análisis histológico, que puede comprender la tinción con H&E, rojo sirio, y la determinación de la puntuación de actividad de ENA (NAS). En diversos puntos de tiempo, se extrae sangre para el análisis de plasma de enzimas hepáticas, por ejemplo, AST o ALT, usando ensayos estándar. Además, el contenido hepático de colesterol, triglicéridos o ácidos grasos puede medirse utilizando protocolos establecidos. El análisis de la expresión génica hepática de marcadores de la inflamación, fibrosis, esteatosis, estrés ER, o estrés oxidativo puede realizarse mediante qRT-PCR utilizando cebadores validados. Estos marcadores pueden incluir, pero sin limitación, IL-6, MCP-1, alfa-SMA, *Coll1a1*, CHOP y NRF2. Las mediciones de metabolitos pueden realizarse en plasma, tejidos y muestras fecales usando métodos de metabolómica bioquímicos y basados en espectrometría de masas establecidos. Las citocinas séricas se pueden analizar incluyendo, pero no se limitan a, 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 las citocinas puede

llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en secciones hepáticas o intestinales para medir los neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

[686] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, puede analizarse la recuperación de algunos ratones.

Ejemplo 37: smEV en un modelo de ratón de psoriasis

[687] La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica mediada por linfocitos T. La denominada psoriasis "tipo placa" es la forma más común de psoriasis y se caracteriza por escamas secas, placas rojas y engrosamiento de la piel debido a la infiltración de células inmunitarias en la dermis y la epidermis. Varios modelos animales han contribuido a la comprensión de esta enfermedad, según lo revisado por 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 1 de mayo. 182(9): 5836-45).

[688] La psoriasis puede inducirse en una variedad de modelos de ratones, incluyendo los que usan modelos transgénicos, deficientes, o de xenoinjerto, así como la aplicación tópica de imiquimod (IMQ), un ligando TLR7/8.

[689] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en el modelo de ratón de psoriasis, ya sea solo o en combinación con células bacterianas enteras con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios. Por ejemplo, se obtienen ratones C57Bl/6 o Balb/c de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY), u otro proveedor. Se

afeitan el lomo y la oreja derecha de los ratones. Los grupos de ratones reciben una dosis tópica diaria de 62.5 mg de crema IMQ comercialmente disponible (5 %) (Aldara; 3M Pharmaceuticals). Se aplica la dosis a las áreas afeitadas durante 5 o 6 días consecutivos. A intervalos regulares, los ratones reciben una puntuación según su eritema, formación de escamas y engrosamiento en una escala de 0 a 4, según lo descrito por van der Fits et al. (2009). Los ratones se monitorizaron para determinar el espesor de la oreja usando un micrómetro Mitutoyo.

[690] Se inicia el tratamiento con smEV en algún momento, ya sea en el momento de la primera aplicación de IMQ, o algo después. Por ejemplo, pueden administrarse las smEV al mismo momento que las inyecciones subcutáneas (día 0), o pueden administrarse antes de, o después de, la aplicación. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de sonda gástrica oral o inyección i.v., mientras que otros grupos de ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día (por ejemplo a partir del día 0), mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender

partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[691] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[692] Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios (por ejemplo anti-CD154, bloqueo de miembros de la familia TNF, u otro tratamiento), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

[693] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[694] En varios puntos temporales, se toman muestras de la piel de la espalda y las orejas para el análisis por tinción de criosecciones utilizando métodos conocidos en la técnica. Se sacrifican otros grupos de ratones y pueden extirparse los ganglios linfáticos, el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), el intestino delgado, el colon y otros tejidos para estudios histológicos, histológicos ex vivo, de citocinas y/o análisis de citometría

de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Pueden disociarse algunos tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las muestras de criosección, muestras de tejido, o células obtenidas ex vivo para su análisis por citometría de flujo utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, Tbet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias purificadas infiltradas en la piel CD45 + obtenidas ex vivo. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control.

[695] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección contra la psoriasis, en lugar de sacrificarse, algunos ratones pueden estudiarse para evaluar la recuperación, o se pueden volver a estimular con IMQ. Se analiza la susceptibilidad a la psoriasis y la gravedad de la respuesta en los grupos de ratones reexpuestos.

Ejemplo 38: smEV en un modelo de ratón de obesidad (DIO)

[696] Hay varios modelos animales de DIO, como se revisó por Tschop et al. (A guide to analysis of mouse energy metabolism. Nat. Methods. 2012; 9(1):57-63) y Ayala et al. (Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. Disease Models and Mechanisms. 2010; 3:525-534) y proporcionados por Physiogenex.

[697] Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia en un modelo de ratón de DIO, ya sea sola o en combinación con otras células bacterianas completas (vivas, destruidas, irradiadas y/o inactivadas, etc.) con o sin la adición de otros tratamientos antiinflamatorios.

[698] Dependiendo del método de inducción de DIO y/o si el desarrollo de DIO es espontáneo, el tratamiento con smEV se inicia en algún momento, o bien en el momento de la inducción o bien después de la inducción, o antes del inicio (o tras el inicio) de T1D que se produce de manera espontánea. Las smEV se administran en dosis variadas y a intervalos definidos. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o 20 ug/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa, algunos ratones reciben entre 7.0×10^9 to 3.0×10^{12} partículas de smEV por dosis. Mientras que algunos ratones reciben smEV a través de inyección i.v., otros ratones pueden recibir smEV mediante inyección intraperitoneal (i.p.), inyección subcutánea (s.c.), administración por vía nasal, oral, u otros medios de administración. Algunos ratones pueden recibir smEV cada día, mientras que otros pueden recibir smEV a intervalos alternativos (p. ej., cada dos días, o una vez cada tres días). Se puede administrar a los grupos de ratones una composición farmacéutica de la invención que comprende una

mezcla de smEV y células bacterianas. Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de smEV y bacterias completas en una proporción de 1:1 (smEV: células bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

[699] Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una administración separada de la administración de smEV. Al igual que con las smEV, la administración de células bacterianas puede variar según la vía de administración, la dosis y el horario. Las células bacterianas pueden estar vivas, muertas o debilitadas. Pueden recogerse las células bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

[700] Algunos grupos de ratones pueden tratarse con tratamientos adicionales y/o un control apropiado (p. ej., vehículo o anticuerpo de control) en diversos puntos de tiempo y a dosis efectivas.

[701] Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina (0.5 g/l), ampicilina (1.0 g/l), gentamicina (1.0 g/l) y anfotericina B (0.2 g/l) al agua potable, y el tratamiento con antibióticos se detiene en el momento del tratamiento o pocos días antes del tratamiento. Se tratan algunos ratones inmunizados sin recibir antibióticos.

[702] Se controla la glucosa en sangre quincenalmente antes del inicio del experimento. En diversos puntos de tiempo posteriores, se mide la glucosa en sangre sin ayuno. En diversos puntos de tiempo, se sacrifican los ratones y pueden extirparse el sitio como el páncreas, los ganglios linfáticos u otros tejidos para un análisis citológico ex vivo histológico, de citocinas y/o de flujo usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se

disocian los tejidos usando enzimas de disociación según las instrucciones del fabricante. Se tiñen las células para su análisis mediante citometría de flujo usando técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos de tinción pueden incluir anti-CD11c (células dendríticas), anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII, anti-CD8a, anti-CD4 y anti-CD103. Otros marcadores que pueden analizarse incluyen el marcador de todas las células inmunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Ror γ t, Granzima B, CD69, PD-1, CTLA-4), y marcadores de macrófagos/mieloides (CD11b, MHCII, CD206, CD40, CSF1R, PD-L1, Gr-1, F4/80). Además de la inmunofenotipificación, se pueden analizar las citocinas séricas, que incluyen, pero no se limitan a, 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 citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias de infiltración de tejidos purificadas obtenidas *ex vivo*. Finalmente, se lleva a cabo la inmunohistoquímica en diversas secciones de tejido para medir linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y expresión de proteína de molécula de punto de control. También puede evaluarse la producción de anticuerpos mediante ELISA.

[703] Para examinar el impacto y la longevidad de la protección de la enfermedad, en lugar de ser sacrificados, algunos ratones pueden reexponerse a un desencadenante de la enfermedad, o evaluarse la susceptibilidad a la recaída. Se analizan los ratones para determinar la susceptibilidad a la aparición de diabetes y la gravedad después de la reexposición (o recaída espontánea).

Ejemplo 39: Marcaje de smEV bacterianas

[704] Las smEV se pueden marcar para rastrear su biodistribución *in vivo* y para cuantificar y rastrear la ubicación celular en varias preparaciones y en ensayos realizados con células de mamífero. Por ejemplo, las smEV pueden radiomarcarse, incubarse con colorantes, marcarse fluorescentemente, marcarse luminiscentemente o marcarse con conjugados que contienen metales e isótopos de metales.

[705] Por ejemplo, se pueden incubar smEV con colorantes conjugados con grupos funcionales tales como NHS-éster, grupos de química clic, estreptavidina o biotina. La reacción del marcado puede producirse a una variedad de temperaturas durante minutos u horas y con o sin agitación o rotación. Luego, la reacción puede detenerse añadiendo un reactivo tal como seroalbúmina bovina (BSA), o un agente similar dependiendo del protocolo y una molécula de colorante libre o unida eliminada por ultracentrifugación, filtración, filtración centrífuga, purificación por columna de afinidad o diálisis. Las etapas de lavado adicionales que implican lavar tampones y agitar con vórtex o puede emplearse la agitación para asegurar la eliminación completa de moléculas de colorantes libres tales como se describe en Su Chul Jang et al, Small. 11, N.º 4, 456-461(2017).

[706] Las smEV marcadas fluorescentemente se detectan en células u órganos o en muestras *in vitro* y/o *ex vivo* mediante microscopía confocal, análisis de seguimiento de nanopartículas, citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o un sistema de formación de imágenes fluorescentes, tal como el Odyssey CLx LICOR (véase, por ejemplo, Wiklander et al. 2015. J. Extracellular Vesicles. 4:10.3402/jev.v4.26316). Adicionalmente, las smEV marcadas con fluorescencia se detectan en animales enteros y/o órganos disecados y tejidos

usando un instrumento como el espectro IVIS CT (Perkin Elmer) o Pearl Imager, como en H-I. Choi, et al. *Experimental & Molecular Medicine*. 49: e330 (2017).

[707] Las smEV pueden marcarse con conjugados que contienen metales e isótopos de metales usando los protocolos descritos anteriormente. Las smEV conjugadas con metales pueden administrarse a animales *in vivo*. Después, se pueden recoger las células a partir de órganos en varios puntos temporales y analizarse *ex vivo*. Como alternativa, las células procedentes de animales, seres humanos o líneas celulares inmortalizadas pueden tratarse con smEV marcadas con metales *in vitro* y posteriormente, las células se marcan con anticuerpos conjugados con metales y se fenotipan usando un instrumento de citometría por tiempo de vuelo (CyTOF), tal como el Helios CyTOF (Fluidigm) o se obtienen imágenes y se analizan usando un instrumento de formación de imágenes de masa de citometría, tal como el Hyperion Imaging System (Fluidigm). Adicionalmente, las smEV pueden marcarse con un radioisótopo para seguir la biodistribución de smEV (véase, por ejemplo, Miller et al., *Nanoscale*. 7 de mayo de 2014;6(9):4928-35).

Ejemplo 40: Microscopio electrónico de transmisión para visualizar las smEV bacterianas purificadas

[708] Las smEV se purifican a partir de cultivos bacterianos discontinuos. Se puede usar el microscopio electrónico de transmisión (TEM) para visualizar las smEV bacterianas purificadas (S. Bin Park, et al. *PLoS ONE*. 6(3):e17629 (2011). Las smEV se montan sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono de tamaño de malla 300 o 400 (Electron Microscopy Sciences, EE. UU.) durante 2 minutos y se lavaron con agua desionizada. Las smEV se tiñen negativamente usando acetato de uranilo al 2 % (p/v) durante 20 s - 1 min. Las rejillas de cobre se lavan con agua estéril

y se secan. Se adquieren las imágenes usando un microscopio electrónico de transmisión con un voltaje de aceleración de 100-120 kV. Las smEV teñidas aparentan un diámetro de 20-600 nm y son densas a los electrones. Se seleccionan 10-50 campos en cada rejilla.

Ejemplo 41: Elaboración de perfiles de la composición y el contenido de smEV

[709] Las smEV pueden caracterizarse mediante uno cualquiera de diversos métodos que incluyen, pero sin limitación, caracterización de NanoSight, electroforesis en gel de SDS-PAGE, transferencia de Western, ELISA, cromatografía líquida-espectrometría de masas y espectrometría de masas, dispersión dinámica de luz, niveles de lípidos, proteínas totales, relaciones lípido a proteína, análisis de ácido nucleico y/o potencial zeta.

Caracterización de NanoSight de las smEV

[710] Se utiliza el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) para caracterizar la distribución del tamaño de las smEV. Las preparaciones de smEV purificadas se analizan en una máquina NanoSight (Malvern Instruments) para evaluar el tamaño y la concentración de las smEV.

Electroforesis en gel SDS-PAGE

[711] Para identificar los componentes proteicos de las smEV purificadas, las muestras se analizan en un gel, por ejemplo un gel Bolt Bis-Tris Plus 4-12 % (Thermo-Fisher Scientific), usando técnicas estándar. Las muestras se hierven en tampón de muestra de SDS 1x durante 10 minutos, se enfrían a 4 °C y después se centrifugan a 16,000 x g durante 1 min. Las muestras se analizan posteriormente en un gel de SDS-PAGE y se tiñen usando una de diversas técnicas estándar (p. ej., tinción argéntica, azul de Coomassie, azul de código de gel) para la visualización de las bandas.

Análisis de inmunotransferencia

[712] Para identificar y cuantificar los componentes proteínicos específicos de las smEV purificadas, las proteínas de las smEV se separan mediante SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente y se someten a un análisis por transferencia de Western (Cvjetkovic et al., *Sci. Rep.* **6**, 36338 (2016)) y se cuantifican a través de ELISA.

Proteómica de smEV y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM/EM) y espectrometría de masas (EM)

[713] Las proteínas presentes en las smEV se identifican y cuantifican mediante técnicas de espectrometría de masas. Se pueden preparar las proteínas de smEV para CL-EM/EM usando técnicas estándar que incluyen reducción de proteínas usando solución de ditiotreitól (DTT) y digestión de proteínas usando enzimas como LysC y tripsina como se describe en Erickson et al., 2017 (*Molecular Cell*, VOLUMEN 65, PUBLICACIÓN 2, P361-370, 19 DE ENERO DE 2017). Como alternativa, se preparan péptidos tal como se describe por Liu et al. 2010 (*JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, junio de 2010, pág. 2852-2860 Vol. 192, No. 11), Kieselbach y Oscarsson 2017 (*Data Brief.* 2017 feb; 10: 426-431.), Vildhede et al., 2018 (*Drug Metabolism and Disposition* 8 de febrero de 2018). Después de la digestión, se analizan las preparaciones de péptidos directamente en dispositivos de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas para la identificación de proteínas dentro de una sola muestra. Para la cuantificación relativa de proteínas entre muestras, los digeridos de péptidos de diferentes muestras se marcan con etiquetas isobáricas usando el kit iTRAQ Reagent-8plex Multiplex (Applied Biosystems, Foster City, CA) o reactivos de etiquetas TMT 10plex y 11plex (Thermo Fischer Scientific, San José, CA, EE.UU.). Se marca cada producto de digestión

de péptido con una etiqueta isobárica diferente y luego se combinan los productos de digestión marcados en una mezcla de muestra. Se analiza la mezcla de péptidos combinada por CL-EM/EM para identificación y cuantificación. Se realiza una búsqueda en la base de datos usando los datos CL-EM/EM para identificar los péptidos marcados y las proteínas correspondientes. En el caso del marcado isobárico, la fragmentación del marcador adjunto genera un ion indicador de baja masa molecular que se utiliza para obtener una cuantificación relativa de los péptidos y proteínas presentes en cada smEV.

[714] Adicionalmente, se determina el contenido metabólico usando técnicas de cromatografía de líquidos combinadas con espectrometría de masas. Existe una variedad de técnicas para determinar el contenido metabólico de diversas muestras y un experto en la materia que implica extracción de solventes, separación cromatográfica y una variedad de técnicas de ionización acopladas a la determinación de masas (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 de triple cuadrupolo 4000 QTRAP (AB SCIEX) con una bomba de la serie 1100 (Agilent) y un muestreador automático HTS PAL (Leap Technologies). Se extraen muestras de medios u otras mezclas metabólicas complejas (~10 µl) usando nueve volúmenes de 74.9: 24.9: 0.2 (v/v/v) acetonitrilo/metanol/ácido fórmico que contiene patrones internos estables marcados con isótopos (valina-d8, Isotec; y fenilalanina-d8, Cambridge Isotope Laboratories). Los patrones pueden ajustarse o modificarse dependiendo de los metabolitos de interés. Se centrifugan las muestras (10 minutos, 9,000 g, 4 °C), y se

envían los sobrenadantes (10 µl) a CLEM inyectando la disolución en la columna HILIC (150 × 2.1 mm, 3 µm de tamaño de partícula). Se eluye la columna haciendo fluir una fase móvil al 5 % [formiato de amonio 10 mM, ácido fórmico al 0.1 % en agua] durante 1 minuto a una velocidad de 250 µl/min seguido de un gradiente lineal durante 10 minutos a una solución de fase móvil al 40 % [acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 %]. Se establece el voltaje de pulverización iónica en 4.5 kV y la temperatura de la fuente es de 450 °C.

[715] Se analizan los datos usando software disponible comercialmente como Multiquant 1.2 de AB SCIEX para integración de pico de espectro de masas. Los picos de interés deben seleccionarse manualmente y compararse con los patrones para confirmar la identidad del pico. Se realiza la cuantificación con estándares apropiados para determinar el número de metabolitos presentes en los medios iniciales, después del condicionamiento bacteriano y después del crecimiento de las células tumorales. También puede utilizarse una estrategia de metabolómica no dirigida usando bases de datos de metabolitos, como, entre otras, la base de datos NIST, para la identificación máxima.

[716] *Dispersión dinámica de la luz (DLS)*

[717] Las mediciones de DLS, incluida la distribución de partículas de diferentes tamaños en diferentes preparaciones de smEV, se toman usando instrumentos como DynaPro NanoStar (Wyatt Technology) y Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Niveles de lípidos

[718] Los niveles de lípidos se cuantifican usando FM4-64 (Life Technologies), por métodos similares a los descritos por A.J. McBroom *et al. J Bacteriol* 188:5385-5392. y A. Frias, *et al. Microb Ecol.* 59:476-486 (2010). Se incuban las muestras con FM4-64 (3.3 µg/ml en PBS durante 10 minutos

a 37 °C en la oscuridad). Después de la excitación a 515 nm, se mide la emisión a 635 nm usando un lector de placas Spectramax M5 (Molecular Devices). Se determinan las concentraciones absolutas mediante la comparación de muestras desconocidas con patrones (tales como vesículas de palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG)) de concentraciones conocidas. Se puede usar la lipidómica para identificar los lípidos presentes en las smEV.

Proteínas totales

[719] Se cuantifican los niveles de proteínas mediante ensayos estándar como los ensayos de Bradford y BCA. Se ejecutan los ensayos de Bradford usando Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad), según los protocolos del fabricante. Se realizan los ensayos de BCA usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo-Fisher Scientific). Se determinan las concentraciones absolutas por comparación con una curva patrón generada a partir de BSA de concentraciones conocidas. Como alternativa, se puede calcular la concentración de la proteína usando la ecuación de Beer-Lambert usando la absorbancia de la muestra a 280 nm (A280) según lo medido en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo-Fisher Scientific). Además, se puede usar la proteómica para identificar las proteínas en la muestra.

Razones de lípido:proteína

[720] Se generan las razones de lípido:proteína dividiendo las concentraciones de lípido por proteínas. Estos proporcionan una medida de la pureza de las vesículas en comparación con la proteína libre en cada preparación.

Análisis de ácido nucleico

[721] Se extraen los ácidos nucleicos de las smEV y se cuantifican usando un fluorómetro Qubit. Se evalúa la distribución del tamaño usando un BioAnalyzer y se secuencia el material.

Potencial zeta

[722] Se mide el potencial zeta de diferentes preparaciones usando instrumentos tales como el Zetasizer ZS (Malvern Instruments).

Ejemplo 42: Detección *in vitro* de smEV para la activación mejorada de células dendríticas

[723] Se considera que las respuestas inmunitarias *in vitro* estimular los mecanismos mediante los cuales se inducen las respuestas inmunitarias *in vivo*, p. ej., como respuesta a un microentorno de cáncer. En resumen, se aíslan PBMC de sangre venosa heparinizada de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente usando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) o de bazo de ratón o médula ósea usando el kit de aislamiento de células dendríticas de sangre humana a base de perlas magnéticas (Miltenyi Biotech, Cambridge, MA). Usando mAb anti-CD14 humano, se purifican los monocitos mediante Moflo y se cultivan 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, se estimula el cultivo con 0.2 ng/ml de IL-4 y 1000 U/ml de GM-CSF a 37 °C durante una semana. Como alternativa, la maduración se logra a través de la incubación con GM-CSF recombinante durante una semana o usando otros métodos conocidos a la técnica. Pueden recogerse las DC de ratón directamente del bazo usando el enriquecimiento de las células madre diferenciadas de las células hematopoyéticas. En resumen, la médula ósea se puede obtener de los fémures de ratones. Se recuperan las células y se lisan los glóbulos rojos. Se cultivan las células madre en medio de cultivo celular en GMCSF de ratón de 20 ng/ml durante 4 días. Se añade medio adicional que contiene 20 ng/ml de GM-CSF de ratón. El día 6, se eliminan el medio y las células no

adherentes y se reemplazan con medio de cultivo celular recién preparado que contiene 20 ng/ml de GM-CSF. El día 7 se añade una adición final de medio de cultivo celular con 20 ng/ml de GM-CSF. El día 10, se recogen las células no adherentes y se siembran en placas de cultivo celular durante la noche y se estimulan según sea necesario. Posteriormente, se tratan las células dendríticas con diversas dosis de smEV con o sin antibióticos. Por ejemplo, 25-75 ug/ml de smEV durante 24 horas con antibióticos. Las composiciones de smEV analizadas pueden incluir smEV de una sola especie o cepa bacteriana o una mezcla de smEV de uno o más géneros, 1 o más especies o 1 o más cepas (p. ej., una o más cepas de una especie). Se incluye PBS como un control negativo y LPS, anticuerpos anti-CD40 y/o smEV de *Bifidobacterium* spp. se usan como controles positivos. Tras la incubación, se tiñen las DC con anti CD11b, CD11c, CD103, CD8a, CD40, CD80, CD83, CD86, MHCI y MHCII, y se analizan mediante citometría de flujo. Las DC que tienen niveles significativamente aumentados de CD40, CD80, CD83 y CD86 en comparación con los controles negativos se consideran activadas por la composición de smEV bacterianas asociadas. Se repiten estos experimentos tres veces como mínimo.

[724] Para detectar la capacidad de las células epiteliales activadas por smEV para estimular las DC, se sigue el protocolo anterior con la adición de un cocultivo de smEV con células epiteliales de 24 horas antes de la incubación con las DC. Se lavan las células epiteliales después de la incubación con smEV y luego se cultivan conjuntamente con DC en ausencia de smEV durante 24 horas antes de procesarse como anteriormente. Las líneas celulares epiteliales pueden incluir Int407, HEL293, HT29, T84 y CAC02.

[725] Como medida adicional de la activación de las DC, se extraen 100 µl de sobrenadante de cultivo de los

pocillos después de 24 horas de incubación de las DC con smEV o células epiteliales tratadas con smEV y se analizan las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento secretados usando el Luminex Magpix multiplexado. Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen se prehumeden los pocillos con tampón y se añaden 25 µl de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo 1x y se preparan 2x 200 µl de tampón de lavado en cada pocillo usando el imán. Se añaden 50 µl de tampón de incubación, 50 µl de diluyente y 50 µl de muestras y se mezclan mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavan las perlas dos veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añaden 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado 1X y la suspensión se incuba durante 1 hora con agitación en la oscuridad. Luego se realizan dos lavados con 200 µl con tampón de lavado. Se añaden 100 µl de reactivo SAV-RPE 1x a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan tres lavados de 200 µl y se añaden 125 µl de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

[726] Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas incluyendo 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-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 IL-23, IL-25, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1α, TNFα, y VEGF. Se evalúan estas citocinas en muestras de origen humano y de ratón. Los aumentos de estas citocinas en las muestras tratadas con bacterias indican una producción mejorada de proteínas y citocinas del hospedador. Otras variaciones en este ensayo que examinan la capacidad de los tipos de células específicas para liberar citocinas se evalúan mediante la adquisición de estas células a través de métodos de clasificación y son

reconocidos por un experto en la materia. Además, también se evalúa el ARNm de citocinas para abordar la liberación de citocinas en respuesta a una composición de smEV.

[727] Puede repetirse este protocolo de estimulación de DC usando combinaciones de smEV purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 43: Selección *in vitro* de smEV para la activación mejorada de la destrucción de linfocitos T CD8 + cuando se incuban con células tumorales

[728] Se describen métodos *in vitro* para la detección de smEV que pueden activar la muerte de células tumorales por linfocitos T CD8 +. Brevemente, las DC se aíslan de PBMC humanas o bazos de ratones, usando técnicas conocidas en la técnica y se incuban *in vitro* con smEV de cepa única, mezclas de smEV y/o controles adecuados. Además, se obtienen los linfocitos T CD8 + a partir de PBMC humanas o bazos de ratón usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, el kit de aislamiento de linfocitos T CD8a+ de ratón a base de perlas magnéticas y el kit de aislamiento de linfocitos T CD8+ a base de perlas magnéticas (ambos de Miltenyi Biotech, Cambridge, MA). Después de la incubación de DC con las smEV durante algún tiempo (p. ej., durante 24 horas) o incubación de DC con las células epiteliales estimuladas por smEV, se eliminan las smEV del cultivo celular con lavados de PBS y 100 ul de medio fresco con antibióticos se agrega a cada pocillo y 200,000 linfocitos T se agregan a cada pocillo experimental en la placa de 96 pocillos. Se añade el anticuerpo anti-CD3 una concentración final de 2 ug/ml. Se deja que los cocultivos se incuben a 37 °C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

[729] Por ejemplo, aproximadamente 72 horas en la incubación del cocultivo, se colocan en placas las células tumorales en el ensayo usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se siembran en placas 50,000 células tumorales/pocillo por pocillo en placas nuevas de 96 pocillos. Las líneas celulares tumorales de ratón usadas pueden incluir B16.F10, SIY + B16.F10, y otras. Las líneas celulares tumorales humanas tienen un HLA compatible con el del donante, y pueden incluir líneas celulares PANC-1, UNKPC960/961, UNKC y HELA. Después de la compleción del cocultivo de 96 horas, se transfieren 100 μ l de la mezcla de linfocitos T CD8 + y DC a pocillos que contienen células tumorales. Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C en condiciones de oxígeno normales. Se puede usar estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte celular.

[730] Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para medir la muerte de células tumorales y caracterizar el fenotipo de células inmunes. En resumen, se tiñen las células tumorales con colorante de viabilidad. Se usa el análisis FACS para controlar específicamente las células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (muertas). También se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo. El fenotipo citotóxico de los linfocitos T CD8 + puede caracterizarse por los siguientes métodos: a) concentración de granzima B, IFN γ y TNF α en el sobrenadante de cultivo como se describe a continuación, b) expresión de superficie en linfocitos T CD8 + de marcadores de activación tales como DC69, CD25, CD154, PD-1, TCR gamma/delta, Foxp3, T-bet, granzima B, c) tinción de citocinas intracelulares de IFN γ , granzima B, TNF α en linfocitos T CD8+. También puede evaluarse el fenotipo de los linfocitos T CD4 + mediante

tinción intracelular de citocinas además de la concentración de citocinas en el sobrenadante, incluidas INF γ , TNF α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, quimiocinas, etc.

[731] Como una medida adicional de la activación de los linfocitos T CD8 +, se extraen 100 μ l de cultivo sobrenadante de los pocillos después de la incubación de 96 horas de los linfocitos T con DC y se analizan las citocinas secretadas, las quimiocinas y los factores de crecimiento utilizando el Luminex Magpix multiplexado. Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen se prehumeden los pocillos con tampón y se añaden 25 μ l de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo 1x y se preparan 2x 200 μ l de tampón de lavado en cada pocillo usando el imán. Se añaden 50 μ l de tampón de incubación, 50 μ l de diluyente y 50 μ l de muestras y se mezclan mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavan las perlas dos veces con 200 μ l de tampón de lavado. Se añaden 100 μ l de anticuerpo de detección biotinilado 1X y la suspensión se incuba durante 1 hora con agitación en la oscuridad. Luego se realizan dos lavados con 200 μ l con tampón de lavado. Se añaden 100 μ l de reactivo SAV-RPE 1x a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan tres lavados de 200 μ l y se añaden 125 μ l de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

[732] Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas, incluyendo 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-17, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1 α , TNF α , y VEGF. Se evalúan estas citocinas en muestras de origen humano y de ratón. Los aumentos de estas citocinas en las muestras tratadas con bacterias indican una producción

mejorada de proteínas y citocinas del hospedador. Otras variaciones en este ensayo que examinan la capacidad de los tipos de células específicas para liberar citocinas se evalúan mediante la adquisición de estas células a través de métodos de clasificación y son reconocidos por un experto en la materia. Además, también se evalúa el ARNm de citocinas para abordar la liberación de citocinas en respuesta a una composición de smEV. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria similar a la respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

[733] Puede repetirse este protocolo de estimulación de linfocitos T CD8+ utilizando combinaciones de smEV purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 44: Selección *in vitro* de smEV para una mayor destrucción de células tumorales por PBMC

[734] Varios métodos se pueden usar para seleccionar las smEV para la capacidad de estimular los PBMC, que a su vez activan las células CD8+ T para destruir las células tumorales. Por ejemplo, se aíslan las PBMC de sangre venosa heparinizada de donantes humanos sanos mediante centrifugación en gradiente de ficoll-paque para sangre de ratón o humana, o con medios de separación de células linfocíticas (Laboratorios Cedarlane, Ontario, Canadá) de sangre de ratón. Se incuban PBMC con smEV de una sola cepa, mezclas de smEV y controles apropiados. Además, se obtienen los linfocitos T CD8 + de PBMC humanas o bazo de ratón. Después de la incubación de 24 horas de PBMC con smEV, se eliminan las smEV de las células usando lavados de PBS. Se agregan 100 ul de medio fresco con antibióticos a cada pocillo. Se agrega una cantidad adecuada de linfocitos T (p. ej., 200,000 linfocitos T) a cada pocillo experimental en la placa de 96 pocillos. Se añade el anticuerpo anti-CD3

una concentración final de 2 ug/ml. Se deja que los cocultivos se incuben a 37 °C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

[735] Por ejemplo, 72 horas después de la incubación del cocultivo, se siembran en placas 50,000 células tumorales/pocillo por pocillo en placas nuevas de 96 pocillos. Las líneas celulares tumorales de ratón usadas incluyen B16.F10, SIY + B16.F10, y otras. Las líneas celulares tumorales humanas tienen un HLA compatible con el del donante, y pueden incluir líneas celulares PANC-1, UNKPC960/961, UNKC y HELA. Después de la compleción del cocultivo de 96 horas, se transfieren 100 µl de la mezcla de linfocitos T CD8 + y PBMC a pocillos que contienen células tumorales. Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C en condiciones de oxígeno normales. Se usa la estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte celular.

[736] Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para medir la muerte de células tumorales y caracterizar el fenotipo de células inmunes. En resumen, se tiñen las células tumorales con colorante de viabilidad. Se usa el análisis FACS para controlar específicamente las células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (muertas). También se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo. El fenotipo citotóxico de los linfocitos T CD8 + puede caracterizarse por los siguientes métodos: a) concentración de granzima B, IFN γ y TNF α en el sobrenadante de cultivo como se describe a continuación, b) expresión de superficie en linfocitos T CD8 + de marcadores de activación tales como DC69, CD25, CD154, PD-1, TCR gamma/delta, Foxp3, T-bet, granzima B, c) tinción de citocinas intracelulares de IFN γ , granzima B, TNF α en linfocitos T CD8+. También puede evaluarse el fenotipo de los linfocitos T CD4 + mediante

tinción intracelular de citocinas además de la concentración de citocinas en el sobrenadante, incluidas INF γ , TNF α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, quimiocinas, etc.

[737] Como una medida adicional de la activación de los linfocitos T CD8 +, se extraen 100 μ l de cultivo sobrenadante de los pocillos después de la incubación de 96 horas de los linfocitos T con DC y se analizan las citocinas secretadas, las quimiocinas y los factores de crecimiento utilizando el Luminex Magpix multiplexado. Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen se prehumeden los pocillos con tampón y se añaden 25 μ l de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo 1x y se preparan 2x 200 μ l de tampón de lavado en cada pocillo usando el imán. Se añaden 50 μ l de tampón de incubación, 50 μ l de diluyente y 50 μ l de muestras y se mezclan mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavan las perlas dos veces con 200 μ l de tampón de lavado. Se añaden 100 μ l de anticuerpo de detección biotinilado 1X y la suspensión se incuba durante 1 hora con agitación en la oscuridad. Luego se realizan dos lavados con 200 μ l con tampón de lavado. Se añaden 100 μ l de reactivo SAV-RPE 1x a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan tres lavados de 200 μ l y se añaden 125 μ l de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

[738] Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas, incluyendo 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-17, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP1 α , TNF α , y VEGF. Se evalúan estas citocinas en muestras de origen humano y de ratón. Los aumentos de estas citocinas en las muestras tratadas con bacterias indican una producción

mejorada de proteínas y citocinas del hospedador. Otras variaciones en este ensayo que examinan la capacidad de los tipos de células específicas para liberar citocinas se evalúan mediante la adquisición de estas células a través de métodos de clasificación y son reconocidos por un experto en la materia. Además, también se evalúa el ARNm de citocinas para abordar la liberación de citocinas en respuesta a una composición de smEV. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria similar a la respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

[739] Puede repetirse este protocolo de estimulación de PBMC usando combinaciones de smEV purificadas con o sin combinaciones de cepas bacterianas vivas, destruí das o inactivas das/debilitadas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 45: Detección in vitro de smEV en células presentadoras de antígeno

[740] Las células dendríticas en la lámina propia muestrean constantemente las bacterias vivas, las bacterias muertas y los productos microbianos en la luz del intestino extendiendo sus dendritas a través del epitelio intestinal, que es una manera mediante las smEV producidas por las bacterias en la luz intestinal estimulan directamente las células dendríticas. Los siguientes métodos representan una forma de evaluar la captación diferencial de las smEV por las células presentadoras de antígeno. Opcionalmente, estos métodos pueden aplicarse para evaluar el comportamiento inmunomodulador de las smEV administradas a un paciente.

[741] Las células dendríticas (DC) se aíslan de médula ósea, sangre o bazo de ratón o humano de acuerdo con los métodos estándar o protocolos del kit (p. ej., Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, 2001.

Isolation of dendritic cells. Current Protocols in Immunology. Capítulo 3: Unidad 3.7).

[742] Para evaluar la entrada y/o la presencia de smEV en las DC, se siembran 250,000 DC en un portaobjetos redondo en medio RPMI-1640 completo y después se incuban con smEV de cepas bacterianas individuales o combinaciones de smEV a diversas proporciones. Las smEV purificadas pueden marcarse con fluorocromos o proteínas fluorescentes. Después de la incubación durante varios puntos temporales (p. ej., 1 hora, 2 horas), se lavan las células dos veces con PBS helado y se separan de la placa con tripsina. Se permite que las células permanezcan intactas o se lisan. Luego se procesan las muestras para citometría de flujo. Se cuantifica el total de smEV internalizadas a partir de muestras lisadas, y el porcentaje de células que absorben smEV se mide contando las células fluorescentes. Los métodos descritos anteriormente también pueden realizarse sustancialmente de la misma manera usando macrófagos o líneas celulares epiteliales (obtenidas del ATCC) en lugar de DC.

Ejemplo 46: Cribado *in vitro* de smEV con una capacidad mejorada para activar la destrucción de células NK cuando se incuban con células diana

[743] Para demostrar la capacidad de las composiciones de smEV seleccionadas para provocar una citotoxicidad potente de células NK en células tumorales, se usa el siguiente ensayo *in vitro*. En resumen, se obtienen las células mononucleares de sangre heparinizada de donantes humanos sanos. Opcionalmente, se realiza una etapa de expansión para aumentar el número de células NK tal como se describió anteriormente (por ejemplo véase Somanschi *et al.*, J Vis Exp. 2011;(48):2540). Las células se pueden ajustar a una concentración de células/ml en medio RPMI-1640 que contiene el 5 % de suero humano. Se marcan las células PMNC

con anticuerpos apropiados y las células NK se aíslan a través de FACS como células CD3-/CD56 + y están listas para el posterior ensayo de citotoxicidad. Como alternativa, se aíslan las células NK usando el instrumento autoMACs y el kit de aislamiento de células NK siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyl Biotec).

[744] Se cuentan las células NK en un formato de 96 pocillos con 20,000 o más células por pocillo, se incuban con smEV de una sola cepa sin adición de células presentadoras de antígeno (p. ej., monocitos derivados del mismo donante), smEV de mezclas de bacterias cepas, y controles apropiados. Después de 5 a 24 horas de incubación de células NK con smEV, las smEV se retiran de las células con lavado con PBS, las células NK se resuspenden en 10 ml de medio recién hecho con antibióticos y se agregan a placas de 96 pocillos que contienen 20,000 células tumorales diana/pocillo. Las líneas celulares tumorales de ratón usadas incluyen B16.F10, SIY + B16.F10, y otras. Las líneas celulares tumorales humanas tienen un HLA compatible con el del donante, y pueden incluir líneas celulares PANC-1, UNKPC960/961, UNKC y HELA. Se incuban placas durante 2-24 horas a 37 °C en condiciones de oxígeno normales. Se usa la estaurosporina como control negativo para tener en cuenta la muerte celular.

[745] Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para medir la muerte de células tumorales usando métodos conocidos en la técnica. En resumen, se tiñen las células tumorales con colorante de viabilidad. Se usa el análisis FACS para controlar específicamente las células tumorales y medir el porcentaje de células tumorales muertas (muertas). También se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo.

[746] Puede repetirse este protocolo de estimulación de células NK usando combinaciones de smEV purificadas y cepas bacterianas vivas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 47: Uso de ensayos de activación inmune in vitro para predecir la eficacia de la inmunoterapia del cáncer in vivo de composiciones smEV

[747] Los ensayos de activación inmune *in vitro* identifican smEV que pueden estimular las células dendríticas, que a su vez activan la destrucción de linfocitos T CD8 +. Por lo tanto, los ensayos *in vitro* descritos arriba se usan como una selección predictiva de una gran cantidad de smEV candidatas para posible actividad inmunoterapéuticas. Las smEV que muestran una estimulación mejorada de las células dendríticas, estimulación mejorada de la destrucción de las células CD8+ T, estimulación mejorada de la destrucción de PBMC y/o estimulación mejorada de la destrucción de las células NK, se eligen preferentemente para los estudios *in vivo* de eficacia de inmunoterapia del cáncer.

Ejemplo 48: Determinación de la biodistribución de smEV cuando se administra por vía oral a ratones

[748] Los ratones de tipo silvestre (p. ej., C57BL/6 o BALB/c) se inoculan oralmente con la composición de smEV de interés para determinar el perfil de biodistribución *in vivo* de las smEV purificadas. Las smEV se marcan para ayudar en los análisis posteriores. Como alternativa, los ratones que tienen tumores o los ratones con algún trastorno inmunitario (p. ej., lupus sistémico eritematoso, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, ENA) se pueden estudiar para la distribución *in vivo* de smEV en un período determinado.

[749] Los ratones pueden recibir una dosis única de smEV (p. ej., 25-100 µg) o varias dosis durante un espacio de tiempo definido (25-100 µg). Como alternativa, las dosificaciones de smEV se pueden administrar según el recuento de partículas (p. ej., de 7e+08 a 6e+11 partículas). Los ratones se alojan en condiciones libres de microorganismos patógenos específicos siguiendo los protocolos aprobados. Como alternativa, los ratones pueden criarse y mantenerse en condiciones estériles, sin gérmenes. Pueden tomarse muestras de sangre, heces y otras muestras tisulares en los puntos de tiempo apropiados.

[750] Se sacrifican humanamente los ratones en varios puntos de tiempo (es decir, horas a días) después de la administración de las composiciones de smEV y se realiza una necropsia completa en condiciones estériles. Siguiendo los protocolos estándar, los ganglios linfáticos, las glándulas suprarrenales, el hígado, el colon, el intestino delgado, el ciego, el estómago, el bazo, los riñones, la vejiga, el páncreas, el corazón, la piel, los pulmones, el cerebro y otros tejidos de interés, se recogen y se usan directamente o se congelan para pruebas posteriores. Las muestras de tejido se diseccionan y homogeneizan para preparar suspensiones de células individuales siguiendo protocolos estándar conocidos por los expertos en la materia. Se cuantifica el número de smEV presentes en la muestra mediante citometría de flujo. La cuantificación también puede continuar con el uso de la microscopía de fluorescencia después del procesamiento apropiado de todo el tejido del ratón (Vankelecom H., Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2009). Como alternativa, los animales pueden analizarse usando imágenes *in vivo* de acuerdo con la técnica de marcaje de smEV.

[751] La biodistribución se puede realizar en modelos de cáncer en ratones, como CT-26 y B16, pero no se limita a ellos (véase, por ejemplo, Kim *et al.*, Nature Communications vol. 8, no. 626 (2017)) o autoinmunidad como, pero no limitado a EAE y DTH (véase, por ejemplo, Turjeman *et al.*, PLoS One 10(7): e0130442 (20105)).

Ejemplo 49: Condiciones de fabricación

[752] Se usan medios enriquecidos para cultivar y preparar las bacterias para su uso *in vitro* e *in vivo* y, en última instancia, para las preparaciones de pmEV y smEV. Por ejemplo, los medios pueden contener azúcar, extractos de levadura, peptonas de origen vegetal, tampones, sales, oligoelementos, tensioactivos, agentes antiespumantes y vitaminas. La composición de componentes complejos tales como los extractos de levadura y las peptonas puede estar indefinida o parcialmente definida (incluyendo concentraciones aproximadas de aminoácidos, azúcares, etc.). El metabolismo microbiano puede depender de la disponibilidad de recursos, tales como el carbono y el nitrógeno. Pueden analizarse diversos azúcares u otras fuentes de carbono. Como alternativa, pueden prepararse los medios y la bacteria seleccionada se cultiva como se ha mostrado por Saarela *et al.*, *J. Applied Microbiology*. 2005. 99: 1330-1339, que se incorpora al presente documento por referencia. Influencia del tiempo de fermentación, el crioprotector y la neutralización del concentrado celular en la supervivencia a la liofilización, la estabilidad durante la conservación y la exposición a ácidos y bilis de la bacteria seleccionada producida sin ingredientes a base de leche.

[753] A gran escala, se esterilizan los medios. La esterilización puede lograrse por procesamiento a ultra alta temperatura (UHT). Se realiza el procesamiento UHT a

temperaturas muy altas durante cortos periodos de tiempo. El intervalo de UHT puede ser de 135-180 °C. Por ejemplo, el medio puede esterilizarse durante de 10 a 30 segundos a 135 °C.

[754] Puede prepararse el inóculo en matraces o en biorreactores más pequeños y se controla el crecimiento. Por ejemplo, el tamaño del inóculo puede ser de entre aproximadamente el 0.5 y el 3 % del volumen total del biorreactor. Dependiendo de la aplicación y la necesidad de material, el volumen del biorreactor puede ser de al menos 2 l, 10 l, 80 l, 100 l, 250 l, 1000 l, 2500 l, 5000 l, 10,000 l.

[755] Antes de la inoculación, se prepara el biorreactor con medio al pH, temperatura y concentración de oxígeno deseados. El pH inicial del medio de cultivo puede ser diferente al punto de ajuste del proceso. El estrés por pH puede ser perjudicial a baja concentración celular; el pH inicial podría estar entre pH 7.5 y el punto de ajuste del proceso. Por ejemplo, el pH puede fijarse a entre 4.5 y 8.0. Durante la fermentación, el pH puede controlarse mediante el uso de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o hidróxido de amonio. La temperatura puede controlarse desde 25 °C hasta 45 °C, por ejemplo a 37 °C. Las condiciones anaerobias se crean al reducir el nivel de oxígeno en el caldo de cultivo de aproximadamente 8 mg/l a 0 mg/l. Por ejemplo, pueden usarse mezclas de nitrógeno o gas (N_2 , CO_2 , y H_2) para establecer condiciones anaerobias. Como alternativa, no se usan gases y se establecen las condiciones anaerobias mediante células que consumen el oxígeno restante del medio. Dependiendo de la cepa y el tamaño del inóculo, el tiempo de fermentación del biorreactor puede variar. Por ejemplo, el tiempo de fermentación puede variar de aproximadamente 5 horas a 48 horas.

[756] Los microbios recuperados de un estado congelado pueden requerir consideraciones especiales. El medio de producción puede estresar a las células después de una descongelación; puede requerirse un medio de descongelación específico para iniciar consistentemente una serie de cultivos de siembra a partir del material descongelado. La cinética de transferencia o pase del material de la siembra al medio recién preparado, con el propósito de aumentar el volumen de la siembra o mantener el estado de crecimiento microbiano, puede estar influenciada por el estado actual de los microbios (por ejemplo, crecimiento exponencial, crecimiento estacionario, sin estrés, estresado).

[757] La inoculación de los fermentadores de producción puede afectar a la cinética de crecimiento y a la actividad celular. El estado inicial del sistema de biorreactor debe optimizarse para facilitar una producción exitosa y consistente. La fracción del cultivo de siembra al medio total (p. ej., un porcentaje) tiene un impacto drástico en la cinética de crecimiento. El rango puede ser del 1-5 % del volumen de trabajo del fermentador. El pH inicial del medio de cultivo puede ser diferente al punto de ajuste del proceso. El estrés por pH puede ser perjudicial a baja concentración celular; el pH inicial podría estar entre pH 7.5 y el punto de ajuste del proceso. La agitación y el flujo de gas en el sistema durante la inoculación pueden ser diferentes a los puntos de ajuste del proceso. El estrés físico y químico debido a ambas condiciones puede ser perjudicial a baja concentración celular.

[758] Las condiciones del proceso y los ajustes de control pueden influir en la cinética del crecimiento microbiano y la actividad celular. Los cambios en las condiciones del proceso pueden cambiar la composición de la

membrana, la producción de metabolitos, la tasa de crecimiento, el estrés celular, etc. El rango óptimo de temperatura para el crecimiento puede variar con la cepa. El intervalo puede ser de 20-40 °C. El pH óptimo para la proliferación celular y el rendimiento de la actividad en la etapa posterior pueden variar con la tensión. El rango puede ser de pH 5-8. Los gases disueltos en el medio pueden utilizarse por las células para el metabolismo. Puede ser necesario ajustar las variables de O₂, CO₂, y N₂ a lo largo del proceso. La disponibilidad de nutrientes puede cambiar el crecimiento celular. Los microbios pueden tener una cinética alternativa cuando hay exceso de nutrientes disponibles.

[759] El estado de los microbios al final de una fermentación y durante la cosecha puede afectar a la supervivencia y la actividad celular. Los microbios pueden preacondicionarse poco antes de la cosecha para prepararlos mejor para las condiciones de estrés físico y químico implicadas en la separación y el procesamiento posterior. Un cambio de temperatura (que a menudo se reduce hasta 20-5 °C) puede reducir el metabolismo celular, ralentizar el crecimiento (y/o la muerte) y el cambio fisiológico cuando se retira del fermentador. La eficacia de la concentración por centrifugación puede estar influenciada por el pH del cultivo. La elevación del pH en 1-2 puntos puede mejorar la eficacia de la concentración, pero también puede ser perjudicial para las células. Los microbios pueden estresarse poco antes de la cosecha al aumentar la concentración de sales y/o azúcares en el medio. Las células estresadas de esta manera pueden sobrevivir mejor a la congelación y la liofilización durante la fase posterior.

[760] Los métodos de separación y la tecnología pueden afectar la eficiencia cómo los microbios se separan

del medio de cultivo. Los sólidos pueden eliminarse mediante técnicas de centrifugación. La eficacia de la concentración por centrifugación puede verse influenciada por el pH del cultivo o por el uso de agentes floculantes. Elevar el pH en 1-2 puntos puede mejorar la eficacia de la concentración, pero también puede ser perjudicial para las células. Los microbios pueden estresarse poco antes de la cosecha al aumentar la concentración de sales y/o azúcares en el medio. Las células estresadas de esta manera pueden sobrevivir mejor a la congelación y la liofilización durante la fase posterior. Adicionalmente, los microbios también pueden separarse mediante filtración. La filtración es superior a las técnicas de centrifugación para la purificación si las células requieren un exceso de g-minutos para centrifugarse con éxito. Pueden añadirse excipientes antes o después de la separación. Pueden añadirse excipientes para la crioprotección o para la protección durante la liofilización. Los excipientes pueden incluir, pero sin limitación, sacarosa, trehalosa, o lactosa, y estos pueden mezclarse como alternativa con tampón y antioxidantes. Antes de la liofilización, las gotas de sedimentos de células mezcladas con excipientes se sumergen en nitrógeno líquido.

[761] La colecta puede realizarse por centrifugación continua. Puede resuspenderse el producto con diversos excipientes a una concentración final deseada. Pueden añadirse excipientes para la crioprotección o para la protección durante la liofilización. Los excipientes pueden incluir, pero sin limitación, sacarosa, trehalosa, o lactosa, y estos pueden mezclarse como alternativa con tampón y antioxidantes. Antes de la liofilización, las gotas de sedimentos de células mezcladas con excipientes se sumergen en nitrógeno líquido.

[762] La liofilización del material, incluidas las bacterias vivas, las vesículas u otros derivados bacterianos incluye una fase de congelación, secado primario y secado secundario. La liofilización comienza con la congelación. El material de producto puede estar mezclado uno con un lioprotector o estabilizador antes de la etapa de congelación. Puede congelarse un producto antes de la carga del liofilizador o en las condiciones controladas del estante del liofilizador. Durante la fase siguiente, la fase primaria de secado, el hielo se elimina mediante sublimación. En este caso, se genera vacío y se aporta una cantidad adecuada de calor al material. El hielo se sublimará mientras se mantiene la temperatura del producto por debajo del punto de congelación y por debajo de la temperatura crítica del material (T_c). La temperatura del estante en el que se carga el material y el vacío de la cámara se pueden manipular para lograr la temperatura deseada del producto. Durante la fase de secado secundario, se eliminan las moléculas de agua unidas al producto. En este caso, generalmente se aumenta más la temperatura que en la fase de secado primario para alterar cualquier interacción fisicoquímica que se haya formado entre las moléculas de agua y el material de producto. Tras completarse el proceso de liofilización, la cámara puede cargarse con un gas inerte, tal como nitrógeno. El producto puede confinarse dentro del liofilizador en condiciones de sequedad, en un vial de vidrio u otro recipiente similar, impidiendo su exposición al agua y los contaminantes atmosféricos.

Ejemplo 50: smEV y pmEV de *Prevotella histicola* y *Veillonella parvula* orales: Estudios de DTH

[763] I. Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 5 semanas de edad de Taconic Biosciences y se aclimataron en un animalario durante una semana. Se sensibilizó a los

ratones con una emulsión de KLH y CFA (1:1) por inmunización subcutánea el día 0. Se calibraron por vía oral los ratones diariamente con pmEV o polvo de microbio completo de la cepa indicada o dosificado por vía intraperitoneal con dexametasona a 1 mg/kg de los días 1-8. Después de la dosificación el día 8, los ratones se anestesiaron con isoflurano, se midieron las orejas izquierdas para medir los valores de referencia con calibres Fowler y los ratones se estimularon por vía intradérmica con KLH en solución salina (10 µl) en la oreja izquierda y se realizaron mediciones del grosor de la oreja a las 24 horas.

[764] Se muestran los resultados de la medición del oído en 24 horas en la **Figura 21**. La eficacia de pmEV de *P. histicola* a tres dosis (alta: 6.0E+11, media: 6.0E+09 y baja: 6.0E+07) se sometió a prueba en comparación con pmEV de *P. histicola* liofilizadas a las mismas dosis y a 10 mg de polvo (con recuento de células total 3.13E+09). Los resultados muestran que la dosis alta de pmEV mostró una eficacia comparable a la dosis de 10 mg de polvo. La eficacia de pmEV de *P. histicola* no se ve afectada por la liofilización.

[765] II. Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 5 semanas de edad de Taconic Biosciences y se aclimataron en un animalario durante una semana. Se sensibilizó a los ratones con una emulsión de KLH y CFA (1:1) por inmunización subcutánea el día 0. Los ratones fueron alimentados por sonda nasogástrica diariamente con smEV, pmEV, pmEV irradiado con rayos gamma (GI), polvo irradiado con rayos gamma (GI) (del microbio completo) de la cepa indicada o dosificado por vía intraperitoneal con dexametasona a 1 mg/kg desde los días 1-8. Después de la dosificación el día 8, los ratones se anestesiaron con isoflurano, se midieron las orejas izquierdas para medir los valores de referencia con calibres Fowler y los ratones se estimularon por vía intradérmica con

KLH en solución salina (10 µl) en la oreja izquierda y se realizaron mediciones del grosor de la oreja a las 24 horas.

[766] Se muestran los resultados de la medición del oído en 24 horas en la **Figura 22**. Se sometió a prueba frente a frente la eficacia de smEV, pmEV y pmEV irradiado con rayos gamma (GI) de *V. parvula* en tres dosis (alta: 3.0E+11, media: 3.0E+09 y baja: 3.0E+07). No hubo una diferencia significativa entre la dosis más alta de cada grupo. Las pmEV de *V. parvula*, tanto con radiación gamma como sin radiación gamma, son tan eficaces como las smEV.

Ejemplo 51: preparación de smEV y pmEV

[767] Para los estudios descritos en el Ejemplo 50, se prepararon las smEV y pmEV de la siguiente manera.

[768] *smEV*: El procesamiento posterior de las smEV comenzó inmediatamente después de la colecta del biorreactor. Se usó la centrifugación a 20,000 g para retirar las células del caldo. Se clarificó el sobrenadante resultante usando un filtro de 0.22 µm. Se concentraron las smEV y se lavaron usando filtración de flujo tangencial (TFF) con ultrafiltración (UF) con casetes de lámina plana con membranas de corte de peso molecular de 100 kDa (MWCO). Se usó la diafiltración (DF) para eliminar moléculas pequeñas y proteínas pequeñas usando 5 volúmenes de solución tampón de fosfato (PBS). Se centrifugó el retenido de TFF en una ultracentrífuga a 200,000 g durante 1 hora para formar un sedimento rico en smEV denominado sedimento de alta velocidad (HSP). Se resuspendió el sedimento con PBS mínimo y se preparó un gradiente con medio de gradiente de densidad optiprep™ y se ultracentrifugó a 200,000 g durante 16 horas. De las fracciones resultantes, 2 bandas medias contenían smEV. Se lavaron las fracciones con 15 veces PBS y se centrifugaron las smEV a 200,000 g durante 1 hora para crear el HSP fraccionado o fHSP. Posteriormente se resuspendió con

PBS mínimo, se reunió y se analizó para detectar partículas por ml y contenido de proteína. Se preparó la dosificación a partir del recuento de partículas/ml para lograr la concentración deseada. Se caracterizaron las smEV usando un NanoSight NS300 de Malvern Panalytical en modo dispersión usando el láser de 532 nm.

[769] *Prevotella histicola* pmEV:

[770] Se retiraron sedimentos de células del congelador y se colocaron en hielo. Se anotaron los pesos de los sedimentos.

[771] Se añadió Tris-HCl 100 mM frío pH 7.5 a los gránulos congelados y los sedimentos se descongelaron girando a 4 °C.

[772] Se añadieron 10 mg/ml de disolución madre de Dnasa a los sedimentos descongelados a una concentración final de 1 mg/ml.

[773] Se incuban los sedimentos en el inversor durante 40 min a TA (temperatura ambiente).

[774] Se filtró la muestra en un filtro de células de 70 µm antes de discurrir por el Emulsiflex.

[775] Se lisaron las muestras usando el Emulsiflex con 8 ciclos discretos a 22,000 psi.

[776] Para eliminar los restos celulares de la muestra lisada, se centrifugó la muestra a 12,500 x g, 15 min, 4 °C.

[777] Se centrifugó la muestra dos veces adicionales a 12,500 x g, 15 min, 4 °C, moviendo cada vez el sobrenadante a un tubo recién hecho.

[778] Para sedimentar las proteínas de la membrana, se centrifugó la muestra a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

[779] Se resuspendió el sedimento en 10 ml de carbonato de sodio 0.1 M helado pH 11. Se incubó la muestra en el inversor a 4 °C durante 1 hora.

[780] Se centrifugó la muestra a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

[781] Se añadieron 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7.5 al sedimento y se incubó O/N (durante la noche) a 4 °C.

[782] Se resuspendió el sedimento y se centrifugó la muestra a 120,000xg durante 1 hora a 4 °C.

[783] Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un volumen mínimo de PBS.

[784] *Veillonella parvula* pmEV:

[785] Las pmEV de *V. parvula* usadas en los estudios en el Ejemplo 50 provenían de tres aislamientos diferentes (aislamientos 1, 2 y 3). Hubo pequeñas variaciones en el protocolo.

[786] Se retiraron sedimentos de células del congelador y se colocaron en hielo. Se anotaron los pesos de los sedimentos.

[787] Se añadió tampón de MP (Tris-HCl 100 mM frío pH 7.5) a los gránulos congelados y los gránulos se descongelaron girando a TA.

[788] Se añadieron 10 mg/ml de disolución madres de DNasa a los sedimentos descongelados de los aislamientos 1 y 2 a una concentración final de 1 mg/ml e se incubaron. Los sedimentos se incubaron 40 minutos más en el inversor.

[789] Se lisaron las muestras usando el Emulsiflex con 8 ciclos individuales a 20,000-30,000 psi.

[790] Para los aislamientos 1 y 2, se filtraron las muestras en un filtro de células de 70 µm antes de discurrir por el Emulsiflex para eliminar los grumos.

[791] Para el aislamiento 3, se añadieron PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma) y benzamidina 1 mM (Sigma) inmediatamente antes del paso a través de Emulsiflex y la muestra se recicló primero a través del Emulsiflex

continuamente durante 1.5 minutos a 15,000 psi para romper grandes grumos.

[792] Para eliminar los restos celulares del lisado celular, se centrifugaron las muestras a 12,500 x g, 15 min, 4 °C.

[793] Se centrifugó el sobrenadante del aislamiento 3 un tiempo adicional mientras que los sobrenadantes de aislamientos 1 y 2 se ciclaron dos veces adicionales a 12,500 x g, 15 min, 4 °C. Después de cada centrifugación, el sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo.

[794] Se centrifugó el sobrenadante a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

[795] Se resuspendió el sedimento de la membrana en 10 ml de carbonato de sodio 0.1 M helado pH 11. Para los aislamientos 1 y 2, se incubaron las muestras en carbonato de sodio durante 1 hora antes del giro a alta velocidad.

[796] Se centrifugaron las muestras a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

[797] Se añadieron 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7.5 al sedimento y se resuspendió el sedimento.

[798] Se centrifugó la muestra a 120,000xg durante 1 hora a 4 °C.

[799] Se descartó el sobrenadante y los sedimentos estaban en un volumen mínimo de PBS (aislamientos 1 y 2) o PBS que contenía sacarosa 250 mM (aislamiento 3).

[800] Se basó la dosificación de pmEV en recuentos de partículas, según lo evaluado por el Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) utilizando un NanoSight NS300 (Malvern Panalytical) según las instrucciones del fabricante. Los recuentos para cada muestra se basaron en al menos tres videos de 30 segundos de duración cada uno, contando 40-140 partículas por estructura.

[801] *Irradiación con rayos gamma:* Para la irradiación gamma, se prepararon las pmEV de *V. parvula* en forma congelada y se irradiaron con rayos gamma sobre nieve carbónica a una dosis de radiación de 25 kGy; el polvo liofilizado de microbios completos de *V. parvula* se irradió con rayos gamma a temperatura ambiente a una dosis de radiación de 17.5 kGy.

[802] *Liofilización:* Las muestras se colocaron en un equipo de liofilización y se congelaron a -45 °C. El ciclo de liofilización incluyó un paso de mantenimiento a -45 °C durante 10 minutos. El vacío comenzó y se ajustó a 100 mTorr y la muestra se mantuvo a -45 °C durante otros 10 min. El secado primario comenzó con una rampa de temperatura a -25 °C durante 300 minutos y se mantuvo a esta temperatura durante 4630 min. El secado secundario comenzó con una rampa de temperatura a 20 °C durante 200 minutos, mientras que el vacío se redujo a 20 mTorr. Se mantuvo a esta temperatura y presión durante 1200 min. La etapa final aumentó la temperatura de 20 a 25 °C, donde permaneció a un vacío de 20 mTorr durante 10 min.

Ejemplo 52: aislamiento y enumeración de smEV

[803] El equipamiento usado en aislamiento de las smEV incluye una centrífuga de Sorvall RC-5C con un rotor SLA-3000; una ultracentrífuga Optima XE-90 mediante un rotor Beckman-Coulter 45Ti; una centrífuga Sorvall wX+ Ultra Series de Thermo Scientific; y un rotor Fiberlite F37L-8x100.

Recopilación y filtración del sobrenadante microbiano

[804] Los microbios se deben sedimentar y filtrar del sobrenadante con el fin de recuperar las smEV y no microbios.

[805] El cultivo microbiano del sedimento se genera al usar una centrífuga Sorvall RC-5C con el rotor SLA-3000 y cultivo de la centrífuga durante un mínimo de 15 minutos en un mínimo de 7,000 rpm. Y luego se decanta el sobrenadante en un contenedor nuevo y estéril.

[806] Se filtra el sobrenadante a través de un filtro de 0.2 μm . Para los sobrenadantes con escasa filtrabilidad (menos de 300 ml del sobrenadante pasa a través del filtro), se adjunta un filtro de cápsula de 0.45 μm antes del filtro al vacío de 0.2 μm . El sobrenadante filtrado se almacena a 4 °C. El sobrenadante filtrado luego se puede concentrar usando TFF.

Aislamiento de smEV usando ultracentrifugación

[807] El sobrenadante concentrado se centrifuga en la ultracentrífuga para centrifugar las smEV y aislar las smEV a partir de biomoléculas más pequeñas. La velocidad es para 200,000 g, tiempo para 1 hora y temperatura a 4 °C. Cuando se detuvo el rotor, los tubos se eliminan de la ultracentrífuga y el sobrenadante se vierte suavemente. Se agregan más sobrenadante y los tubos se centrifugan nuevamente. Después de que se haya centrifugado todo el sobrenadante, los sedimentos generados se denominan sedimentos de smEV en bruto. Se agrega 1xPBS estéril a los gránulos, que se colocan en un contenedor. El contenedor se coloca en un agitador configurado en una velocidad de 70, en un refrigerador a 4 °C durante la noche o más. Los gránulos de smEV se vuelven a suspender con un 1xPBS estéril adicional. Las muestras de EV crudas resuspendidas se almacenan a 4 °C o a -80 °C.

Purificación de las smEV usando gradientes de densidad

[808] Los gradientes de densidad se usan para la purificación de las smEV. Durante la ultracentrifugación, las partículas en la muestra se moverán y separarán, dentro

de un medio de densidad calificada según sus densidades "de flotación". De esta forma, se separan las smEV de otras partículas, tales como azúcares, lípidos u otras proteínas, en la muestra.

[809] Para la purificación de las smEV, se usan cuatro porcentajes diferentes del medio de densidad (60 % Optiprep), una capa de 45 %, una capa de 35 %, una capa de 25 % y una capa de 15 %. Esto creará capas graduadas. Se añade una capa de 0 % sobre la superior que consiste en 1xPBS. La capa del gradiente de 45 % debe contener la muestra de smEV en bruto. Se agregan 5 ml de muestra a 15 ml de Optiprep. Si la muestra de smEV en bruto es de menos de 5 ml, enrasar usando 1xPBS estéril.

[810] Usando una pipeta serológica, la mezcla de gradiente de 45 % se mueve en la pipeta hacia arriba y hacia abajo para mezclar. La muestra luego se coloca a través de una pipeta en un tubo de ultracentrífuga limpio y estéril etiquetado. A continuación, se usa una pipeta serológica de 10 ml para agregar lentamente 13 ml de la mezcla del gradiente de 35 %. A continuación, se agregan 13 ml de la mezcla del gradiente de 25 %, seguido de 13 ml de la mezcla del 15 % y finalmente 6 ml de 1xPBS estéril. Los tubos de ultracentrífuga se equilibran con 1xPBS estéril. Los gradientes se colocan cuidadosamente en un rotor y la ultracentrífuga se configura para 200,000 g y 4 °C. Los gradientes se centrifugan durante un mínimo de 16 horas.

[811] Se usa una pipeta limpia para eliminar las fracciones de interés, que se agregan a un tubo cónico de 15 ml. Estas muestras de smEV "purificadas" se conservan a 4 °C.

[812] Para limpiar y eliminar el optiprep residual de las smEV, se agrega un volumen de 10x de PBS a las smEV purificadas. La ultracentrífuga se configura para 200,000 g

y 4 °C. Se centrifuga y gira durante 1 hora. Los tubos se quitan cuidadosamente de la ultracentrífuga y se decanta el sobrenadante. Las EV purificadas se lavan hasta que se haya centrifugado toda la muestra. Se agrega 1xPBS los sedimentos purificados, que se colocan en un contenedor. El contenedor se coloca en un agitador configurado a una velocidad de 70 en un refrigerador a 4 °C durante la noche o durante más tiempo. Los gránulos de smEV "purificados" se vuelven a suspender con un 1xPBS estéril adicional. Las muestras de smEV purificadas resuspendidas se almacenan a 4 °C o a -80 °C.

Ejemplo 53: Estudio KLH DTH

[813] Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 5 semanas de edad de Taconic Biosciences y se aclimataron en un animalario durante una semana. Se sensibilizó a los ratones con una emulsión de KLH y CFA (1:1) por inmunización subcutánea el día 0. Se calibraron por vía oral los ratones diariamente con smEV o dosificado por vía intraperitoneal con dexametasona a 1 mg/kg de los días 1-8. Después de la dosificación el día 8, los ratones se anestesiaron con isoflurano, se midieron las orejas izquierdas para medir los valores de referencia con calibres Fowler y los ratones se estimularon por vía intradérmica con KLH en solución salina (10 µl) en la oreja izquierda y se realizaron mediciones del grosor de la oreja a las 24 horas. Se determinó la dosis mediante el recuento de partículas por NTA.

[814] Se muestran los resultados de la medición del oído en 24 horas en la **Figura 23**. smEV creadas de *Megasphaera* Sp. Cepa A se compararon en dos dosis, 2E+11 y 2E+07 (según las partículas por dosis). Las smEV fueron eficaces, y mostraron una disminución en la inflamación del oído 24 horas después del desafío.

[815] Se muestran los resultados de la medición del oído en 24 horas en la **Figura 24**. smEV creadas de *Megasphaera Sp.* Cepa B se compararon en dos dosis, $2E+11$ y $2E+07$ (según las partículas por dosis). Las smEV fueron eficaces, y mostraron una disminución en la inflamación del oído 24 horas después del desafío.

[816] Se muestran los resultados de la medición del oído en 24 horas en la **Figura 25**. Las smEV creadas a partir de *Selenomonas felix* se compararon en dos dosis, $2E+11$ y $2E+07$ (según las partículas por dosis). Las smEV fueron eficaces, y mostraron una disminución en la inflamación del oído 24 horas después del desafío.

Ejemplo 54: protocolo de evaluación de U937 de la bacteria completa de smEV e irradiada por gamma

[817] Preparación de la estirpe celular: La línea celular del monocito U937 (ATCC) se propagó en el medio RPMI con FBS HEPES añadido, piruvato de sodio y antibiótico a 37°C con CO_2 al 5 %. Se enumeraron las células usando un celómetro con tinción de vivo/muerto para determinar la viabilidad. A continuación, se diluyeron las células en una concentración de 5×10^5 células por ml en el medio RPMI con 20 nM forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) para diferenciar los monocitos en células similares al macrófago. A continuación, se agregaron 200 microlitros de suspensión de célula a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C con el 5 % de CO_2 durante 72 horas. Se lavaron e incubaron las células diferenciadas adherentes en un medio fresco sin PMA durante 24 horas antes de la experimentación.

[818] Configuración experimental: se diluyeron las smEV en la concentración adecuada en el medio RPMI sin antibióticos (en general 1×10^5 – 1×10^{10}). También se prepararon las muestras de control del agonista TLR 2 y 4 y libre de

tratamiento. La placa de 96 pocillos que contenían las células U937 diferenciadas se lavó con un medio fresco sin antibióticos, para eliminar los antibióticos residuales. A continuación, se agregó la suspensión de las smEV a una placa lavada. Se incubó la placa durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

[819] Criterios de valoración experimentales: Después de 24 horas de coincubación, los sobrenadantes se eliminaron de las células U937 en una placa de 96 pocillos por separado. Las células se observaron con respecto a cualquier lisis evidente (placas) en los pocillos. No se les quitaron los sobrenadantes a dos pocillos libres de tratamiento y se agregó el tampón de lisis a los pocillos y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para lisar las células (control de lisis máximo). Se agregaron 50 microlitros de cada sobrenadante o control de lisis máximo a una nueva placa de 96 pocillos y se determinó la lisis celular (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midieron las citocinas a partir de los sobrenadantes usando placas U-plex MSD (Meso Scale Discovery) según las instrucciones del fabricante.

[820] Los resultados se muestran en la **Figura 26**. smEV de *Megasphaera Sp.* Cepa A que inducen la producción de citocinas a partir de células U937 diferenciadas por PMA. Se trataron las células U937 con las smEV en concentraciones de 1x10⁶-1x10⁹ así como controles de agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) durante 24 horas y se midió la producción de citocinas. "Blanco" indica el control de medio.

Ejemplo 55: Suministro oral de smEV de *Megasphaera sp.* en estudios tumorales CT26, primer estudio representativo de oncología

[821] Se adquirieron ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad de Taconic Biosciences y se dejó que se aclimaten en un animalario durante 3 semanas. El día 0, se anestesió a los ratones con isoflurano y se les inoculó por vía subcutánea en el costado izquierdo con 1.0×10^5 células CT-26 (0.1 ml) preparadas en PBS y Corning (GFR) Phenol Red-Free Matrigel (1:1). Se permitió que los ratones descansaran durante 9 días después de la inoculación de CT-26 para permitir la formación de tumores palpables. El día 9, se midieron los tumores usando un calibrador digital de deslizamiento para recopilar la longitud y el ancho en las mediciones (en milímetros) para calcular el volumen del tumor estimado ($((L \times W \times W)/2) = TV_{mm^3}$). Se aleatorizó a los ratones en grupos de tratamiento diferentes con un total de 9 o 10 ratones por grupo. Se realizó la aleatorización para equilibrar todos los grupos de tratamiento, y se permitió que cada grupo comenzará el tratamiento con volumen del tumor promedio similar y desviación estándar. La dosificación comenzó el día 10 y finalizó el día 22 durante 13 días consecutivos de dosificación. Se dosificaron por vía oral a los ratones BID con smEV de *Megasphaera sp.* Cepa A o Q4D por vía intraperitoneal con 200 ug de anticuerpo contra PD-1 de ratones. Se tomaron mediciones del tumor y el peso corporal en un cronograma MWF (lunes, miércoles, viernes). Se determinó la dosis de las smEV mediante un recuento de partículas por NTA. Dos ratones del grupo de la smEV de *Megasphaera sp.* fueron censurados del estudio debido a la mortalidad causada por lesión de la dosificación.

[822] Los resultados se muestran en las **Figuras 27A y 27B**. El día 22, el resumen del volumen tumoral compara las smEV de *Megasphaera sp.* (2e11) contra un control negativo (vehículo PBS) y control positivo (anti-PD-1). Las smEV de *Megasphaera sp.* (2e11) en comparación con el vehículo PBS

mostraron una eficacia significativa desde el punto de vista estadístico y no es significativamente diferente de anti-PD-1. Las curvas del volumen tumoral muestran tendencias de crecimiento similares de smEV de *Megasphaera sp.* y anti-PD-1, junto con una sostenida después de 13 días del tratamiento.

Ejemplo 56: Suministro oral de smEV de *Megasphaera sp.* en estudios tumorales CT26, segundo estudio representativo de oncología

[823] Se adquirieron ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad de Taconic Biosciences y se dejó que se aclimaten en un animalario durante 1 semana. El día 0, se anestesió a los ratones con isoflurano y se les inoculó por vía subcutánea en el costado izquierdo con 1.0e5 células CT-26 (0.1 ml) preparadas en PBS y Corning (GFR) Phenol Red-Free Matrigel (1:1). Se permitió que los ratones descansaran durante 9 días después de la inoculación de CT-26 para permitir la formación de tumores palpables. El día 9, se midieron los tumores usando un calibrador digital de deslizamiento para recopilar la longitud y el ancho en las mediciones (en milímetros) para calcular el volumen del tumor estimado ($(L \times W \times W)/2 = TV_{mm^3}$). Se aleatorizó a los ratones en grupos de tratamiento diferentes con un total de 9 ratones por grupo. Se realizó la aleatorización para equilibrar todos los grupos de tratamiento, y se permitió que cada grupo comenzará el tratamiento con volumen del tumor promedio similar y desviación estándar. La dosificación comenzó el día 10 y finalizó el día 23 durante 14 días consecutivos de dosificación. Se dosificaron por vía oral a los ratones BID y QD con smEV de *Megasphaera sp.* Cepa A o Q4D por vía intraperitoneal con 200 ug de anticuerpo contra PD-1 de ratones. Se recopilaron las mediciones del tumor y el peso

corporal en un cronograma MWF. Se determinó la dosis de las smEV mediante un recuento de partículas por NTA.

[824] Los resultados se muestran en las **Figuras 28A y 28B**. El día 23, el resumen del volumen del tumor compara las smEV de *Megasphaera sp.* en 3 dosis (2e11, 2e9 y 2e7) BID, así como smEV de *Megasphaera sp.* (2e11) QD contra un control negativo (vehículo PBS) y control positivo (anti-PD-1). Todos los grupos de tratamiento de las smEV de *Megasphaera sp.* en comparación con el vehículo PBS muestra una eficacia significativa desde el punto de vista estadístico en comparación con el vehículo (PBS). Todas las dosis de smEV de *Megasphaera sp.* evaluadas no son diferentes de forma significativa de anti-PD-1. La curva del crecimiento tumoral muestra una eficacia sostenida de los grupos de tratamiento de las smEV de *Megasphaera sp.* durante 14 días de tratamiento similar al anti-PD-1.

Ejemplo 57: Aislamiento de las pmEV de las cepas de *Enterococcus gallinarum*

[825] Las pmEV de las dos cepas de *Enterococcus gallinarum* se prepararon de la siguiente manera: Se agregó el tampón MP frío (50 mM de Tris-HCl pH 7.5 con 100 mM de NaCl) a los sedimentos celulares congelados y los sedimentos se descongelaron rotando a TA (temperatura ambiente) o 4 °C. Se lisaron las células en el Emulsiflex. Se lisaron las muestras en el Emulsiflex con 4 pases discretos a 24,000 psi. Inmediatamente antes de la lisis de los inhibidores de la proteinasa, se agregaron fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y benzamidina a la muestra en una concentración final de 1 mM cada una. Se sedimentaron las células residuales y sin lisar: 6,000 x g, 30 min, 40 °C.

[826] Se purificaron las pmEV mediante FPLC a partir de la configuración de sobrenadante de baja velocidad (LSS): Se usó una columna grande (GE XK 26/70) empaquetada

con Captocore 700 para la purificación de pmEV: 70 % de EtOH para la esterilización; 0.1X PBS para el tampón que se ejecuta; agua Milli-Q para el lavado; 20 % de EtOH con 0.1 M de NaOH para la limpieza y el almacenamiento. Se agregó benzonasa a la muestra de LSS y se incubó a RT durante 30 minutos mientras se rotaba (concentración final de 100 U/ml de benzonasa y 1 mM mg Cl). LSS de la lisis bacteriana se conservó en hielo y a 4 °C hasta que estuviera listo para cargarse en el Superloop.

[827] Se ejecutó la purificación de FPLC: La tasa de flujo se configuró a 5 ml/min y la presión de la columna delta configurada a 0.25 psi. Durante todo el proceso de purificación, se monitorearon la absorbancia de UV, precisión y tasa de flujo. Se comenzó la ejecución y se cargó de forma manual la muestra (Superloop). Cuando la muestra se volvió visible en el cromatograma (~50mAU), se implicó el recopilador de fracciones. Se recopiló todo el pico de la muestra.

[828] Se concentró la muestra final de pmEV: Se agregaron las fracciones finales de las pmEV para limpiar los tubos y el balance de la ultracentrífuga. Se giraron los tubos a 120,000 x g durante 1 hora a 40 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en un volumen mínimo de PBS.

Ejemplo 58: Datos *in vivo* generados con las pmEV

[829] Se dejó que ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad se aclimatasen en un animalario durante 1 semana. El día 0, se anestesió a los ratones con isoflurano y se inocularon por vía subcutánea en el costado izquierdo con 1×10^5 CT-26 células (0.1 ml) preparadas en PBS y Corning (GFR) Phenol Red-Free Matrigel (1:1). Se permitió que los ratones descansaran durante 9 días después de la inoculación de CT-26 para permitir la formación de tumores palpables. El

día 9, se midieron los tumores usando un calibrador digital de deslizamiento para recopilar la longitud y el ancho en las mediciones (en milímetros) para calcular el volumen del tumor estimado $((L \times W \times W)/2) = TV_{mm^3}$). Se aleatorizó a los ratones en grupos de tratamiento diferentes con un total de (9) ratones por grupo. Se realizó la aleatorización para equilibrar todos los grupos de tratamiento, y se permitió que cada grupo comenzará el tratamiento con volumen del tumor promedio similar y desviación estándar. La dosificación comenzó el día 10 y finalizó el día 23 durante 14 días consecutivos de dosificación. Se dosificaron por vía oral a los ratones las pmEV de *Enterococcus gallinarum* o Q4D por vía intraperitoneal con 200 µg anti-PD-1 de ratón. Se recopilaron las mediciones del tumor y el peso corporal en un cronograma MWF.

[830] Se prepararon las pmEV de dos cepas de *Enterococcus gallinarum*. Una cepa se obtuvo de un ratón JAX, la otra cepa se obtuvo de una fuente humana. El recuento de partículas de la dosis para las pmEV fue de 2×10^{11} . Se determinó la dosis como recuento de partículas por NTA.

[831] La Figura 29 muestra los volúmenes del tumor después de que los tumores d10 se dosifican una vez al día durante 14 días con las pmEV de *E. gallinarum* Cepa A.

Ejemplo 59: Resultados de Negativicutes U937

[832] Para demostrar la utilidad terapéutica de Negativicutes como una clase, se seleccionaron los representantes de cada familia en la Tabla 5 y las EV se recopilaron a partir de sobrenadantes del cultivo. Se agregaron las EV las células U937 diferenciadas por PMA y se incubaron durante 24 horas. La liberación de citocinas se midió mediante MSD ELISA.

[833] Los resultados se muestran en las Figuras 30-34. La estimulación sólida amplia exhibida por cada EV de la

cepa sigue un perfil similar entre las cepas. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

Tabla 5

Nombre de la cepa	Familia dentro de la clase de Negativicutes
<i>Megasphaera sp.</i> Cepa A	Veillonellaceae
<i>Megasphaera sp.</i> Cepa B	Veillonellaceae
<i>Selenomonas felix</i>	Selenomonadaceae
<i>Acidaminococcus intestini</i>	Acidaminococcaceae
<i>Propionospora sp.</i>	Sporomusaceae

Incorporación por referencia

[834] Todas las publicaciones de solicitudes de patente mencionadas en el presente documento se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad como si se indicase específica e individualmente que ha de incorporarse cada publicación o solicitud de patente individual por referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluyendo cualquier definición del presente documento.

Equivalentes

[835] Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de evaluar usando solo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

[836] 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.