

Vesículas extracelulares microbianas secretadas

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud
provisoria de patente de los EE. UU. N.º 62/860,029,
5 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.
10 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

Como se divulga en el presente documento, determinados
15 tipos de vesículas extracelulares microbianas (mEV), tales
como vesículas extracelulares microbianas secretadas (smEV)
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.

20 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica
proporcionada en el presente documento puede contener mEV
(tales como smEV) de una o más fuentes de microbio, p. ej.,
una o más cepas bacterianas. En algunas realizaciones, una
composición farmacéutica proporcionada en el presente
25 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
30 inmunitaria en un ensayo o en un sujeto). Una composición
farmacéutica que comprende mEV puede contener smEV. La

composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV
5 (tales como smEV) 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).

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV
10 (tales como smEV) 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
15 forma farmacéutica sólida puede comprender un recubrimiento (p. ej., recubrimiento entérico).

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento puede comprender mEV liofilizadas (tales como smEV). Las mEV liofilizadas (tales
20 como smEV) 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.

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

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento que comprende mEV (tales como smEV) se puede administrar por vía oral.

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

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

En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden mEV (tales como smEV) útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o un trastorno de salud (p. ej.,
15 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
20 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
25 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
30 aproximadamente un 95 % (o más de aproximadamente un 99 %)

del contenido obtenido de microbios de la composición farmacéutica comprende mEV).

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.

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).

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).

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende mEV secretadas (smEV).

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

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

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

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

En algunas realizaciones, las mEV se irradian con UV.

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

En algunas realizaciones, las mEV se tratan con ácido.

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

10 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias grampositivas.

En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias gramnegativas.

15 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias aerobias.

En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias anaerobias.

En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias acidófilas.

20 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias alcalófilas.

En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias neutrófilas.

25 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias de cultivo exigente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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).

5 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 10 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 15 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).

 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium*. En algunas realizaciones, las bacterias 20 *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 25 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 30 *Bifidobacterium* son de bacterias *Bifidobacterium* depositadas con el número de registro de ATCC PTA-125097.

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.

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.

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.

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.

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
5 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
10 algunas realizaciones, las bacterias *Harryflintia acetispora* son de las bacterias *Harryflintia acetispora* depositadas como un número de asignación de ATCC PTA-126696.

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

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

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

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

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

5 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Blautia wexlerae*.

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

10 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Enterococcus faecium*.

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

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

15 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bifidobacterium longum*.

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

20 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Bacteroides thetaiotaomicron*.

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

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

25 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Megasphaera massiliensis*.

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

30 En algunas realizaciones, las mEV son de bacterias *Parabacteroides distasonis*.

En determinados aspectos, las mEV (tales como smEV) 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).

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 smEV) 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)

5 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

10 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

15 algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos para crear dichas mEV (tales como smEV).

En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden mEV (tales como smEV) útiles para el tratamiento

20 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

25 (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.

Las composiciones farmacéuticas que contienen las mEV

30 (tales como smEV) 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.

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.

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.

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.

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.

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
5 adyuvante). En algunas realizaciones, el método comprende,
además, la administración de otra bacteria y/o mEV
terapéutica (tal como smEV) de una o más cepas bacterianas
(p. ej., bacteria terapéutica). En algunas realizaciones, el
método comprende además la administración de un
10 inmunosupresor y/o un agente antiinflamatorio. En algunas
realizaciones, el método comprende además la administración
de un agente terapéutico para una enfermedad metabólica.

En determinados aspectos, se proporciona en el presente
documento una composición farmacéutica que comprende mEV
15 (tales como smEV) 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
20 adicionales.

En determinadas realizaciones, se proporciona en el
presente documento una composición farmacéutica que
comprende mEV (tales como smEV) para usar en el tratamiento
y/o prevención de un cáncer en un sujeto (p. ej., ser
25 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 smEV)
30 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.

5 En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) 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
10 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 smEV) para usar en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad metabólica
15 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
20 composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) 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
25 tratamiento del trastorno neurológico.

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
30 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.

En determinados aspectos, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica que comprende mEV (tales como smEV) 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).

En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento el uso de una composición farmacéutica

que comprende mEV (tales como smEV) 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 smEV) 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 smEV) 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 smEV) 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.

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.

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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
25 colorrectal en ratones el día 11.

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
30 colorrectal en ratones el día 11.

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.

5 **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.

10 **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.

15 **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.

20 **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.

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.

25 **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.

30 **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.

5 **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.

10 **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.

15 **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.

20 **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.

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 ($6.0E+11$).

25 **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.

30 **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.

5 **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 2.0e+11PC, 7.0e+10PC y 1.5e+10PC.

10 **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.

15 **La Figura 20** muestra la eficacia de smEV administradas por vía oral y smEV liofilizadas de *Prevotella histicola* en concentraciones elevadas (6.0 e+11 recuento de partículas), medias (6.0 e+9 recuento de partículas) y bajas (6.0 e+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.

20 **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.

25

30

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.

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.

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.

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*.

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.

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 (2e11) contra un control negativo (vehículo PBS) y control positivo (anti-PD-1).

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 (2e11, 2e9 y 2e7) BID, así como
5 las smEV *Megasphaera* sp. (2e11) QD contra un control negativo (vehículo PBS) y control positivo (anti-PD-1).

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* Cepas A y B.

10 **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
15 control de medios.

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
20 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

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
25 midió mediante MSD ELISA. Se usaron los agonistas de TLR2 (FSL) y TLR4 (LPS) como controles. El blanco indica el control de medios.

La Figura 33 muestra las EV de *Acidaminococcus intestini* que inducen la producción de citocinas a partir de las
30 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.

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

10 Definiciones

"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.

"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.

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.

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, NANOBODIES®, 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.

"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.

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, confórmers, formas cíclicas, formas acíclicas, estereoisómeros, tautómeros, anómeros e isómeros.

"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.

"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.

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.

"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.

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)).

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.

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.

El término "epítopo" significa un determinante de proteína capaz de unirse de manera específica a un anticuerpo o receptor de linfocitos T. Los epítopos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar. Determinados epítopos pueden definirse por una secuencia particular de aminoácidos a la que un anticuerpo puede unirse.

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.

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.)).

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 reperfusion, 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).

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.

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).

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).

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.

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

5 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

10 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 %,

15 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

20 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

25 y los componentes microbianos, tales como mEV de las mismas generalmente se purifican de los productos del hábitat residuales.

Tal como se usa en el presente documento un "lípidido" incluye grasas, aceites, triglicéridos, colesterol,

30 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).

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).

"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.

"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 graevenitzi*, *Actinomyces odontolyticus*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgus*, *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, Faecalibacteria prausnitzii, Gemella, Lactococcus, Lachnospira, Mollicutes cluster XVI, Mollicutes cluster XVIII, Prevotella, Rothia mucilaginosa, Ruminococcus callidus, Ruminococcus gnavus, Ruminococcus torques, y Streptococcus.

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 microbianos 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.

"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.

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.

"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.

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.

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.

"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
5 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
10 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,
15 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.

20 Tal como se usa en el presente documento, un gen se
"sobreexpresa" 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
25 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.

30 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.

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
5 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
10 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.

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)
25 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
30 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.

"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.

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
5 afinidad de unión a un antígeno/un apareja 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
10 y se involucra con el segundo componente que es una proteína, lípido, carbohidrato o combinación de los mismos de una manera específica.

"Cepa" se refiere a un miembro de una especie bacteriana con una firma genética tal que puede diferenciarse
15 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
20 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.,
25 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
30 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.

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
5 sometido a una terapia contra el cáncer.

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
10 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,
15 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
20 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

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

En algunas realizaciones, las bacterias de las cuales se obtienen las mEV (tales como smEV) se modifican para
30 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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,
30 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.

5 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
10 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
15 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
20 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.
25 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%,
30 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.

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

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.*

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

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

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

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

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

5 En algunas realizaciones, las mEV se obtienen a partir de bacterias neutrófilas.

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

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

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

15 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).

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

20 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).

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

25 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).

En algunas realizaciones, las mEV se liofilizan.

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

En algunas realizaciones, las mEV se irradian con UV.

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

En algunas realizaciones, las mEV se tratan con ácido.

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

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 bacterium AT_5844</i>	AGEZ01000040
	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	NR_074448
	<i>Achromobacter denitrificans</i>	NR_042021
5	<i>Achromobacter piechaudii</i>	ADMS01000149
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ACRC01000072
	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	CP001859
	<i>Acidaminococcus intestini</i>	CP003058
	<i>Acidaminococcus sp. D21</i>	ACGB01000071
10	<i>Acidilobus saccharovorans</i>	AY350586
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR_074660
	<i>Acidovorax sp. 98_63833</i>	AY258065
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ACYQ01000014
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AM157426
15	<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
20	<i>Acinetobacter parvus</i>	AIEB01000124
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	ACVR01000010
	<i>Acinetobacter schindleri</i>	NR_025412
	<i>Acinetobacter sp. 56A1</i>	GQ178049
	<i>Acinetobacter sp. CIP 101934</i>	JQ638573
25	<i>Acinetobacter sp. CIP 102143</i>	JQ638578
	<i>Acinetobacter sp. CIP 53.82</i>	JQ638584
	<i>Acinetobacter sp. M16_22</i>	HM366447
	<i>Acinetobacter sp. RUH2624</i>	ACQF01000094
30	<i>Acinetobacter sp. SH024</i>	ADCH01000068
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AY362885

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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 sp. GEJ15</i>	GU561313

5	<i>Actinomyces sp. HKU31</i>	HQ335393
	<i>Actinomyces sp. ICM34</i>	HQ616391
	<i>Actinomyces sp. ICM41</i>	HQ616392
	<i>Actinomyces sp. ICM47</i>	HQ616395
	<i>Actinomyces sp. ICM54</i>	HQ616398
10	<i>Actinomyces sp. M2231_94_1</i>	AJ234063
	<i>Actinomyces sp. clon oral GU009</i>	AY349361
	<i>Actinomyces sp. clon oral GU067</i>	AY349362
	<i>Actinomyces sp. clon oral IO076</i>	AY349363
	<i>Actinomyces sp. clon oral IO077</i>	AY349364
15	<i>Actinomyces sp. clon oral IP073</i>	AY349365
	<i>Actinomyces sp. clon oral IP081</i>	AY349366
	<i>Actinomyces sp. clon oral JA063</i>	AY349367
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 170</i>	AFBL01000010
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 171</i>	AECW01000034
20	<i>Actinomyces sp. taxón oral 178</i>	AEUH01000060
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 180</i>	AEPP01000041
	<i>Actinomyces sp. taxón oral 848</i>	ACUY01000072
	<i>Actinomyces sp. taxón oral C55</i>	HM099646
	<i>Actinomyces sp. TeJ5</i>	GU561315
25	<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
30	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	NR_043443
	<i>Aerococcus viridans</i>	ADNT01000041
	<i>Aeromicrobium marinum</i>	NR_025681
	<i>Aeromicrobium sp. JC14</i>	JF824798
	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	S39232

	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	X71121
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	NC_008570
	<i>Aeromonas jandaei</i>	X60413
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	NC_009348
5	<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
10	<i>Aggregatibacter segnis</i>	AEPS01000017
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	CP000628
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AJ389893
	<i>Agrococcus jenensis</i>	NR_026275
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	CP001071
15	<i>Alcaligenes faecalis</i>	AB680368
	<i>Alcaligenes sp. C014</i>	DQ643040
	<i>Alcaligenes sp. S3</i>	HQ262549
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	NR_074721
20	<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
25	<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
30	<i>Alistipes shahii</i>	FP929032
	<i>Alistipes sp. HGB5</i>	AENZ01000082

	<i>Alistipes</i> sp. JC50	JF824804
	<i>Alistipes</i> sp. RMA 9912	GQ140629
	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i>	AY137848
	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	NR_043674
5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	ABIL02000005
	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	AGCJ01000054
	<i>Anaerosporobacter mobilis</i>	NR_042953
	<i>Anaerostipes caccae</i>	ABAX03000023
30	<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
5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<i>Atopobium sp. ICM57</i>	HQ616400
	<i>Atopobium vaginae</i>	AEDQ01000024
	<i>Aurantimonas coralicida</i>	AY065627
	<i>Aureimonas altamirensis</i>	FN658986
30	<i>Auritibacter ignavus</i>	FN554542
	<i>Averyella dalhousiensis</i>	DQ481464

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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

5	<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
10	<i>Bacillus sp. 2008724139</i>	GU252111
	<i>Bacillus sp. 7_16AIA</i>	FN397518
	<i>Bacillus sp. 9_3AIA</i>	FN397519
	<i>Bacillus sp. AP8</i>	JX101689
	<i>Bacillus sp. B27(2008)</i>	EU362173
15	<i>Bacillus sp. BT1B_CT2</i>	ACWC01000034
	<i>Bacillus sp. GB1.1</i>	FJ897765
	<i>Bacillus sp. GB9</i>	FJ897766
	<i>Bacillus sp. HU19.1</i>	FJ897769
	<i>Bacillus sp. HU29</i>	FJ897771
20	<i>Bacillus sp. HU33.1</i>	FJ897772
	<i>Bacillus sp. JC6</i>	JF824800
	<i>Bacillus sp. taxón oral F26</i>	HM099642
	<i>Bacillus sp. taxón oral F28</i>	HM099650
	<i>Bacillus sp. taxón oral F79</i>	HM099654
25	<i>Bacillus sp. SRC_DSf1</i>	GU797283
	<i>Bacillus sp. SRC_DSf10</i>	GU797292
	<i>Bacillus sp. SRC_DSf2</i>	GU797284
	<i>Bacillus sp. SRC_DSf6</i>	GU797288
	<i>Bacillus sp. tc09</i>	HQ844242
30	<i>Bacillus sp. zh168</i>	FJ851424
	<i>Bacillus sphaericus</i>	DQ286318
	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	NR_026010
	<i>Bacillus subtilis</i>	EU627588
	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	NR_029151

	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NC_008600
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	NR_074926
	<i>Bacteroidales bacterium ph8</i>	JN837494
	<i>Bacteroidales genomsp. P1</i>	AY341819
5	<i>Bacteroidales genomsp. P2 clon oral MB1_G13</i>	DQ003613
	<i>Bacteroidales genomsp. P3 clon oral MB1_G34</i>	DQ003615
	<i>Bacteroidales genomsp. P4 clon oral MB2_G17</i>	DQ003617
	<i>Bacteroidales genomsp. P5 clon oral MB2_P04</i>	DQ003619
	<i>Bacteroidales genomsp. P6 clon oral MB3_C19</i>	DQ003634
10	<i>Bacteroidales genomsp. P7 clon oral MB3_P19</i>	DQ003623
	<i>Bacteroidales genomsp. P8 clon oral MB4_G15</i>	DQ003626
	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	NR_028607
	<i>Bacteroides barnesiae</i>	NR_041446
	<i>Bacteroides caccae</i>	EU136686
15	<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
20	<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
25	<i>Bacteroides fragilis</i>	AP006841
	<i>Bacteroides galacturonicus</i>	DQ497994
	<i>Bacteroides helcogenes</i>	CP002352
	<i>Bacteroides heparinolyticus</i>	JN867284
30	<i>Bacteroides intestinalis</i>	ABJL02000006
	<i>Bacteroides massiliensis</i>	AB200226

5	<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
10	<i>Bacteroides pyogenes</i>	NR_041280
	<i>Bacteroides salanitronis</i>	CP002530
	<i>Bacteroides salyersiae</i>	EU136690
	<i>Bacteroides sp. 1_1_14</i>	ACRP01000155
	<i>Bacteroides sp. 1_1_30</i>	ADCL01000128
15	<i>Bacteroides sp. 1_1_6</i>	ACIC01000215
	<i>Bacteroides sp. 2_1_22</i>	ACPQ01000117
	<i>Bacteroides sp. 2_1_56FAA</i>	ACWI01000065
	<i>Bacteroides sp. 2_2_4</i>	ABZZ01000168
	<i>Bacteroides sp. 20_3</i>	ACRQ01000064
20	<i>Bacteroides sp. 3_1_19</i>	ADCJ01000062
	<i>Bacteroides sp. 3_1_23</i>	ACRS01000081
	<i>Bacteroides sp. 3_1_33FAA</i>	ACPS01000085
	<i>Bacteroides sp. 3_1_40A</i>	ACRT01000136
	<i>Bacteroides sp. 3_2_5</i>	ACIB01000079
25	<i>Bacteroides sp. 315_5</i>	FJ848547
	<i>Bacteroides sp. 31SF15</i>	AJ583248
	<i>Bacteroides sp. 31SF18</i>	AJ583249
	<i>Bacteroides sp. 35AE31</i>	AJ583244
	<i>Bacteroides sp. 35AE37</i>	AJ583245
30	<i>Bacteroides sp. 35BE34</i>	AJ583246
	<i>Bacteroides sp. 35BE35</i>	AJ583247
	<i>Bacteroides sp. 4_1_36</i>	ACTC01000133
	<i>Bacteroides sp. 4_3_47FAA</i>	ACDR02000029
	<i>Bacteroides sp. 9_1_42FAA</i>	ACAA01000096

5	<i>Bacteroides sp. AR20</i>	AF139524
	<i>Bacteroides sp. AR29</i>	AF139525
	<i>Bacteroides sp. B2</i>	EU722733
	<i>Bacteroides sp. D1</i>	ACAB02000030
	<i>Bacteroides sp. D2</i>	ACGA01000077
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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 genomosp. C1</i>	AY278612
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	AAXD02000018
	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ABYS02000004
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	CP001606
5	<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
10	<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
15	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	AJ307005
	<i>Bifidobacterium sp. HM2</i>	AB425276
	<i>Bifidobacterium sp. HMLN12</i>	JF519685
	<i>Bifidobacterium sp. M45</i>	HM626176
	<i>Bifidobacterium sp. MSX5B</i>	HQ616382
20	<i>Bifidobacterium sp. TM_7</i>	AB218972
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	DQ340557
	<i>Bifidobacterium urinalis</i>	AJ278695
	<i>Bilophila wadsworthia</i>	ADCP01000166
25	<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
30	<i>Blautia coccoides</i>	AB571656
	<i>Blautia glucerasea</i>	AB588023

5	<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
10	<i>Blautia schinkii</i>	NR_026312
	<i>Blautia sp. M25</i>	HM626178
	<i>Blautia stercoris</i>	HM626177
	<i>Blautia wexlerae</i>	EF036467
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	NR_025949
15	<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
20	<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
25	<i>Borrelia persica</i>	HM161645
	<i>Borrelia recurrentis</i>	AF107367
	<i>Borrelia sp. NE49</i>	AJ224142
	<i>Borrelia spielmanii</i>	ABKB01000002
	<i>Borrelia turicatae</i>	NC_008710
30	<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
5	<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
10	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	NR_037005
	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	NR_040981
	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	NR_040982
	<i>Brevibacillus</i> sp. phR	JN837488
	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	NR_026514
15	<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
20	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	ADNU01000076
	<i>Brevibacterium paucivorans</i>	EU086796
	<i>Brevibacterium sanguinis</i>	NR_028016
	<i>Brevibacterium</i> sp. H15	AB177640
	<i>Brevibacterium</i> sp. JC43	JF824806
25	<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
30	<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
5	<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
10	<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
15	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	HQ005410
	<i>Burkholderia sp. 383</i>	CP000151
	<i>Burkholderia xenovorans</i>	U86373
	<i>Burkholderiales bacterium 1_1_47</i>	ADCQ01000066
20	<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
25	<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
30	<i>Campylobacter gracilis</i>	ACYG01000026
	<i>Campylobacter hominis</i>	NC_009714

5	<i>Campylobacter jejuni</i>	AL139074
	<i>Campylobacter lari</i>	CP000932
	<i>Campylobacter rectus</i>	ACFU01000050
	<i>Campylobacter showae</i>	ACVQ01000030
	<i>Campylobacter sp. FOBRC14</i>	HQ616379
10	<i>Campylobacter sp. FOBRC15</i>	HQ616380
	<i>Campylobacter sp. clon oral BB120</i>	AY005038
	<i>Campylobacter sputorum</i>	NR_044839
	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	AEPU01000040
	<i>Candidatus Arthromitus sp. SFB_mouse_Yit</i>	NR_074460
15	<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
20	<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
25	<i>Capnocytophaga sp. cepa oral A47ROY</i>	AY005077
	<i>Capnocytophaga sp. cepa oral S3</i>	AY005073
	<i>Capnocytophaga sp. taxón oral 338</i>	AEXX01000050
	<i>Capnocytophaga sp. S1b</i>	U42009
	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ABZV01000054
30	<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
5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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
5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<i>Clostridium argentinense</i>	NR_029232

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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

5	<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
10	<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
15	<i>Clostridium septicum</i>	NR_026020
	<i>Clostridium sordellii</i>	AB448946
	<i>Clostridium sp. 7_2_43FAA</i>	ACDK01000101
	<i>Clostridium sp. D5</i>	ADBG01000142
	<i>Clostridium sp. HGF2</i>	AENW01000022
20	<i>Clostridium sp. HPB_46</i>	AY862516
	<i>Clostridium sp. JC122</i>	CAEV01000127
	<i>Clostridium sp. L2_50</i>	AAW02000018
	<i>Clostridium sp. LMG 16094</i>	X95274
	<i>Clostridium sp. M62_1</i>	ACFX02000046
25	<i>Clostridium sp. MLG055</i>	AF304435
	<i>Clostridium sp. MT4 E</i>	FJ159523
	<i>Clostridium sp. NMBHI_1</i>	JN093130
	<i>Clostridium sp. NML 04A032</i>	EU815224
	<i>Clostridium sp. SS2_1</i>	ABGC03000041
30	<i>Clostridium sp. SY8519</i>	AP012212
	<i>Clostridium sp. TM_40</i>	AB249652
	<i>Clostridium sp. YIT 12069</i>	AB491207
	<i>Clostridium sp. YIT 12070</i>	AB491208
	<i>Clostridium sphenoides</i>	X73449

5	<i>Clostridium spiroforme</i>	X73441
	<i>Clostridium sporogenes</i>	ABKW02000003
	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	NR_044835
	<i>Clostridium stercorarium</i>	NR_025100
	<i>Clostridium sticklandii</i>	L04167
10	<i>Clostridium straminisolvens</i>	NR_024829
	<i>Clostridium subterminale</i>	NR_041795
	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	NR_044161
	<i>Clostridium symbiosum</i>	ADLQ01000114
	<i>Clostridium tertium</i>	Y18174
15	<i>Clostridium tetani</i>	NC_004557
	<i>Clostridium thermocellum</i>	NR_074629
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	NR_044718
	<i>Clostridium viride</i>	NR_026204
	<i>Clostridium xylanolyticum</i>	NR_037068
20	<i>Collinsella aerofaciens</i>	AAVN02000007
	<i>Collinsella intestinalis</i>	ABXH02000037
	<i>Collinsella stercoris</i>	ABXJ01000150
	<i>Collinsella tanakaei</i>	AB490807
	<i>Comamonadaceae bacterium NML000135</i>	JN585335
25	<i>Comamonadaceae bacterium NML790751</i>	JN585331
	<i>Comamonadaceae bacterium NML910035</i>	JN585332
	<i>Comamonadaceae bacterium NML910036</i>	JN585333
	<i>Comamonadaceae bacterium taxón oral F47</i>	HM099651
	<i>Comamonas sp. NSP5</i>	AB076850
30	<i>Conchiformibius kuhniae</i>	NR_041821
	<i>Coprobacillus cateniformis</i>	AB030218
	<i>Coprobacillus sp. 29_1</i>	ADKX01000057
	<i>Coprobacillus sp. D7</i>	ACDT01000199
	<i>Coprococcus catus</i>	EU266552

	<i>Coprococcus comes</i>	ABVR01000038
	<i>Coprococcus eutactus</i>	EF031543
	<i>Coprococcus sp. ART55_1</i>	AY350746
	<i>Coriobacteriaceae bacterium BV3Ac1</i>	JN809768
5	<i>Coriobacteriaceae bacterium JC110</i>	CAEM01000062
	<i>Coriobacteriaceae bacterium phI</i>	JN837493
	<i>Corynebacterium accolens</i>	ACGD01000048
	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ADNS01000011
	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	ABZU01000033
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	ACYW01000001

5	<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
10	<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
15	<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
20	<i>Corynebacterium simulans</i>	AF537604
	<i>Corynebacterium singulare</i>	NR_026394
	<i>Corynebacterium sp. 1 ex sheep</i>	Y13427
	<i>Corynebacterium sp. L_2012475</i>	HE575405
	<i>Corynebacterium sp. NML 93_0481</i>	GU238409
25	<i>Corynebacterium sp. NML 97_0186</i>	GU238411
	<i>Corynebacterium sp. NML 99_0018</i>	GU238413
	<i>Corynebacterium striatum</i>	ACGE01000001
	<i>Corynebacterium sundsvallense</i>	Y09655
	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	ACVP01000009
30	<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

5	<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
10	<i>Cryptobacterium curtum</i>	GQ422741
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	GU230889
	<i>Cytophaga xylanolytica</i>	FR733683
	<i>Deferribacteres sp. clon oral JV001</i>	AY349370
	<i>Deferribacteres sp. clon oral JV006</i>	AY349371
15	<i>Deferribacteres sp. clon oral JV023</i>	AY349372
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	AE000513
	<i>Deinococcus sp. R_43890</i>	FR682752
	<i>Delftia acidovorans</i>	CP000884
	<i>Dermabacter hominis</i>	FJ263375
20	<i>Dermacoccus sp. Ellin185</i>	AEIQ01000090
	<i>Desmospora activa</i>	AM940019
	<i>Desmospora sp. 8437</i>	AFHT01000143
	<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	AJ276701
	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	NR_074996
25	<i>Desulfobulbus sp. 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
30	<i>Desulfovibrio sp. 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 sp. taxón oral 502</i>	GQ422739
	<i>Dialister succinatiphilus</i>	AB370249
5	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	GQ870426
	<i>Dietzia sp. BBDP51</i>	DQ337512
	<i>Dietzia sp. CA149</i>	GQ870422
	<i>Dietzia timorensis</i>	GQ870424
10	<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
15	<i>Eggerthella lenta</i>	AF292375
	<i>Eggerthella sinensis</i>	AY321958
	<i>Eggerthella sp. 1_3_56FAA</i>	ACWN01000099
	<i>Eggerthella sp. HGA1</i>	AEXR01000021
	<i>Eggerthella sp. YY7918</i>	AP012211
20	<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
25	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Z96078
	<i>Enterobacter cloacae</i>	FP929040
	<i>Enterobacter cowanii</i>	NR_025566
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	AFHR01000079
	<i>Enterobacter sp. 247BMC</i>	HQ122932
30	<i>Enterobacter sp. 638</i>	NR_074777
	<i>Enterobacter sp. JC163</i>	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
5	<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium Smarlab 3302238	AY538694
	<i>Enterococcus</i> avium	AF133535
	<i>Enterococcus</i> caccae	AY943820
	<i>Enterococcus</i> casseliflavus	AEWT01000047
10	<i>Enterococcus</i> durans	AJ276354
	<i>Enterococcus</i> faecalis	AE016830
	<i>Enterococcus</i> faecium	AM157434
	<i>Enterococcus</i> gallinarum	AB269767
	<i>Enterococcus</i> gilvus	AY033814
15	<i>Enterococcus</i> hawaiiensis	AY321377
	<i>Enterococcus</i> hirae	AF061011
	<i>Enterococcus</i> italicus	AEPV01000109
	<i>Enterococcus</i> mundtii	NR_024906
	<i>Enterococcus</i> raffinosus	FN600541
20	<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</i> thailandicus	AY321376
25	<i>Eremococcus</i> coleocola	AENN01000008
	<i>Erysipelothrix</i> inopinata	NR_025594
	<i>Erysipelothrix</i> rhusiopathiae	ACLK01000021
	<i>Erysipelothrix</i> tonsillarum	NR_040871
30	<i>Erysipelotrichaceae</i> bacterium 3_1_53	ACTJ01000113
	<i>Erysipelotrichaceae</i> bacterium 5_2_54FAA	ACZW01000054

5	<i>Escherichia albertii</i>	ABKX01000012
	<i>Escherichia coli</i>	NC_008563
	<i>Escherichia fergusonii</i>	CU928158
	<i>Escherichia hermannii</i>	HQ407266
	<i>Escherichia sp. 1_1_43</i>	ACID01000033
10	<i>Escherichia sp. 4_1_40B</i>	ACDM02000056
	<i>Escherichia sp. B4</i>	EU722735
	<i>Escherichia vulneris</i>	NR_041927
	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	AY675965
	<i>Eubacteriaceae bacterium P4P_50 P4</i>	AY207060
15	<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
20	<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
25	<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
30	<i>Eubacterium infirmum</i>	U13039
	<i>Eubacterium limosum</i>	CP002273
	<i>Eubacterium moniliforme</i>	HF558373
	<i>Eubacterium multiforme</i>	NR_024683
	<i>Eubacterium nitritogenes</i>	NR_024684

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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
5	<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
10	<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
15	<i>Fusobacterium naviforme</i>	HQ223106
	<i>Fusobacterium necrogenes</i>	X55408
	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	AM905356
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ADV01000034
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ACJY01000002
20	<i>Fusobacterium russii</i>	NR_044687
	<i>Fusobacterium sp. 1_1_41FAA</i>	ADGG01000053
	<i>Fusobacterium sp. 11_3_2</i>	ACUO01000052
	<i>Fusobacterium sp. 12_1B</i>	AGWJ01000070
	<i>Fusobacterium sp. 2_1_31</i>	ACDC02000018
25	<i>Fusobacterium sp. 3_1_27</i>	ADGF01000045
	<i>Fusobacterium sp. 3_1_33</i>	ACQE01000178
	<i>Fusobacterium sp. 3_1_36A2</i>	ACPU01000044
	<i>Fusobacterium sp. 3_1_5R</i>	ACDD01000078
	<i>Fusobacterium sp. AC18</i>	HQ616357
30	<i>Fusobacterium sp. ACB2</i>	HQ616358

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<i>Geobacillus</i> sp. E263	DQ647387
	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	CP001638
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NR_040794
	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	NR_043020
	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	NR_074976
30	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	NR_043022
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	NR_074931
	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	CP001124
	<i>Gloeobacter violaceus</i>	NR_074282
	<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i>	NR_028767

	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	NR_074292
	<i>Gluconacetobacter entanii</i>	NR_028909
	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	NR_026513
	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	NR_026133
5	<i>Gluconacetobacter johannae</i>	NR_024959
	<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	NR_041295
	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	NR_074338
	<i>Gordonia bronchialis</i>	NR_027594
	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	DQ385609
10	<i>Gordonia sp. KTR9</i>	DQ068383
	<i>Gordonia sputi</i>	FJ536304
	<i>Gordonia terrae</i>	GQ848239
	<i>Gordonibacter pamelaee</i>	AM886059
	<i>Gordonibacter pamelaee</i>	FP929047
15	<i>Gracilibacter thermotolerans</i>	NR_043559
	<i>Gramella forsetii</i>	NR_074707
	<i>Granulicatella adiacens</i>	ACKZ01000002
	<i>Granulicatella elegans</i>	AB252689
	<i>Granulicatella paradiacens</i>	AY879298
20	<i>Granulicatella sp. M658_99_3</i>	AJ271861
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASC02</i>	AY923126
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASCA05</i>	DQ341469
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASCB09</i>	AY953251
	<i>Granulicatella sp. clon oral ASCG05</i>	AY923146
25	<i>Grimontia hollisae</i>	ADAQ01000013
	<i>Haematobacter sp. BC14248</i>	GU396991
	<i>Haemophilus aegyptius</i>	AFBC01000053
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	AE017143
30	<i>Haemophilus genomosp. P2 clon oral MB3_C24</i>	DQ003621
	<i>Haemophilus genomosp. P3 clon oral MB3_C38</i>	DQ003635

	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	JN175335
	<i>Haemophilus influenzae</i>	AADP01000001
	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	GU561425
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	AEWU01000024
5	<i>Haemophilus paraphrophaemolyticus</i>	M75076
	<i>Haemophilus parasuis</i>	GU226366
	<i>Haemophilus somnus</i>	NC_008309
	<i>Haemophilus sp. 70334</i>	HQ680854
	<i>Haemophilus sp. HK445</i>	FJ685624
10	<i>Haemophilus sp. clon oral ASCA07</i>	AY923117
	<i>Haemophilus sp. clon oral ASCG06</i>	AY923147
	<i>Haemophilus sp. clon oral BJ021</i>	AY005034
	<i>Haemophilus sp. clon oral BJ095</i>	AY005033
	<i>Haemophilus sp. clon oral JM053</i>	AY349380
15	<i>Haemophilus sp. taxón oral 851</i>	AGRK01000004
	<i>Haemophilus sputorum</i>	AFNK01000005
	<i>Hafnia alvei</i>	DQ412565
	<i>Halomonas elongata</i>	NR_074782
	<i>Halomonas johnsoniae</i>	FR775979
20	<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
25	<i>Helicobacter pylori</i>	CP000012
	<i>Helicobacter sp. None</i>	U44756
	<i>Helicobacter winthamensis</i>	ACDO01000013
	<i>Heliobacterium modesticaldum</i>	NR_074517
30	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	CP002039
	<i>Herbaspirillum sp. JC206</i>	JN657219

	<i>Histophilus somni</i>	AF549387
	<i>Holdemania filiformis</i>	Y11466
	<i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i>	NR_044425
	<i>Hyperthermus butylicus</i>	CP000493
5	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	AY468372
	<i>Hyphomonas neptunium</i>	NR_074092
	<i>Ignatzschineria indica</i>	HQ823562
	<i>Ignatzschineria sp. NML 95_0260</i>	HQ823559
	<i>Ignicoccus islandicus</i>	X99562
10	<i>Inquilinus limosus</i>	NR_029046
	<i>Janibacter limosus</i>	NR_026362
	<i>Janibacter melonis</i>	EF063716
	<i>Janthinobacterium sp. SY12</i>	EF455530
	<i>Johnsonella ignava</i>	X87152
15	<i>Jonquetella anthropi</i>	ACOO02000004
	<i>Kerstersia gyiorum</i>	NR_025669
	<i>Kingella denitrificans</i>	AEWV01000047
	<i>Kingella genomosp. P1 oral cone MB2_C20</i>	DQ003616
	<i>Kingella kingae</i>	AFHS01000073
20	<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
25	<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
30	<i>Klebsiella sp. SRC_DSD1</i>	GU797254

5	<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
10	<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
15	<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
20	<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	L14675
	<i>Lachnospiraceae bacterium 1_1_57FAA</i>	ACTM01000065
	<i>Lachnospiraceae bacterium 1_4_56FAA</i>	ACTN01000028
	<i>Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA</i>	ADLB01000035
	<i>Lachnospiraceae bacterium 2_1_58FAA</i>	ACTO01000052
25	<i>Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1</i>	ACTP01000124
	<i>Lachnospiraceae bacterium 4_1_37FAA</i>	ADCR01000030
	<i>Lachnospiraceae bacterium 5_1_57FAA</i>	ACTR01000020
	<i>Lachnospiraceae bacterium 5_1_63FAA</i>	ACTS01000081
	<i>Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA</i>	ACTV01000014
30	<i>Lachnospiraceae bacterium 8_1_57FAA</i>	ACWQ01000079
	<i>Lachnospiraceae bacterium 9_1_43BFAA</i>	ACTX01000023
	<i>Lachnospiraceae bacterium A4</i>	DQ789118
	<i>Lachnospiraceae bacterium DJF VP30</i>	EU728771
	<i>Lachnospiraceae bacterium ICM62</i>	HQ616401

	<i>Lachnospiraceae bacterium MSX33</i>	HQ616384
	<i>Lachnospiraceae bacterium taxón oral 107</i>	ADDS01000069
	<i>Lachnospiraceae bacterium taxón oral F15</i>	HM099641
	<i>Lachnospiraceae genomsp. C1</i>	AY278618
5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<i>Lactobacillus genomsp. C1</i>	AY278619
	<i>Lactobacillus genomsp. C2</i>	AY278620
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	ACLM01000202
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	ACGP01000200
	<i>Lactobacillus hominis</i>	FR681902
30	<i>Lactobacillus iners</i>	AEKJ01000002

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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

5	<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
10	<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
15	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0716</i>	EU600921
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0718</i>	EU600922
	<i>Lactobacillus sp. KLDS 1.0719</i>	EU600923
	<i>Lactobacillus sp. clon oral HT002</i>	AY349382
	<i>Lactobacillus sp. clon oral HT070</i>	AY349383
20	<i>Lactobacillus sp. taxón oral 052</i>	GQ422710
	<i>Lactobacillus tucseti</i>	NR_042194
	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	ACGU01000081
	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	ACGV01000168
	<i>Lactobacillus vini</i>	NR_042196
25	<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
30	<i>Lactonifactor longoviformis</i>	DQ100449
	<i>Laribacter hongkongensis</i>	CP001154
	<i>Lautropia mirabilis</i>	AEQP01000026
	<i>Lautropia sp. clon oral AP009</i>	AY005030
	<i>Legionella hackeliae</i>	M36028

	<i>Legionella longbeachae</i>	M36029
	<i>Legionella pneumophila</i>	NC_002942
	<i>Legionella sp. D3923</i>	JN380999
	<i>Legionella sp. D4088</i>	JN381012
5	<i>Legionella sp. H63</i>	JF831047
	<i>Legionella sp. NML 93L054</i>	GU062706
	<i>Legionella steelei</i>	HQ398202
	<i>Leminorella grimontii</i>	AJ233421
	<i>Leminorella richardii</i>	HF558368
10	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NC_008508
	<i>Leptospira broomii</i>	NR_043200
	<i>Leptospira interrogans</i>	NC_005823
	<i>Leptospira licerasiae</i>	EF612284
	<i>Leptotrichia buccalis</i>	CP001685
15	<i>Leptotrichia genomosp. C1</i>	AY278621
	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	ADAD01000110
	<i>Leptotrichia hofstadii</i>	ACVB02000032
	<i>Leptotrichia shahii</i>	AY029806
	<i>Leptotrichia sp. neutropenicPatient</i>	AF189244
20	<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 P1</i>	AY207053
25	<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
30	<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
5	<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
10	<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
15	<i>Marvinbryantia formatexigens</i>	AJ505973
	<i>Massilia sp. CCUG 43427A</i>	FR773700
	<i>Megamonas funiformis</i>	AB300988
	<i>Megamonas hypermegale</i>	AJ420107
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	AY038996
20	<i>Megasphaera genomsp. C1</i>	AY278622
	<i>Megasphaera genomsp. type_1</i>	ADGP01000010
	<i>Megasphaera micronuciformis</i>	AECS01000020
	<i>Megasphaera sp. BLPYG_07</i>	HM990964
	<i>Megasphaera sp. UPII 199_6</i>	AFIJ01000040
25	<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
30	<i>Methanobrevibacter cuticularis</i>	NR_044776

5	<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
10	<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
15	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	AY196684
	<i>Methylobacterium extorquens</i>	NC_010172
	<i>Methylobacterium podarium</i>	AY468363
	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	GU294320
	<i>Methylobacterium sp. 1sub</i>	AY468371
20	<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
25	<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
30	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	EU714359
	<i>Microbacterium schleiferi</i>	NR_044936
	<i>Microbacterium sp. 768</i>	EU714378
	<i>Microbacterium sp. cepa oral C24KA</i>	AF287752
	<i>Microbacterium testaceum</i>	EU714365

5	<i>Micrococcus antarcticus</i>	NR_025285
	<i>Micrococcus luteus</i>	NR_075062
	<i>Micrococcus lylae</i>	NR_026200
	<i>Micrococcus</i> sp. 185	EU714334
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	NC_010296
10	<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	NR_028840
	<i>Mitsuokella multacida</i>	ABWK02000005
	<i>Mitsuokella</i> sp. taxón oral 521	GU413658
	<i>Mitsuokella</i> sp. taxón oral G68	GU432166
	<i>Mobiluncus curtisii</i>	AEPZ01000013
15	<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
20	<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
25	<i>Moraxella osloensis</i>	JN175341
	<i>Moraxella</i> sp. 16285	JF682466
	<i>Moraxella</i> sp. GM2	JF837191
	<i>Morganella morganii</i>	AJ301681
	<i>Morganella</i> sp. JB_T16	AJ781005
30	<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

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<i>Myroides sp. MY15</i>	GU253339
	<i>Neisseria bacilliformis</i>	AFAY01000058
	<i>Neisseria cinerea</i>	ACDY01000037
	<i>Neisseria elongata</i>	ADBF01000003

5	<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
10	<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
15	<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. cepa oral B33KA</i>	AY005028
	<i>Neisseria sp. taxón oral 014</i>	ADEA01000039
20	<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
25	<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
30	<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
5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<i>Ornithinibacillus bavariensis</i>	NR_044923
	<i>Ornithinibacillus sp. 7_10AIA</i>	FN397526
	<i>Oscillibacter sp. G2</i>	HM626173
	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	NR_074793
	<i>Oscillospira guilliermondii</i>	AB040495
30	<i>Oxalobacter formigenes</i>	ACDQ01000020
	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	NR_042272

5	<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
10	<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
15	<i>Paenibacillus sp. CIP 101062</i>	HM212646
	<i>Paenibacillus sp. HGF5</i>	AEXS01000095
	<i>Paenibacillus sp. HGF7</i>	AFDH01000147
	<i>Paenibacillus sp. JC66</i>	JF824808
	<i>Paenibacillus sp. taxón oral F45</i>	HM099647
20	<i>Paenibacillus sp. R_27413</i>	HE586333
	<i>Paenibacillus sp. R_27422</i>	HE586338
	<i>Paenibacillus timonensis</i>	NR_042844
	<i>Pantoea agglomerans</i>	AY335552
	<i>Pantoea ananatis</i>	CP001875
25	<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
30	<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 sp. D13</i>	ACPW01000017
	<i>Parabacteroides sp. NS31_3</i>	JN029805
	<i>Parachlamydia sp. UWE25</i>	BX908798
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	CP000490
5	<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
10	<i>Parasutterella secunda</i>	AB491209
	<i>Parvimonas micra</i>	AB729072
	<i>Parvimonas sp. taxón oral 110</i>	AFII01000002
	<i>Pasteurella bettyae</i>	L06088
	<i>Pasteurella dagmatis</i>	ACZR01000003
15	<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 sp. clon oral JM048</i>	AY349389
20	<i>Peptococcus sp. taxón oral 167</i>	GQ422727
	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	D14145
	<i>Peptoniphilus duerdenii</i>	EU526290
	<i>Peptoniphilus harei</i>	NR_026358
25	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	AY153431
	<i>Peptoniphilus ivorii</i>	Y07840
	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	ADDO01000050
	<i>Peptoniphilus sp. gpac007</i>	AM176517
	<i>Peptoniphilus sp. gpac018A</i>	AM176519
30	<i>Peptoniphilus sp. gpac077</i>	AM176527
	<i>Peptoniphilus sp. gpac148</i>	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
5	<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
10	<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 succinatutens</i>	AB490811
15	<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
20	<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
25	<i>Porphyromonas macacae</i>	NR_025908
	<i>Porphyromonas somerae</i>	AB547667
	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral BB134	AY005068
	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral F016	AY005069
	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral P2PB_52 P1	AY207054
30	<i>Porphyromonas</i> sp. clon oral P4GB_100 P2	AY207057

	<i>Porphyromonas</i> sp. UQD 301	EU012301
	<i>Porphyromonas uenonis</i>	ACLR01000152
	<i>Prevotella albensis</i>	NR_025300
	<i>Prevotella amnii</i>	AB547670
5	<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
10	<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
15	<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
20	<i>Prevotella heparinolytica</i>	GQ422742
	<i>Prevotella histicola</i>	JN867315
	<i>Prevotella intermedia</i>	AF414829
	<i>Prevotella loescheii</i>	JN867231
25	<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
30	<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	AFJE01000016
	<i>Prevotella nanceiensis</i>	JN867228

5	<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
10	<i>Prevotella ruminicola</i>	CP002006
	<i>Prevotella salivae</i>	AB108826
	<i>Prevotella sp. BI_42</i>	AJ581354
	<i>Prevotella sp. CM38</i>	HQ610181
	<i>Prevotella sp. ICM1</i>	HQ616385
15	<i>Prevotella sp. ICM55</i>	HQ616399
	<i>Prevotella sp. JCM 6330</i>	AB547699
	<i>Prevotella sp. clon oral AA020</i>	AY005057
	<i>Prevotella sp. clon oral ASCG10</i>	AY923148
	<i>Prevotella sp. clon oral ASCG12</i>	DQ272511
20	<i>Prevotella sp. clon oral AU069</i>	AY005062
	<i>Prevotella sp. clon oral CY006</i>	AY005063
	<i>Prevotella sp. clon oral DA058</i>	AY005065
	<i>Prevotella sp. clon oral FL019</i>	AY349392
	<i>Prevotella sp. clon oral FU048</i>	AY349393
25	<i>Prevotella sp. clon oral FW035</i>	AY349394
	<i>Prevotella sp. clon oral GI030</i>	AY349395
	<i>Prevotella sp. clon oral GI032</i>	AY349396
	<i>Prevotella sp. clon oral GI059</i>	AY349397
	<i>Prevotella sp. clon oral GU027</i>	AY349398
30	<i>Prevotella sp. clon oral HF050</i>	AY349399
	<i>Prevotella sp. clon oral ID019</i>	AY349400
	<i>Prevotella sp. clon oral IDR_CEC_0055</i>	AY550997
	<i>Prevotella sp. clon oral IK053</i>	AY349401
	<i>Prevotella sp. clon oral IK062</i>	AY349402

	<i>Prevotella sp. clon oral P4PB_83 P2</i>	AY207050
	<i>Prevotella sp. taxón oral 292</i>	GQ422735
	<i>Prevotella sp. taxón oral 299</i>	ACWZ01000026
	<i>Prevotella sp. taxón oral 300</i>	GU409549
5	<i>Prevotella sp. taxón oral 302</i>	ACZK01000043
	<i>Prevotella sp. taxón oral 310</i>	GQ422737
	<i>Prevotella sp. taxón oral 317</i>	ACQH01000158
	<i>Prevotella sp. taxón oral 472</i>	ACZS01000106
	<i>Prevotella sp. taxón oral 781</i>	GQ422744
10	<i>Prevotella sp. taxón oral 782</i>	GQ422745
	<i>Prevotella sp. taxón oral F68</i>	HM099652
	<i>Prevotella sp. taxón oral G60</i>	GU432133
	<i>Prevotella sp. taxón oral G70</i>	GU432179
	<i>Prevotella sp. taxón oral G71</i>	GU432180
15	<i>Prevotella sp. SEQ053</i>	JN867222
	<i>Prevotella sp. SEQ065</i>	JN867234
	<i>Prevotella sp. SEQ072</i>	JN867238
	<i>Prevotella sp. SEQ116</i>	JN867246
	<i>Prevotella sp. SG12</i>	GU561343
20	<i>Prevotella sp. sp24</i>	AB003384
	<i>Prevotella sp. sp34</i>	AB003385
	<i>Prevotella stercorea</i>	AB244774
	<i>Prevotella tanneriae</i>	ACIJ02000018
25	<i>Prevotella timonensis</i>	ADEF01000012
	<i>Prevotella veroralis</i>	ACVA01000027
30	<i>Prevotella jejuni, Prevotella aurantiaca, Prevotella baroniae, Prevotella colorans, Prevotella corporis, Prevotella dentasini, Prevotella enoeca, Prevotella falsenii, Prevotella fusca, Prevotella</i>	

5	<i>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>	
10	<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
15	<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
20	<i>Propionibacterium sp. 434_HC2</i>	AFIL01000035
	<i>Propionibacterium sp. H456</i>	AB177643
	<i>Propionibacterium sp. LG</i>	AY354921
	<i>Propionibacterium sp. taxón oral 192</i>	GQ422728
	<i>Propionibacterium sp. S555a</i>	AB264622
25	<i>Propionibacterium thoenii</i>	NR_042270
	<i>Proteus mirabilis</i>	ACLE01000013
	<i>Proteus penneri</i>	ABVP01000020
	<i>Proteus sp. HS7514</i>	DQ512963
	<i>Proteus vulgaris</i>	AJ233425
30	<i>Providencia alcalifaciens</i>	ABXW01000071
	<i>Providencia rettgeri</i>	AM040492
	<i>Providencia rustigianii</i>	AM040489

	<i>Providencia stuartii</i>	AF008581
	<i>Pseudoclavibacter</i> sp. <i>Timone</i>	FJ375951
	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	AY136666
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AABQ07000001
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AY622220
	<i>Pseudomonas gessardii</i>	FJ943496
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	AAUL01000021
	<i>Pseudomonas monteillii</i>	NR_024910
	<i>Pseudomonas poae</i>	GU188951
10	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000
	<i>Pseudomonas putida</i>	AF094741
	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>2_1_26</i>	ACWU01000257
	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>G1229</i>	DQ910482
	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>NP522b</i>	EU723211
15	<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
20	<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
25	<i>Psychrobacter</i> sp. <i>13983</i>	HM212668
	<i>Pyramidobacter piscicola</i>	AY207056
	<i>Ralstonia pickettii</i>	NC_010682
	<i>Ralstonia</i> sp. <i>5_7_47FAA</i>	ACUF01000076
30	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	AB364958
	<i>Raoultella planticola</i>	AF129443

	<i>Raoultella terrigena</i>	NR_037085
	<i>Rhodobacter sp. taxón oral C30</i>	HM099648
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CP000144
	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	X80615
5	<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
10	<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
15	<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
20	<i>Roseburia intestinalis</i>	FP929050
	<i>Roseburia inulinivorans</i>	AJ270473
	<i>Roseburia sp. 11SE37</i>	FM954975
	<i>Roseburia sp. 11SE38</i>	FM954976
	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	CP000804
25	<i>Roseomonas cervicalis</i>	ADVL01000363
	<i>Roseomonas mucosa</i>	NR_028857
	<i>Roseomonas sp. NML94_0193</i>	AF533357
	<i>Roseomonas sp. NML97_0121</i>	AF533359
	<i>Roseomonas sp. NML98_0009</i>	AF533358
30	<i>Roseomonas sp. NML98_0157</i>	AF533360

	<i>Rothia aerea</i>	DQ673320
	<i>Rothia dentocariosa</i>	ADDW01000024
	<i>Rothia mucilaginoso</i>	ACVO01000020
	<i>Rothia nasimurium</i>	NR_025310
5	<i>Rothia sp. taxón oral 188</i>	GU470892
	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	NR_026450
	<i>Ruminococcaceae bacterium D16</i>	ADDX01000083
	<i>Ruminococcus albus</i>	AY445600
	<i>Ruminococcus bromii</i>	EU266549
10	<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
15	<i>Ruminococcus lactaris</i>	ABOU02000049
	<i>Ruminococcus obeum</i>	AY169419
	<i>Ruminococcus sp. 18P13</i>	AJ515913
	<i>Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA</i>	ACII01000172
	<i>Ruminococcus sp. 9SE51</i>	FM954974
20	<i>Ruminococcus sp. ID8</i>	AY960564
	<i>Ruminococcus sp. K_1</i>	AB222208
	<i>Ruminococcus torques</i>	AAVP02000002
	<i>Saccharomonospora viridis</i>	X54286
25	<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
30	<i>Salmonella enterica</i>	ABAK02000001
	<i>Salmonella enterica</i>	NC_011080

5	<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
10	<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
15	<i>Scardovia wiggisiae</i>	AY278626
	<i>Segniliparus rotundus</i>	CP001958
	<i>Segniliparus rugosus</i>	ACZI01000025
	<i>Selenomonas artemidis</i>	HM596274
	<i>Selenomonas diana</i>	GQ422719
20	<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 MB3_C41</i>	DQ003636
25	<i>Selenomonas genomsp. P7 clon oral MB5_C08</i>	DQ003627
	<i>Selenomonas genomsp. P8 clon oral MB5_P06</i>	DQ003628
	<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802
	<i>Selenomonas noxia</i>	GU470909
	<i>Selenomonas ruminantium</i>	NR_075026
30	<i>Selenomonas sp. FOBRC9</i>	HQ616378
	<i>Selenomonas sp. clon oral FT050</i>	AY349403
	<i>Selenomonas sp. clon oral GI064</i>	AY349404
	<i>Selenomonas sp. clon oral GT010</i>	AY349405
	<i>Selenomonas sp. clon oral HU051</i>	AY349406

5	<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
10	<i>Selenomonas sp. clon oral P2PA_80 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
15	<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
20	<i>Shigella boydii</i>	AAKA01000007
	<i>Shigella dysenteriae</i>	NC_007606
	<i>Shigella flexneri</i>	AE005674
	<i>Shigella sonnei</i>	NC_007384
	<i>Shuttleworthia satelles</i>	ACIP02000004
25	<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
30	<i>Slackia faecicanis</i>	NR_042220
	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	NR_074439
	<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	AB566418
	<i>Slackia piriformis</i>	AB490806
	<i>Slackia sp. NATTS</i>	AB505075

5	<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
10	<i>Sphingomonas echinoides</i>	NR_024700
	<i>Sphingomonas sp. clon oral FI012</i>	AY349411
	<i>Sphingomonas sp. clon oral FZ016</i>	AY349412
	<i>Sphingomonas sp. taxón oral A09</i>	HM099639
	<i>Sphingomonas sp. taxón oral F71</i>	HM099645
15	<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
20	<i>Sporosarcina newyorkensis</i>	AFPZ01000142
	<i>Sporosarcina sp. 2681</i>	GU994081
	<i>Staphylococcaceae bacterium NML 92_0017</i>	AY841362
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CP002643
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	JQ624774
25	<i>Staphylococcus capitis</i>	ACFR01000029
	<i>Staphylococcus caprae</i>	ACRH01000033
	<i>Staphylococcus carnosus</i>	NR_075003
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	JN175375
	<i>Staphylococcus condimenti</i>	NR_029345
30	<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

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<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

5	<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
10	<i>Streptococcus infantarius</i>	ABJK02000017
	<i>Streptococcus infantis</i>	AFNN01000024
	<i>Streptococcus intermedius</i>	NR_028736
	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	NR_037096
15	<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
20	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	AEKM01000012
	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	AP012054
	<i>Streptococcus peroris</i>	AEVF01000016
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AE008537
25	<i>Streptococcus porcinus</i>	EF121439
	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	FJ827123
	<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	AENS01000003
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AE006496
30	<i>Streptococcus rattii</i>	X58304
	<i>Streptococcus salivarius</i>	AGBV01000001
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	NR_074974
	<i>Streptococcus sinensis</i>	AF432857

5	<i>Streptococcus</i> sp. 16362	JN590019
	<i>Streptococcus</i> sp. 2_1_36FAA	ACOI01000028
	<i>Streptococcus</i> sp. 2285_97	AJ131965
	<i>Streptococcus</i> sp. 69130	X78825
	<i>Streptococcus</i> sp. AC15	HQ616356
10	<i>Streptococcus</i> sp. ACS2	HQ616360
	<i>Streptococcus</i> sp. AS20	HQ616366
	<i>Streptococcus</i> sp. BS35a	HQ616369
	<i>Streptococcus</i> sp. C150	ACRI01000045
	<i>Streptococcus</i> sp. CM6	HQ616372
15	<i>Streptococcus</i> sp. CM7	HQ616373
	<i>Streptococcus</i> sp. ICM10	HQ616389
	<i>Streptococcus</i> sp. ICM12	HQ616390
	<i>Streptococcus</i> sp. ICM2	HQ616386
	<i>Streptococcus</i> sp. ICM4	HQ616387
20	<i>Streptococcus</i> sp. ICM45	HQ616394
	<i>Streptococcus</i> sp. M143	ACRK01000025
	<i>Streptococcus</i> sp. M334	ACRL01000052
	<i>Streptococcus</i> sp. OBRC6	HQ616352
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASB02	AY923121
25	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCA03	DQ272504
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCA04	AY923116
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCA09	AY923119
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCB04	AY923123
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCB06	AY923124
30	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCC04	AY923127
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCC05	AY923128
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCC12	DQ272507
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCD01	AY923129
	<i>Streptococcus</i> sp. clon oral ASCD09	AY923130

5	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCD10</i>	DQ272509
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE03</i>	AY923134
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE04</i>	AY953253
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE05</i>	DQ272510
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE06</i>	AY923135
10	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE09</i>	AY923136
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE10</i>	AY923137
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCE12</i>	AY923138
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCF05</i>	AY923140
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCF07</i>	AY953255
15	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCF09</i>	AY923142
	<i>Streptococcus sp. clon oral ASCG04</i>	AY923145
	<i>Streptococcus sp. clon oral BW009</i>	AY005042
	<i>Streptococcus sp. clon oral CH016</i>	AY005044
	<i>Streptococcus sp. clon oral GK051</i>	AY349413
20	<i>Streptococcus sp. clon oral GM006</i>	AY349414
	<i>Streptococcus sp. clon oral P2PA_41 P2</i>	AY207051
	<i>Streptococcus sp. clon oral P4PA_30 P4</i>	AY207064
	<i>Streptococcus sp. taxón oral 071</i>	AEEP01000019
	<i>Streptococcus sp. taxón oral G59</i>	GU432132
25	<i>Streptococcus sp. taxón oral G62</i>	GU432146
	<i>Streptococcus sp. taxón oral G63</i>	GU432150
	<i>Streptococcus sp. SHV515</i>	Y07601
	<i>Streptococcus suis</i>	FM252032
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CP000419
30	<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 sp. 1 AIP_2009</i>	FJ176782
	<i>Streptomyces sp. SD 511</i>	EU544231
	<i>Streptomyces sp. SD 524</i>	EU544234
5	<i>Streptomyces sp. SD 528</i>	EU544233
	<i>Streptomyces sp. SD 534</i>	EU544232
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	NR_027616
	<i>Subdoligranulum variabile</i>	AJ518869
	<i>Succinatimonas hippei</i>	AEVO01000027
10	<i>Sutterella morbirenis</i>	AJ832129
	<i>Sutterella parvirubra</i>	AB300989
	<i>Sutterella sanguinus</i>	AJ748647
	<i>Sutterella sp. YIT 12072</i>	AB491210
	<i>Sutterella stercoricanis</i>	NR_025600
15	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	ADMF01000048
	<i>Synergistes genomosp. C1</i>	AY278615
	<i>Synergistes sp. RMA 14551</i>	DQ412722
	<i>Synergistetes bacterium ADV897</i>	GQ258968
	<i>Synergistetes bacterium LBVCM1157</i>	GQ258969
20	<i>Synergistetes bacterium taxón oral 362</i>	GU410752
	<i>Synergistetes bacterium taxón oral D48</i>	GU430992
	<i>Syntrophococcus sucromutans</i>	NR_036869
	<i>Syntrophomonadaceae genomosp. P1</i>	AY341821
25	<i>Tannerella forsythia</i>	CP003191
	<i>Tannerella sp. 6_1_58FAA_CT1</i>	ACWX01000068
	<i>Tatlockia micdadei</i>	M36032
	<i>Tatumella ptyseos</i>	NR_025342
	<i>Tessaracoccus sp. taxón oral F04</i>	HM099640
30	<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
5	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860
	<i>Trabulsiella guamensis</i>	AY373830
	<i>Treponema denticola</i>	ADEC01000002
	<i>Treponema genomsp. P1</i>	AY341822
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<i>Treponema sp. taxón oral 239</i>	GU408738
	<i>Treponema sp. taxón oral 247</i>	GU408748

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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
25	<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
30	<i>Veillonella dispar</i>	ACIK02000021
	<i>Veillonella genomsp. P1 clon oral MB5_P17</i>	DQ003631
	<i>Veillonella montpellierensis</i>	AF473836
	<i>Veillonella parvula</i>	ADFU01000009
	<i>Veillonella sp. 3_1_44</i>	ADCV01000019

	<i>Veillonella</i> sp. 6_1_27	ADCW01000016
	<i>Veillonella</i> sp. ACP1	HQ616359
	<i>Veillonella</i> sp. AS16	HQ616365
	<i>Veillonella</i> sp. BS32b	HQ616368
5	<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
10	<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
15	<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
20	<i>Vibrio mimicus</i>	ADAF01000001
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AAWQ01000116
	<i>Vibrio</i> sp. RC341	ACZT01000024
	<i>Vibrio vulnificus</i>	AE016796
25	<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
30	<i>Weissella confusa</i>	NR_040816
	<i>Weissella hellenica</i>	AB680902

5	<i>Weissella kandleri</i>	NR_044659
	<i>Weissella koreensis</i>	NR_075058
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	ACKU01000017
	<i>Weissella sp. KLDS 7.0701</i>	EU600924
	<i>Wolinella succinogenes</i>	BX571657
10	<i>Xanthomonadaceae bacterium NML 03_0222</i>	EU313791
	<i>Xanthomonas campestris</i>	EF101975
	<i>Xanthomonas sp. kmd_489</i>	EU723184
	<i>Xenophilus aerolatus</i>	JN585329
	<i>Yersinia aldovae</i>	AJ871363
15	<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
20	<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
25	<i>Yokenella regensburgei</i>	AB273739
	<i>Zimmermannella bifida</i>	AB012592
	<i>Zymomonas mobilis</i>	NR_074274

Tabla 2: Bacterias oncófilas ilustrativas

30	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

5	<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
10	<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
15	<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
20	<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 epidermoide oral
	<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	Carcinoma epidermoide oral
25	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<i>Veillonella</i>	<i>dispar</i>	Carcinoma epidermoide oral
30			

5	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>stomatis</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<i>Gemella</i>	<i>Haemolysans</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	Carcinoma epidermoide oral
10	<i>Johnsonella</i>	<i>ignava</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguis</i>	Carcinoma epidermoide oral
15	<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	Carcinoma epidermoide oral
	<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
20	<i>Oribacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Catonella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
25	<i>Eubacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Dialister</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Veillonella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
30	<i>Anaeroglobus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico

5	<i>Megasphaera</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Atopppium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Solobacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Rothia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
10	<i>Actinomyces</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Fusobacterium</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
15	<i>Sneathia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Leptotrichia</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
20	<i>Prevotella</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Porphyromonas</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Campylobacter</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
25	<i>Haemophilus</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
	<i>Neisseria</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico
30	<i>TM7</i>	<i>sp</i>	Adenocarcinoma esofágico

5	<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
10	<i>Tessaracoccus</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma peritoneal
	<i>Acinetobacter</i>	<i>sp</i>	Pseudomixoma peritoneal
15	<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
20	<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
25	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	sangre
	<i>Streptococcus</i>	<i>gallolyticus</i>	Cáncer colorrectal
	<i>Campylobacter</i>	<i>showae CC57C</i>	Cáncer colorrectal
	<i>Leptotrichia</i>	<i>sp</i>	Cáncer colorrectal

En 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*,
5 *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*,
10 *Burkholderia*, *Dielma*, *Longicatena*, *Paraclostridium*, *Turicibacter*, y *Tyzzerella*.

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
15 consiste en *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Shigella* y *Staphylococcus*.

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*
20 *massiliensis*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Dielma fastidiosa*, *Longicatena caecimuris*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Tyzzerella nexilis*, *Hungatella effluvia*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae*,
25 *Klebsiella oxytoca* y *Veillonella tobetsuensis*.

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*
30 *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*,
5 *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*
10 *corporis*, *Prevotella dentasini*, *Prevotella enoeca*,
Prevotella falsenii, *Prevotella fusca*, *Prevotella*
heparinolytica, *Prevotella loescheii*, *Prevotella*
multisaccharivorax, *Prevotella nanceiensis*, *Prevotella*
oryzae, *Prevotella paludivivens*, *Prevotella pleuritidis*,
15 *Prevotella ruminicola*, *Prevotella saccharolytica*, *Prevotella*
scopos, *Prevotella shahii*, *Prevotella zoogloformans*, y
Prevotella veroralis.

En algunas realizaciones, las mEV (tales como smEV)
descritas en el presente documento son de una cepa de
20 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
25 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
30 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
15	Parabacteroides goldsteinii Cepa A		
20	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Cepa A	PTA-125097	
	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Cepa B		
25	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Cepa C		
	<i>Blautia Massiliensis</i> Cepa A	PTA-125134	
30	<i>Prevotella</i> Cepa B	Número de registro de	

		NRRL B 50329	
5	Prevotella Histicola Cepa A		
	Prevotella melanogenica Cepa A		
10	Blautia Cepa A	PTA-125346	
	Lactococcus lactis cremoris Cepa A	PTA-125368	
15	Lactococcus lactis cremoris Cepa B		
	Cepa de Ruminococcus gnavus	PTA-125706	
20	Cepa de Tyzzerella nexilis	PTA-125707	
25	Clostridium symbiosum S10- 19		>S10-19-contig CAGCGACGCCGCGTGAGTGAA GAAGTATTTCGGTATGTAAAG CTCTATCAGCAGGGAAGAAAA TGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGG GGCAAGCGTTATCCGGATTTA CTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTAAAGCAAGTCTGAAGT
30			

5			GAAAGCCCGCGGCTCAACTGC GGGACTGCTTTGGAACTGTT TAACTGGAGTGTCGGAGAGGT AAGTGGAATTCCTAGTGTAGC GGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGG CGACTTACTGGACGATAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATA 10 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGAATACTAGGTGTTGG GGAGCAAAGCTCTTCGGTGCC GTCGCAAACGCAGTAAGTATT CCACCTGGGGAGTACGTTCGC 15 AAGAATGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTC GAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAGGTCTTGACATCGATCCG 20 ACGGGGGAGTAACGTCCCCTT CCCTTCGGGGCGGAGAAGACA GGTGGTGCATGGTTGTCGTCA GCTCGTGTCTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGC 25 AACCTTATTCTAAGTAGCCA GCGGTTTCGGCCGGGAACCTTT GGGAGACTGCCAGGGATAACC TGGAGGAAGGTGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCTTAT 30 GATCTGGGCTACACACGTGCT ACAATGGCGTAAACAAAGAGA
---	--	--	---

5			AGCAAGACCGCGAGGTGGAGC AAATCTCAAAAATAACGTCTC AGTTCGGACTGCAGGCTGCAA CTCGCCTGCACGAAGCTGGAA TCGCTAGTAATCGCGAATCAG AATGTGCGGGTGAATACGTTC CCGGGTCTTGTACACACCGCC CGTCACACCATGGGAGTCAGT AACGCCCCGAAGTCAGTGACCC AACCGCAAGG
10			
15			>S6-202-contig GATGCAGCGACGCCGCGTGAG TGAAGAAGTATTTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAA GAAGCCCCGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGA TTTACTGGGTGTAAAGGGAGC GTAGACGGTAAAGCAAGTCTG AAGTGAAAGCCCGCGGCTCAA CTGCGGGACTGCTTTGGAAAC TGTTTAACTGGAGTGTCGGAG AGGTAAGTGGAATTCCTAGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATA TTAGGAGGAACACCAAGTGGCG AAGGCGACTTACTGGACGATA ACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTG
20		<i>Clostridium</i>	
25		<i>symbiosum</i> S6-	
30		202	

5			TTGGGGAGCAAAGCTCTTCGG TGCCGTCGCAAACGCAGTAAG TATTCCACCTGGGGAGTACGT TCGCAAGAATGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGACCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCGAAGCAACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATCGA TCCGACGGGGGAGTAACGTCC 10 CCTTCCCTTCGGGGCGGAGAA GACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGAGATG TTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCTTATTCTAAGTA 15 GCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAC TCTTGGGAGACTGCCAGGGAT AACCTGGAGGAAGGTGGGGAT GACGTCAAATCATCATGCCCC TTATGATCTGGGCTACACACG 20 TGCTACAATGGCGTAAACAAA GAGAAGCAAGACCGCGAGGTG GAGCAAATCTCAAAAATAACG TCTCAGTTCGGACTGCAGGCT GCAACTCGCCTGCACGAAGCT 25 GGAATCGCTAGTAATCGCGAA TCAGAATGTCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGTCTTGACACAC CGCCCGTCACACCATGGGAGT CAGTAACGCCCCGAAGTCAGTG 30 ACCCAACCGCAAGGAGGG
---	--	--	--

			>secuencia de consenso
5			TGACTAAGAAGCCCCGGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTT ATCCGGATTTACTGGGTGTAA AGGGAGCGTAGACGGTAAAGC AAGTCTGAAGTGAAAGCCCCG GGCTCAACTGCGGGACTGCTT
10			TGGAACTGTTTAACTGGAGT GTCGGAGAGGTAAGTGGAATT CCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACTTACTG
15	<i>Clostridium</i>		GACGATAACTGACGTTGAGGC
	<i>symbiosum</i> S10-		TCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
	257		AGGATTAGATAACCCTGGTAGT CCACGCCGTAAACGATGAATA CTAGGTGTTGGGGAGCAAAGC
20			TCTTCGGTGCCGTCGCAAACG CAGTAAGTATTCCACCTGGGG AGTACGTTGCAAGAATGAAA CTCAAAGGAATTGACGGGGAC
25			CCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGTTTAAATTCGAAGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGTCTTG ACATCGATCCGACGGGGGAGT
30			AACGTCCCCTTCCCTTCGGGG CGGAGAAGACAGGTGGTGAT GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTAAAGTCCC

5			GCAACGAGCGCAACCCTTATT CTAAGTAGCCAGCGGTTTCGGC CGGGAACCTTTGGGAGACTGC CAGGGATAACCTGGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAATCATC ATGCCCCCTTATGATCTGGGCT ACACACGTGCTACAATGGCGT AAACAAAGAGAAGCAAGACCG CGAGGTGGAGCAAATCTCAAA AATAACGTCTCAGTTCGGACT GCAGGCTGCAACTCGCCTGCA CGAAGCTGGAATCGCTAGTAA TCGCGAATCAGAATGTCGC GGTGAATACGTTCCC
10			
15			>10-552 secuencia de consensoCGTATTCACCGCG ACATTCTGATTTCGCGATTACT AGCGATTCCAGCTTCGTGCAG GCGAGTTGCAGCCTGCAGTCC GAACTGAGACGTTATTTTGA GATTTGCTCCACCTCGCGGTC TTGCTTCTCTTTGTTTACGCC ATTGTAGCACGTGTGTAGCCC AGATCATAAGGGGCATGATGA TTTGACGTCATCCCCACCTTC CTCCAGGTTATCCCTGGCAGT CTCCCAAGAGTTCCCGGCCGA ACCGCTGGCTACTTAGAATAA GGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC TTAACCCAACATCTCACGACA CGAGCTGACGACAACCATGCA
20			
25		<i>Clostridium symbiosum</i> S10- 552	
30			

5			CCACCTGTCTTCTCCGCCCCG AAGGGAAGGGGACGTTACTCC CCCGTCGGATCGATGTCAAGA CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT GCTTCGAATTAAACCACATGC TCCACCGCTTGTGCGGGTCCC CGTCAATTCCTTTGAGTTTCA TTCTTGCGAACGTACTCCCCA GGTGAATACTTACTGCGTTT GCGACGGCACCGAAGAGCTTT GCTCCCCAACACCTAGTATTC ATCGTTTACGGCGTGGACTAC CAGGGTATCTAATCCTGTTTG CTCCCCACGCTTTCGAGCCTC AACGTCAGTTATCGTCCAGTA AGTCGCCTTCGCCACTGGTGT TCCTCCTAATATCTACGCATT TCACCGCTACACTAGGAATTC CACTTACCTCTCCGACACTCC AGTTAAACAGTTTCCAAAGCA GTCCCGCAGTTGAGCCGCGGG CTTTCACTTCAGACTTGCTTT ACCGTCTACGCTCCCTTTACA CCCAGTAAATCCGGATAACGC TTGCCCCCTACGTATTACCGC GGCTGCTGGCACGTAGTTAGC CGGGGCTTCTTAGT
30	<i>Clostridium symbiosum</i> S10-551		>10-511_secuencia de consenso 2 lecturas de 10-511 ACTAAGAAGCCCCGGCTAACT

5			ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGGGGCAAGCGTTAT CCGGATTTACTGGGTGTAAAG GGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGG CTCAACTGCGGGACTGCTTTG GAAACTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAGTGGAATTCC TAGTGTAGCGGTGAAATGCGT 10AGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACTTACTGGA CGATAACTGACGTTGAGGCTC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCC 15ACGCCGTAAACGATGAATACT AGGTGTTGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGTCGCAAACGCA GTAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTGCAAGAATGAAACT 20CAAAGGAATTGACGGGGACCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTG GTTTAATTGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGTCTTGAC ATCGATCCGACGGGGGAGTAA 25CGTCCCCTTCCCTTCGGGGCG GAGAAGACAGGTGGTGCATGG TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTATTCT 30AAGTAGCCAGCGGTTGCGCCG GGA ACTCTTGGGAGACTGCCA
---	--	--	--

5			GGGATAACCTGGAGGAAGGTG GGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCCTTATGATCTGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGTAA ACAAAGAGAAGCAAGACCGCG AGGTGGAGCAAATCTCAAAAA TAACGTCTCAGTTCGGACTGC AGGCTGCAACTCGCCTGCACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATC GCGAATCAGAATGTCGCGGTG AATACGTTCCC
10			
15			>10- 530GAAAATGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGGGGCAAGCGTTATC CGGATTTACTGGGTGTAAAGG GAGCGTAGACGGTAAAGCAAG TCTGAAGTGAAAGCCCGCGGC TCAACTGCGGGACTGCTTTGG AAACTGTTTAACTGGAGTGTC GGAGAGGTAAGTGGAATTCCT AGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATTAGGAGGAACACCACT GGCGAAGGCGACTTACTGGAC GATAACTGACGTTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTTGGGGAGCAAAGCTCT TCGGTGCCGTCGCAAACGCAG
20			
25			
30			

Clostridium
symbiosum S10-
530

5			TAAGTATTCCACCTGGGGAGT ACGTTTCGCAAGAATGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCTGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACA TCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG A
10			>10-533_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10-
15			533GAACGTATTCACCGCGAC ATTCTGATTCGCGATTACTAG CGATTCCAGCTTCGTGCAGGC GAGTTGCAGCCTGCAGTCCGA ACTGAGACGTTATTTTGAAGA TTTGCTCCACCTCGCGGTCTT GCTTCTCTTTGTTTACGCCAT TGTAGCACGTGTGTAGCCCAG ATCATAAGGGGCATGATGATT TGACGTCATCCCCACCTTCCT CCAGGTTATCCCTGGCAGTCT CCCAAGAGTTCCCGGCCGAAC CGCTGGCTACTTAGAATAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTT AACCCAACATCTCACGACACG AGCTGACGACAACCATGCACC ACCTGTCTTCTCCGCCCCGAA GGGAAGGGGACGTTACTCCCC CGTCGGATCGATGTCAAGACC
20	<i>Clostridium</i> <i>ymbiosum</i> S10- 533		
25			
30			

5			TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC TTCGAATTAAACCACATGCTC CACCGCTTGTGCGGGTCCCCG TCAATTCCTTTGAGTTTCATT CTTGCGAACGTACTCCCCAGG TGGAATACTTACTGCGTTTGC GACGGCACCGAAGAGCTTTGC TCCCCAACACCTAGTATTCAT CGTTTACGGCGTGGACTACCA GGGTATCTAATCCTGTTTGCT CCCCACGCTTTCGAGCCTCAA CGTCAGTTATCGTCCAGTAAG TCGCCTTCGCCACTGGTGTTT CTCCTAATATCTACGCATTTT ACCGCTACACTAGGAATTCCA CTTACCTCTCCGACACTCCAG TTAAACAGTTTCCAAAGCAGT CCCGCAGTTGAGCCGCGGGCT TTCACCTCAGACTTGCTTTAC CGTCTACGCTCCCTTTACACC CAGTAAATCCGGATAACGCTT GCCCCCTACGTATTACCGCGG CTGCTGGCACGTAGTTAGCCG GGGCTTCTTAG
25			>10-537_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10-
30	<i>Clostridium symbiosum</i> S10- 537		537ACTAAGAAGCCCCGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTA

5			AAGGGAGCGTAGACGGTAAAG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCG CGGCTCAACTGCGGGACTGCT TTGGAAACTGTTTAACTGGAG TGTCGGAGAGGTAAGTGGAAT TCCTAGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATTAGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACTTACT GGACGATAACTGACGTTGAGG 10CTCGAAAGCGTGCGGAGCAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAAT ACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAAC 15GCAGTAAGTATTCCACCTGGG GAGTACGTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCAT GTGGTTTAATTCTGAAGCAACG 20CGAAGAACCTTACCAGGTCTT GACATCGATCCGACGGGGGAG TAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGAGAAGACAGGTGGTGCA TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC 25GTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTAT TCTAAGTAGCCAGCGGTTCCGG CCGGGAACCTTTGGGAGACTG CCAGGGATAACCTGGAGGAAG 30GTGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCCCTTATGATCTGGGC
---	--	--	--

5			TACACACGTGCTACAATGGCG TAAACAAAGAGAAGCAAGACC GCGAGGTGGAGCAAATCTCAA AAATAACGTCTCAGTTCGGAC TGCAGGCTGCAACTCGCCTGC ACGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGCGAATCAGAATGTCGCG GTGAATACGTT
10			>10- 544ATGACGGTACCTGACTAA GAAGCCCCGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGA TTTACTGGGTGTAAAGGGAGC 15 GTAGACGGTAAAGCAAGTCTG AAGTGAAAGCCCGCGGCTCAA CTGCGGGACTGCTTTGGAAAC TGTTTAACTGGAGTGTCGGAG AGGTAAGTGAATTCCTAGTG 20 TAGCGGTGAAATGCGTAGATA TTAGGAGGAACACCAGTGGCG AAGGCGACTTACTGGACGATA ACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTA 25 GATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTG TTGGGGAGCAAAGCTCTTCGG TGCCGTCGCAAACGCAGTAAG TATTCCACCTGGGGAGTACGT 30 TCGCAAGAATGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGACCCGCACA

Clostridium
ymbiosum S10-
544

5			AGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCGAAGCAACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATCGA TCCGACGGGGGAGTAACGTCC CCTTCCCTTCGGGGCGGAGAA GACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGAGATG TTGGGTAAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCTTATTCTAAGTA GCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAC TCTTGGGAGACTGCCAGGGAT AACCTG
10			
15			>10- 547GGGAAGAAAATGACGGTA CCTGACTAAGAAGCCCCGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGGGCAAGCG TTATCCGGATTTACTGGGTGT AAAGGGAGCGTAGACGGTAAA GCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGC TTTGAAACTGTTTAACTGGA GTGTCGGAGAGGTAAGTGGA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGACTTAC TGGACGATAACTGACGTTGAG GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA ACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAA TACTAGGTGTTGGGGAGCAAA
20			
25			
30			
	<i>Clostridium</i> <i>symbiosum</i> S10- 547		

5			GCTCTTCGGTGCCGTCGCAAA CGCAGTAAGTATTCCACCTGG GGAGTACGTTTCGCAAGAATGA AACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTCTGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCT TGACATCGATCCGACGGGGGA GTAACGTCCCCTTCCCTTCGG GGCGGAGAAGACAGGTGGTGC ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTAAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTTA TTCTAAGTAGCCAGCGGTTTCG GCCGGGAATC
10			
15			
20			>10-548_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10-
25		<i>Clostridium symbiosum</i> S10- 548	548AAGAAGCCCCGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGGGGCAAGCGTTAT CCGGATTTACTGGGTGTAAAG GGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGG CTCAACTGCGGGACTGCTTTG GAAACTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAGTGGAATTCC TAGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATTAGGAGGAACACCAG TGCGGAAGGCGACTTACTGGA CGATAACTGACGTTGAGGCTC
30			

5			GAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCC ACGCCGTAAACGATGAATACT AGGTGTTGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGTCGCAAACGCA GTAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTGCAAGAATGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGACCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTG 10 GTTTAATTGCAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGTCTTGAC ATCGATCCGACGGGGGAGTAA CGTCCCCTTCCCTTCGGGGCG GAGAAGACAGGTGGTGCATGG 15 TTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG AGATGTTGGGTAAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTATTCT AAGTAGCCAGCGGTTTCGGCCG GGAACTCTTGGGAGACTGCCA 20 GGGATAACCTGGAGGAAGGTG GGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGATCTGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGTAA ACAAAGAGAAGCAAGACCGCG 25 AGGTGGAGCAAATCTCAAAAA TAACGTCTCAGTTCGGACTION AGGCTGCAACTCGCCTGCACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATC GCGAATCAGAATGTCGCGGTG 30 AATACGTT
---	--	--	---

5			>S7-203-357F
			TGATGCAGCGACGCCGCGTGA
			GTGAAGAAGTATTTTCGGTATG
			TAAAGCTCTATCAGCAGGGAA
			GAAAATGACGGTACCTGACTA
			AGAAGCCCCGGCTAACTACGT
			GCCAGCAGCCGCGGTAATACG
			TAGGGGGCAAGCGTTATCCGG
10			ATTTACTGGGTGTAAAGGGAG
			CGTAGACGGTAAAGCAAGTCT
			GAAGTGAAAGCCCCGCGGCTCA
			ACTGCGGGACTGCTTTGGAAA
			CTGTTTAACTGGAGTGTTCGGA
			GAGGTAAGTGGAATTCCTAGT
15			GTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
	<i>Clostridium</i> sp.		ATTAGGAGGAACACCAGTGGC
	S7-203		GAAGGCGACTTACTGGACGAT
			AACTGACGTTGAGGCTCGAAA
			GCGTGGGGAGCAAACAGGATT
20			AGATACCCTGGTAGTCCACGC
			CGTAAACGATGAATACTAGGT
			GTTGGGGAGCAAAGCTCTTCG
			GTGCCGTCGCAAACGCAGTAA
			GTATTCCACCTGGGGAGTACG
25			TTCGCAAGAATGAAACTCAAA
			GGAATTGACGGGGACCCGCAC
			AAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
			AATTCGAAGCAACGCGAAGAA
			CCTTACCAGGTCTTGACATCG
30			ATCCGACGGGGGAGTAACGTC
			CCCTTCCCTTCGGGGCGGAGA

5			AGACAGGTGGTGCATGGTTGT CGTCAGCTCGTGTCTGAGAT GTTGGGTTAAGTCCCGCAACG AGCGCAACCCTTATTCTAAGT AGCCAGCGGTTCTGGCCGGGAA CTCTTGGGAGACTGCCAGGGA TAACCTGGAGGAAGGTGGGGA TGACGTCAAATCATCATGCCC CT
10			GCCGCGTGAGTGAAGAAGTAT TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAAAATGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC 15GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGTAA AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCC CGCGGCTCAACTGCGGGACTG 20CTTTGGAACTGTTTAACTGG AGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTA 25CTGGACGATAACTGACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA ATACTAGGTGTTGGGGAGCAA 30AGCTCTTCGGTGCCGTCGCAA ACGCAGTAAGTATTCCACCTG

Clostridium sp.
36A7-1014

5			GGGAGTACGTTGCGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTCGAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCGATCCGACGGGGG AGTAACGTCCCCTTCCCTTCG GGGCGGAGAAGACAGGTGGTG CATGGTTGTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCTT ATTCTAAGTAGCCAGCGGTTC
10			
15			>4-31-contig GCCTGATGCAGCGACGCCGCG TGAGTGAAGAAGTATTTCCGT ATGTAAAGCTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGA CTAAGAAGCCCCGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGGGGCAAGCGTTATC CGGATTTACTGGGTGTAAAGG GAGCGTAGACGGTAAAGCAAG TCTGAAGTGAAAGCCCGCGGC TCAACTGCGGGACTGCTTTGG AAACTGTTTAACTGGAGTGTC GGAGAGGTAAGTGGAATTCCT AGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATTAGGAGGAACACCAGT GGCGAAGGCGACTTACTGGAC GATAACTGACGTTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
20			
25		<i>Clostridium</i> sp. S4-31	
30			

5			ATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTTGGGGAGCAAAGCTCT TCGGTGCCGTGCGAAACGCAG TAAGTATTCCACCTGGGGAGT ACGTTTCGCAAGAATGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCTGAAGCAACGCGAA 10GAACCTTACCAGGTCTTGACA TCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG AGAAGACAGGTGGTGCATGGT TGTCGTCAGCTCGTGTCTGA 15GATGTTGGGTAAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTA AGTAGCCAGCGGTTCTGGCCGG GAACTCTTGGGAGACTGCCAG GGATAACCTGGAGGAAGGTGG 20GGATGACGTCAAATCATCATG CCCCTTATGATCTGGGCTACA CACGTGCTACAATGGCGTAAA CAAAGAGAAGCAAGACCGCGA GGTGGAGCAAATCTCAAAAAT 25AACGTCTCAGTTCGGACTGCA GGCTGCAACTCGCCTGCACGA AGCTGGAATCGCTAGTAATCG CGAATCAGAATGTCGCGGTGA ATACGTTCCCGGGTCTTGTA 30ACACCGCCCGTACACCATGG GAGTCAGTAACGCCCGAAGTC
---	--	--	---

			AGTGACCCAACCGCAAGGAGG GAGCTG
5			>210-133-Contig TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAAAATGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG 10 TAAAGGGAGCGTAGACGGTAA AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCC CGCGGCTCAACTGCGGGACTG CTTTGGAAACTGTTTAACTGG AGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA 15 ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTA CTGGACGATAACTGACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA 20 AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA ATACTAGGTGTTGGGGAGCAA AGCTCTTCGGTGCCGTCGCAA ACGCAGTAAGTATTCCACCTG 25 GGGAGTACGTTGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTGAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAGGTC 30 TTGACATCGATCCGACGGGGG AGTAACGTCCCCTTCCCTTCG

Clostridium sp.
S210-133

5			GGGCGGAGAAGACAGGTGGTG CATGGTTGTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCTT ATTCTAAGTAGCCAGCGGTTC GGCCGGGAACCTCTTGGGAGAC TGCCAGGGATAACCTGGAGGA AGGTGGGGGATGACGTCAAAT CATCATGCCCCCTTATGATCTG GGCTACACACGTGCTACAATG GCGTAAACAAAGAGAAGCAAG ACCGCGAGGTGGAGCAAATCT CAAAAATAACGTCTCAGTTTCG GACTGCAGGCTGCAACTCGCC TGCACGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGAATCAGAATGTC GCGGTGAATACGTTCCCGGGT CTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGGAGTCAGTAACGCC CGAAGTCAGTGACCCA
20			
25	<i>Clostridium</i> <i>ymbiosum</i> S10- 534		>10-534_Secuencia de consenso 2 lecturas de 10- 534ACTAAGAAGCCCCGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTA AAGGGAGCGTAGACGGTAAAG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCG CGGCTCAACTGCGGGACTGCT TTGGAAACTGTTTAACTGGAG
30			

5			TGTCGGAGAGGTAAAGTGGAA TTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGACTTAC TGGACGATAACTGACGTTGAG GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA ACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAA TACTAGGTGTTGGGGAGCAAA 10 GCTCTTCGGTGCCGTCGCAAA CGCAGTAAGTATTCCACCTGG GGAGTACGTTTCGCAAGAATGA AACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCA 15 TGTGGTTTAATTCTGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCT TGACATCGATCCGACGGGGGA GTAACGTCCCCCTCCCTTCGG GGCGGAGAAGACAGGTGGTGC 20 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTAAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTTA TTCTAAGTAGCCAGCGGTTCG GCCGGGAACCTCTTGGGAGACT 25 GCCAGGGATAACCTGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAATCA TCATGCCCCCTTATGATCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGC GTAAACAAAGAGAAGCAAGAC 30 CGCGAGGTGGAGCAAATCTCA AAAATAACGTCTCAGTTCGGA
---	--	--	--

			CTGCAGGCTGCAACTCGCCTG CACGAAGCTGGAATCGCTAGT AATCGCGAATCAGAATGTTCG GGTGAATACGTTCC
5			>4-44-contig CTGATGCAGCGACGCCGCGTG AGTGAAGAAGTAGTTTCGGTA TGTAAGCTCTATCAGCAGGG AAGAAAATGACGGTACCTGAC 10 TAAGAAGCCCCGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGGGGCAAGCGTTATCC GGATTTACTGGGTGTAAAGGG AGCGTAGACGGTAAAGCAAGT 15 CTGAAGTGAAAGCCCCGCGGCT CAACTGCGGGACTGCTTTGGA AACTGTTTAACTGGAGTGTCG GAGAGGTAAGTGGAATTCCTA GTGTAGCGGTGAAATGCGTAG 20 ATATTAGGAGGAACACCAGTG GCGAAGGCGACTTACTGGACG ATAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCAC 25 GCCGTAAACGATGAATACTAG GTGTTGGGGAGCAAAGCTCTT CGGTGCCGTCGCAAACGCAGT AAGTATTCCACCTGGGGAGTA CGTTCGCAAGAATGAACTCA 30 AAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGGT

Clostridium sp.
S4-44

5			TTAATTCTGAAGCAACGCGAAG AACCTTACCAGGTCTTGACAT CGATCCGACGGGGGAGTAACG TCCCCTTCCCTTCGGGGCGGA GAAGACAGGTGGTGCATGGTT GTCGTCAGCTCGTGTCTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCTTATTCTAA GTAGCCAGCGGTTCGGCCGGG 10 AACTCTTGGGAGACTGCCAGG GATAACCTGGAGGAAGGTGGG GGATGACGTCAAATCATCATG CCCCTTATGATCTGGGCTACA CACGTGCTACAATGGCGTAAA 15 CAAAGAGAAGCAAGACCGCGA GGTGGAGCAAATCTCAAAAAT AACGTCTCAGTTCGGACTGCA GGCTGCAACTCGCCTGCACGA AGCTGGAATCGCTAGTAATCG 20 CGAATCAGAATGTCGCGGTGA ATACGTTCCCGGGTCTTGTAC ACACCGCCCGTCACACCATGG GAGTCAGTAACGCCGAAGTC AGTGACCCAACCGCAAGGAGG 25 GAGCTGCCGA
30	<i>Hungatella</i> <i>hathewayi</i> o [<i>Clostridium</i>] <i>hathewayi</i> 34D2- 1004		GAAGTATTTCGGTATGTAAAG CTCTATCAGCAGGGAAGAAAA TGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGG GGCAAGCGTTATCCGGATTTA

5			CTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTTTAGCAAGTCTGAAGT GAAAGCCCGGGGCTCAACCCC GGTACTGCTTTGGAACTGTT AGACTTGAGTGCAGGAGAGGT AAGTGGAATTCCTAGTGTAGC GGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGG CGGCTTACTGGACTGTAAGT ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGAATACTAGGTGTCGG GGGGCAAAGCCCTTCGGTGCC GCCGCAAACGCAATAAGTATT CCACCTGGGGAGTACGTTTCGC AAGAATGAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTC GAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATC
25	<i>Hungatella</i> <i>hathewayi</i> o [<i>Clostridium</i>] <i>hathewayi</i> 34H6- 1004		TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAAAATGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGTTT AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCC CGGGGCTCAACCCCGGTACTG CTTTGGAACTGTTAGACTTG
30			

5			AGTGCAGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTA CTGGACTGTAAGTACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA ATACTAGGTGTCGGGGGGCAA AGCCCTTCGGTGCCGCCGCAA ACGCAATAAGTATTCCACCTG GGGAGTACGTTGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTGCAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAAGTC TTGACATCCCA
10			
15			
20			GCCGCGTGAGTGAAGAAGTAT TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAAAATGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGTTA AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCC CGGGGCTCAACCCCGGTACTG CTTTGGAAACTGTTTGACTTG AGTGCAGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAAC
25		<i>Hungatella</i> <i>effluvia</i> 36B10- 1014	
30			

5			ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTA CTGGACTGTAAGTACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA ATACTAGGTGTCGGGGGACAA AGTCCTTCGGTGCCGCCGCTA ACGCAATAAGTATTCCACCTG GGGAGTACGTTGCAAGAATG 10 AAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTCGAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAAGTC TTGACATCCCATTGAAAATCA 15 TTTAACCG
20			GCCGCGTGAGTGAAGAAGTAT TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAAAATGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGTTA 25 AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCC CGGGGCTCAACCCCGGTACTG CTTTGGAACTGTTTGAAGTTG AGTGCAGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCCTAGATATTAGGAGGAAC 30 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTA CTGGACTGTAAGTACGTTGA

Hungatella
effluvia 36C4-
1014

5			GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA ATACTAGGTGTCTGGGGGACAA AGTCCTTCGGTGCCGCCGCTA ACGCAATAAGTATTCCACCTG GGGAGTACGTTGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTGCAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAAGTC TTGACATCCCATTGAAAA
10			
15			GCCGCGTGAGTGAAGAAGTAT TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAAAATGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGTTA AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCC CGGGGCTCAACCCCGGTACTG CTTTGGAAACTGTTTGACTTG AGTGCAGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTA CTGGACTGTAAGTACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA
20			
25			
30			
		<i>Hungatella</i> <i>effluvi</i> 36F7- 1014	

5			ATACTAGGTGTCGGGGGACAA AGTCCTTCGGTGCCGCCGCTA ACGCAATAAGTATTCACCTG GGGAGTACGTTGCAAGAATG AAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTCGAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAAGTC TTGACATCCCATTGAA
10			GACGGTACCTGACTAAGAAGC CCCGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGGG GCAAGCGTTATCCGATTAC TGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGCGAAGCAAGTCTGGAGTG AAAACCCAGGGCTCAACCCTG GGACTGCTTTGGAACTGTTT TGCTAGAGTGTCGGAGAGGTA AGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGC GGCTTACTGGACGATAACTGA CGTTGAGGCTCGAAAGCGTGG GGAGCAAACAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCACGCCGTAAA CGATGAATGCTAGGTGTTGGG GGG
15			
20	<i>Lachnospiraceae</i> sp ○ [<i>Clostridium</i>] <i>Citroniae</i> 39A7- 1014		
25			
30	<i>Lachnospiraceae</i> sp ○ [<i>Clostridium</i>]		GACGGTACCTGACTAAGAAGC CCCGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGGG GCAAGCGTTATCCGATTAC

5	<i>citroniae</i> 39A8-1014		TGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGCGAAGCAAGTCTGGAGTG AAAACCCAGGGCTCAACCCTG GGACTGCTTTGGAACTGTTT TGCTAGAGTGTCGGAGAGGTA AGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGC GGCTTACTGGACGATAACTGA CGTTGAGGCTCGAAAGCGTGG GGAGCAAACAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCACGCCGTAAA CGATGAATGCTAGGTGTTGGG GGG
10			
15			GCCGCGTGAGTGAAGAAGTAT TTCGGTATGTAAAGCTCTATC AGCAGGGAAGAACTGACGGT ACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGC GTTATCCGGATTTACTGGGTG TAAAGGGAGCGTAGACGGCGA AGCAAGTCTGGAGTGAAAACC CAGGGCTCAACCCTGGGACTG CTTTGGAACTGTTTTGCTAG AGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTA CTGGACGATAACTGACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA
20	<i>Lachnospiraceae</i> sp o [<i>Clostridium</i>]		
25	<i>citroniae</i> 36A6-1014		
30			

			AACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGA ATGCTAGGTGTTGGGGGGCAA AGCCCTTC
5			GAAGTATTTTCGGTATGTAAAC TTCTATCAGCAGGGAAGAAAA TGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGG 10 GGCAAGCGTTATCCGGATTTA CTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGCAGTGCAAGTCTGAAGT GAAAGCCCGGGGCTCAACCCC GGGACTGCTTTGGAACTGTG 15 CAGCTAGAGTGTCTGGAGAGGC AAGCGGAATTCTAGTGTAGC GGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGG CGGCTTGCTGGACGATGACTG 20 ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGACTACTAGGTGTCTGG GGAGCAAAGCTCTTCGGTGCC 25 GCAGCCAACGCAATAAGTAGT CCACCTGGGGAGTACGTTCGC AAGAATGAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTC 30 GAAGCAACGCGAAGAACCTTA

Lachnospiraceae
sp ○
[*Clostridium*]
sp 36C9-1014

			CCTGCTCTTGACATCCCTCTG ACCG
5			>S10-121-contig GATGCAGCGACGCCGCGTGAG TGAAGAAGTATTTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAA GAAGCCCCGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGT 10 AGGGGGCAAGCGTTATCCGGA TTTACTGGGTGTAAAGGGAGC GTAGACGGCGAAGCAAGTCTG AAGTGAAAACCCAGGGCTCAA CCCTGGGACTGCTTTGGAAAC 15 TGTTTTGCTAGAGTGTCGGAG AGGTAAGTGGAATTCCTAGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATA TTAGGAGGAACACCAGTGGCG AAGGCGGCTTACTGGACGATA 20 ACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATGCTAGGTG TTGGGGGGCAAAGCCCTTCGG 25 TGCCGTCGCAAACGCAGTAAG CATTCCACCTGGGGAGTACGT TCGCAAGAATGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGACCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTTA 30 ATTCGAAGCAACGCGAAGAAC CTTACCAAGTCTTGACATCCT

[*Clostridium*]
bolteae S10-21

5			CTTGACCGGCGTGTAACGGCG CCTTCCCTTCGGGGCAGGAGA GACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG TTGGGTAAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCTTATCCTTAGTA GCCAGCAGGTAAAGCTGGGCA CTCTAGGGAGACTGCCAGGGA TAACCTGGAGGAAGGTGGGGA TGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGATTTGGGCTACACAC GTGCTACAATGGCGTAAACAA AGGGAAGCAAGACAGTGATGT GGAGCAAATCCCAAAAATAAC GTCCCAGTTCGGACTGTAGTC TGCAACCCGACTACACGAAGC TGGAATCGCTAGTAATCGCGA ATCAGAATGTCGCGGTGAATA CGTTCCCGGGTCTTGTACACA CCGCCCCGTACACCATGGGAG TCAGCAACGCCCGAAGTCAGT GACCCAACCTCGCAAGAGAGGG
25	<i>Ruminococcus gnavus</i> Cepa A	PTA-126695	CCTTAGCGGTTGGGTCACTGA CTTCGGGCGTTACTGACTCCC ATGGTGTGACGGGCGGTGTGT ACAAGACCCGGAACGTATTC ACCGCGACATTCTGATTGCGG ATTACTAGCGATTCCAGCTTC ATGTAGTCGAGTTGCAGACTA CAATCCGAACCTGAGACGTTAT TTTTGGGATTTGCTCCCCCTC
30			

5			GCGGGCTCGCTTCCCTTTGTT TACGCCATTGTAGCACGTGTG TAGCCCTGGTCATAAGGGGCA TGATGATTTGACGTCATCCCC ACCTTCCTCCAGGTTATCCCT GGCAGTCTCTCTAGAGTGCCC ATCCTAAATGCTGGCTACTAA AGATAGGGGTTGCGCTCGTTG CGGGACTTAACCCAACATCTC 10ACGACACGAGCTGACGACAAC CATGCACCACCTGTCTCCTCT GTCCCGAAGGAAAGCTCCGAT TAAAGAGCGGTCAGAGGGATG TCAAGACCAGGTAAGGTTCTT 15CGCGTTGCTTTCGAATTAAACC ACATGCTCCACCGCTTGTGCG GGTCCCCGTCAATTCCTTTGA GTTTCATTCTTGCGAACGTAC TCCCCAGGTGGAATACTTATT 20GCGTTTGCTGCGGCACCGAAT GGCTTTGCCACCCGACACCTA GTATTCATCGTTTACGGCGTG GACTACCAGGGTATCTAATCC TGTTTGCTCCCCACGCTTTCG 25AGCCTCAACGTCAGTCATCGT CCAGAAAGCCGCCTTCGCCAC TGGTGTTCCCTCCTAATATCTA CGCATTTACCGCTACACTAG GAATTCCGCTTTCCTCTCCGA 30CACTCTAGCCTGACAGTTCCA AATGCAGT
---	--	--	---

5			> T. nexilis S10-231
			secuencia de consenso
			GGCTAAATACGTGCCAGCAGC
			CGCGGTAATACGTATGGTGCA
			AGCGTTATCCGGATTTACTGG
			GTGTAAAGGGAGCGTAGACGG
			TTGTGTAAGTCTGATGTGAAA
			GCCCGGGGCTCAACCCCGGGA
10			CTGCATTGGAACTATGTAAC
			TAGAGTGTCGGAGAGGTAAGC
			GGAATTCCTAGTGTAGCGGTG
			AAATGCGTAGATATTAGGAGG
			AACACCAGTGGCGAAGGCGGC
			TTACTGGACGATCACTGACGT
15			TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGA
			GCAAACAGGATTAGATACCTT
			GGTAGTCCACGCCGTAAACGA
			TGACTACTAGGTGTCGGGGAG
			CAAAGCTCTTCGGTGCCGCAG
20			CAAACGCAATAAGTAGTCCAC
			CTGGGGAGTACGTTGCAAGA
			ATGAAACTCAAAGGAATTGAC
			GGGGACCCGCACAAGCGGTGG
			AGCATGTGGTTTAATTCGAAG
25			CAACGCGAAGAACCTTACCTG
			GTCTTGACATCCCTCTGACCG
			CTCTTTAATCGGAGTTTTCTT
			TCGGGACAGAGGAGACAGGTG
			GTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
30			GTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
			AGTCCCGCAACGAGCGCAACC

Tyzzzerella
nexilis Cepa A

5			CCTATCTTCAGTAGCCAGCAT TTAAGGTGGGCACTCTGGAGA GACTGCCAGGGATAACCTGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAA ATCATCATGCCCCCTTATGACC AGGGCTACACACGTGCTACAA TGGCGTAAACAAAGGGAAGCG AACCTGTGAGGGGAAGCAAAT CTCAAAAATAACGTCTCAGTT CGGATTGTAGTCTGCAACTCG ACTACATGAAGCTGGAATCGC TAGTAATCGCGAATCAGCATG TCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTC
10			
15			>S11-19-357F AGCAACGCCGCGTGAGTGATG ACGGCCTTCGGGTTGTAAAGC TCTGTTAATCGGGACGAAAGG CCTTCTTGCGAATAGTTAGAA GGATTGACGGTACCGGAATAG AAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGCGCGC GCAGGCGGATCGGTCAGTCTG TCTTAAAAGTTCGGGGCTTAA CCCCGTGAGGGGATGGAAACT GCTGATCTAGAGTATCGGAGA GGAAAGTGGAATTCCTAGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAAGAACACCAGTGGCGA
20			
25		<i>Veillonella tobetsuensis</i>	
30			

5			AGGCGACTTTCTGGACGAAAA CTGACGCTGAGGCGCGAAAGC CAGGGGAGCGAACGGGATTAG ATACCCCGGTAGTCCTGGCCG TAAACGATGGGTACTAGGTGT AGGAGGTATCGACCCCTTCTG TGCCGGAGTTAACGCAATAAG TACCCCGCCTGGGGAGTACGA CCGCAAGGTTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGGCCCCGCACA AGCGGTGGAGTATGTGGTTTA ATTCGACGCAACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATTGA TGGACAGAACTAGAGATAGTT CCTCTTCTTCGGAAGCCAGAA AACAGGTGGTGCACGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG TTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCCTATCTTATGTT GCCAGCACTTCGGGTGGGAAC TCAT
25			>S14-201 Contig GAGTGATGACGGCCTTCGGGT TGTAAGCTCTGTTAATCGGG ACGAAAGGCCTTCTTGCGAAT AGTGAGAAGGATTGACGGTAC CGGAATAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGT TGTCCGGAATTATTGGGCGTA AAGCGCGCGCAGGCGGATAGG
30	<i>Veillonella parvula</i>		

5			TCAGTCTGTCTTAAAAGTTCG GGGCTTAACCCCGTGATGGGA TGGAACTGCCAATCTAGAGT ATCGGAGAGGAAAGTGGAATT CCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAAGAACC AGTGGCGAAGGCGACTTTCTG GACGAAAAGTACGCTGAGGC GCGAAAGCCAGGGGAGCGAAC 10 GGGATTAGATACCCCGGTAGT CCTGGCCGTAAACGATGGGTA CTAGGTGTAGGAGGTATCGAC CCCTTCTGTGCCGGAGTTAAC GCAATAAGTACCCCGCCTGGG 15 GAGTACGACCGCAAGGTTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGG CCCGCACAAGCGGTGGAGTAT GTGGTTTAATTCGACGCAACG CGAAGAACCCTTACCAGGTCTT 20 GACATTGATGGACAGAACCAG AGATGGTTCCTCTTCTTCGGA AGCCAGAAAACAGGTGGTGCA CGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTAAAGTCC 25 CGCAACGAGCGCAACCCCTAT CTTATGTTGCCAGCACTTTGG GTGGGGACTCATGAGAGACTG CCGCAGACAATGCGGAGGAAG GCGGGGATGACGTCAAATCAT 30 CATGCCCCCTTATGACCTGGGC TACACACGTACTACAATGGGA
---	--	--	--

5			GTTAATAGACGGAAGCGAGAT CGCGAGATGGAGCAAACCCGA GAAACACTCTCTCAGTTCGGA TCGTAGGCTGCAACTCGCCTA CGTGAAGTCGGAATCGCTAGT AATCGCAGGTCAGCATACTGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCT TGTACACACCGCCCGTCACAC CACGAAAGTCGGAAGTGCCCA AAGCCGGTGGGGTAACCTTC
10			
15			>S14-205 Contig GAGTGATGACGGCCTTCGGGT TGTAAGCTCTGTTAATCGGG ACGAAAGGCCTTCTTGCGAAT AGTGAGAAGGATTGACGGTAC CGGAATAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGT TGTCCGGAATTATTGGGCGTA AAGCGCGCGCAGGCGGATAGG TCAGTCTGTCTTAAAAGTTTCG GGGCTTAACCCCGTGATGGGA TGGAACTGCCAATCTAGAGT ATCGGAGAGGAAAGTGGAATT CCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAAGAACACC AGTGGCGAAGGCGACTTTCTG GACGAAAAC TGACGCTGAGGC GCGAAAGCCAGGGGAGCGAAC GGGATTAGATAACCCCGGTAGT
20			
25			
30			
	<i>Veillonella parvula</i>		

5			CCTGGCCGTAAACGATGGGTA CTAGGTGTAGGAGGTATCGAC CCCTTCTGTGCCGGAGTTAAC GCAATAAGTACCCCGCCTGGG GAGTACGACCGCAAGGTTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGG CCCGCACAAGCGGTGGAGTAT GTGGTTTAATTGACGCAACG CGAAGAACCTTACCAGGTCTT 10GACATTGATGGACAGAACCAG AGATGGTTCCTCTTCTTCGGA AGCCAGAAAACAGGTGGTGCA CGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTAAAGTCC 15CGCAACGAGCGCAACCCCTAT CTTATGTTGCCAGCACTTTGG GTGGGGACTCATGAGAGACTG CCGCAGACAATGCGGAGGAAG GCGGGGATGACGTCAAATCAT 20CATGCCCCCTTATGACCTGGGC TACACACGTACTACAATGGGA GTTAATAGACGGAAGCGAGAT CGCGAGATGGAGCAAACCCGA GAAACACTCTCTCAGTTTCGGA 25TCGTAGGCTGCAACTCGCCTA CGTGAAGTCGGAATCGCTAGT AATCGCAGGTCAGCATACTGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCT TGTACACACCGCCCGTCACAC 30CACGAAAGTCGGAAGTGCCCA AAGCCGGTG
---	--	--	--

5		Veillonella atypica Cepa A	PTA-125709	
		Veillonella atypica Cepa B	PTA-125711	
		Veillonella dispar		
		Veillonella parvula Cepa A	PTA-125691	
10		Veillonella parvula Cepa B	PTA-125711	
		Veillonella tobetsuensis Cepa A	PTA-125708	
15		Veillonella tobetsuensis Cepa B		
20				ATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
				GAAGAAGGTCTTCGGATCGTA
				AAACTCTGTTGTTAGAGAAGA
				ACACGAGTGAGAGTAACTGTT
25				CATTCGATGACGGTATCTAAC
				CAGCAAGTCACGGCTAACTAC
				GTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
				CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
30				GGATTTATTGGGCGTAAAGGG
				AACGCAGGCGGTCTTTTAAGT
				CTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
				TAACCGGAGTAGTGCATTGGA
				AACTGGAAGACTTGAGTGCAG
				AAGAGGAGAGTGGAACCTCCAT
				GTGTAGCGGTGAAATGCGTAG

5			ATATATGGAAGAACACCAGTG GCGAAAGCGGCTCTCTGGTCT GTAAGTACGCTGAGGTTCTGA AAGCGTGGGTAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAATGCTAG GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT TCAGTGCCGCAGCTAACGCAA TAAGCATTCGCGCTGGGGAGT 10ACGACCGCAAGGTTGAACTC AAAGGAATTGACGGGGGCCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACA 15TCCTTTGACCACCTAAGAGAT TAGGCTTTCCCTTCGGGGACA AAGTGACAGGTGGTGCATGGC TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA GATGTTGGGTAAAGTCCCGCA 20ACGAGCGCAACCCTTGTTGTC AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG CACTCTGGCGAGACTGCCGGT GACAAACCGGAGGAAGGTGGG GACGACGTCAAGTCATCATGC 25CCCTTATGACCTGGGCTACAC ACGTGCTACAATGGACGGTAC AACGAGTCGCGAGACCGCGAG GTTTAGCTAATCTCTTAAAGC CGTTCTCAGTTCGGATTGTAG 30GCTGCAACTCGCCTACATGAA GTCGGAATCGCTAGTAATCGC
---	--	--	---

5			GAATCAGCATGTTCGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTCACACCATGAG AGTTTGTAACACCCAAAGCCG GTGGGGTAACCGCAAGGAGCC AGCCG
10			CCGCGTGATTGAAGAAGGCCT NTCGGGTTGTAAAGATCTTTA ATTCGGGACGAAAAATGACGG TACCGAAAGAATAAGCTCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGAGCAAG CGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGCGCGCAGGCGGGC 15 TGGCAAGTTGGAAGTGAAATC TAGGGGCTTAACCCCTAAACT GCTTTCAAACTGCTGGTCTT GAGTGATGGAGAGGCAGGCGG AATTCCGTGTGTAGCGGTGAA 20 ATGCGTAGATATACGGAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGGCCT GCTGGACATTAAGTACGCTG AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGG 25 TAGTCCACGCCGTAAACGATG GATACTAGGTGTGGGAGGTAT TGACCCCTTCCGTGCCGCAGT TAACACAATAAGTATCCCACC 30 TGGGGAGTACGGCCGCAAGGT TGAAACTCAAAGGAATTGACG GGGGCCCGCACAAGCAGTGGA

Agathobaculum
Cepa A

5			GTATGTGGTTTAAATTCGAAGC AACGCGAAGAACCTTACCAGG CCTTGACATCCCGATGACCGG TCTAGAGATAGACCTTCTCTT CGGAGCATCGGTGACAGGTGG TGCATGGTTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCC TTACGGTTAGTTGATACGCAA GATCACTCTAGCCGGACTGCC GTTGACAAAACGGAGGAAGGT GGGGACGACGTCAAATCATCA TGCCCCCTTATGGCCTGGGCTA CACACGTACTACAATGGCAGT CATAACAGAGGGAAGCAAAGCT GTGAGGCGGAGCAAATCCCTA AAAGCTGTCCCAGTTCAGATT GCAGGCTGCAACCCGCCTGCA TGAAGTCGGAATTGCTAGTAA TCGCGGATCAGCATGCCGCGG TGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACACCA TGAGAGCCGTCAATACCCGAA GTCCGTAGCCTAACCGCAAG
25			GAATTACTGGGCGTAAAGGGT GCGTAGGTGGTTTTTTAAGTC AGAAGTGAAAGGCTACGGCTC AACCGTAGTAAGCTTTTGAAA CTAGAGAACTTGAGTGCAGGA GAGGAGAGTAGAATTCCTAGT GTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
30		<i>Paraclostridium benzoelyticum</i> Cepa A	

5

10

15

20

25

30

			ATTAGGAGGAATACCAGTAGC GAAGGCGGCTCTCTGGACTGT AACTGACACTGAGGCACGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATAACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGAGTACTAGGT GTCGGGGGTACCCCCCTCGG TGCCGCAGCTAACGCATTAAG TACTCCGCCTGGGAAGTACGC TCGCAAGAGTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGACCCGCACA AGTAGCGGAGCATGTGGTTTA ATTCGAAGCAACGCGAAGAAC CTTACCTAAGCTTGACATCCC ACTGACCTCTCCCTAATCGGA GATTTCCCTTCGGGGACAGTG GTGACAGGTGGTGCATGGTTG TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA TGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCCTTGCCCTTAG TTGCCAGCATTAAAGTTGGGCA CTCTAGAGGGACTGCCGAGGA TAACTCGGAGGAAGGTGGGGA TGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGCTTAGGGCTACACAC GTGCTACAATGGGTGGTACAG AGGGTTGCCAAGCCGCGAGGT GGAGCTAATCCCTTAAAGCCA TTCTCAGTTCGGATTGTAGGC TGAAACTCGCCTACATGAAGC TGGAGTTACTAGTAATCGCAG
--	--	--	--

5			ATCAGAATGCTGCGGTGAATG CGTTCCCGGGTCTTGTACACA CCGCCCCGTACACCATGGAAG TTGGGGGCGCCCGAAGCCGGT TAGCTAACCTTTTAGGAAGCG GCCGT
10			ATGGCTAGAGTGTGACGGTAC CTTATGAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGTGGCGAGCGT TATCCGGAATTATTGGGCGTA AAGAGCGCGCAGGTGGTTGAT TAAGTCTGATGTGAAAGCCCA CGGCTTAACCGTGGAGGGTCA 15 TTGGAAACTGGTCAACTTGAG TGCAGAAGAGGGAAGTGGAAT TCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGAGATATGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGCTTCCT 20 GGTCTGTAAGTACACTGAGG CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAGT GCTAAGTGTTGGGGGTGGAAC 25 CTCAGTGCTGAAGTTAACGCA TTAAGCACTCCGCCTGGGGAG TACGGTCGCAAGACTGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGACCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTG 30 GTTTAATTGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGTCTTGAC

Turicibacter
sanguinis Cepa
A

5			ATACCAGTGACCGTCCTAGAG ATAGGATTTTCCCT TCGGGGACAATGGATACAGGT GGTGCATGGTTGTCGTCAGCT CGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCCTGTGCTTAGTTGCCAGCA TTCAGTTGGGGACTCTAACGA GACTGCCAGTGACAACTGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAA ATCATCATGCCCCCTTATGACC TGGGCTACACACGTGCTACAA TGGTTGGTACAAAGAGAAGCG AAGCGGTGACGTGGAGCAAAC CTCATAAAGCCAATCTCAGTT CGGATTGTAGGCTGCAACTCG CCTACATGAAGTTGGAATCGC TAGTAATCGCGAATCAGCATG TCGCGGTGAATACGTT
20	Burkholderia pseudomallei		
25	Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae		
	Klebsiella oxytoca Cepa A		
30	Megasphaera Sp. Cepa A	PTA-126770	TATCAATTCGAGTGGCAAACG GGTGAGTAACGCGTAAGCAAC

5			CTGCCCTTCAGATGGGGACAA CAGCTGGAAACGGCTGCTAAT ACCGAATACGTTCTTTCCGCC GCATGACGGGATGAAGAAAGG GAGGCCTTCGGGCTTTCGCTG GAGGAGGGGCTTGCGTCTGAT TAGCTAGTTGGAGGGGTAACG GCCCACCAAGGCGACGATCAG TAGCCGGTCTGAGAGGATGAA 10 CGGCCACATTGGGACTGAGAC ACGGCCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTGGGGAATCTTCC GCAATGGACGAAAGTCTGACG GAGCAACGCCGCGTGAACGAT 15 GACGGCCTTCGGGTGTAAAG TTCTGTTATATGGGACGAACA GGATAGCGGTCAATACCCGTT ATCCCTGACGGTACCGTAAGA GAAAGCCACGGCTAACTACGT 20 GCCAGCAGCCGCGTAATACG TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG AATTATTGGGCGTAAAGGGCG CGCAGGCGGCATCGCAAGTCG GTCTTAAAAGTGCGGGGCTTA 25 ACCCCGTGAGGGGACCGAAAC TGTGAAGCTCGAGTGTCGGAG AGGAAAGCGGAATTCCTAGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATA TTAGGAGGAACACCAGTGGCG 30 AAAGCGGCTTTCTGGACGACA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAG
---	--	--	--

5			CCAGGGGAGCAAACGGGATTA GATACCCCGGTAGTCCTGGCC GTAAACGATGGATACTAGGTG TAGGAGGTATCGACTCCTTCT GTGCCGGAGTTAACGCAATAA GTATCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTGAAACTCAA GGAATTGACGGGGGCCCGCAC AAGCGGTGGAGTATGTGGTTT
10			AATTCGACGCAACGCGAAGAA CCTTACCAAGCCTTGACATTG ATTGCTACGGAAAGAGATTTC CGGTTCTTCTTCGGAAGACAA GAAAACAGGTGGTGCACGGCT
15			GTCGTCAGCTCGTGTCTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCCTATCTTCT GTTGCCAGCACTAAGGGTGGG GACTCAGAAGAGACTGCCGCA
20			GACAATGCGGAGGAAGGCGGG GATGACGTCAAGTCATCATGC CCCTTATGGCTTGGGCTACAC ACGTACTACAATGGCTCTTAA
25			TAGAGGGAAGCGAAGGAGCGA TCCGGAGCAAACCCCAAAAAC AGAGTCCCAGTTCGGATTGCA GGCTGCAACTCGCCTGCATGA
30			AGCAGGAATCGCTAGTAATCG CAGGTCAGCATACTGCGGTGA ATACGTTCCCGGGCCTTGTA ACACCGCCCGTCACACCACGA

5			AAGTCATTACACCCGAAGCC GGTGAGGCAACCGCAAGGAAC CAGCCGTCGAAGGTGGGGGCG ATGATTGGGGTGAAGTCGTAA CAAGGTAGCCGTATCGGAAGG TGCGGCTGGATCACCTCCTTT
10			ATGGAGAGTTTGATCCTGGCT CAGGACGAACGCTGGCGGCGT GCTTAACACATGCAAGTCGAA CGAGAAGAGATGAGAAGCTTG CTTCTTATCAATTCGAGTGGC AAACGGGTGAGTAACGCGTAA GCAACCTGCCCTTCAGATGGG GACAACAGCTGGAAACGGCTG CTAATACCGAATACGTTCTTT CCGCCGCATGACGGGATGAAG AAAGGGAGGCCTTCGGGCTTT CGCTGGAGGAGGGGCTTGCGT CTGATTAGCTAGTTGGAGGGG TAACGGCCCACCAAGGCGACG ATCAGTAGCCGGTCTGAGAGG ATGAACGGCCACATTGGGACT GAGACACGGCCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT CTTCCGCAATGGACGAAAGTC TGACGGAGCAACGCCGCGTGA ACGATGACGGCCTTCGGGTTG TAAAGTTCTGTTATATGGGAC GAACAGGATAGCGGTCAATAC CCGTTATCCCTGACGGTACCG
15			
20	Megasphaera Sp. Cepa B		
25			
30			

5			TAAGAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATACGTAGGTGGCAAGCGTTG TCCGGAATTATTGGGCGTAAA GGGCGCGCAGGCGGCATCGCA AGTCGGTCTTAAAAGTGCGGG GCTTAACCCCGTGAGGGGACC GAAACTGTGAAGCTCGAGTGT CGGAGAGGAAAGCGGAATTCC 10 TAGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAAGCGGCTTTCTGGA CGACAACTGACGCTGAGGCGC GAAAGCCAGGGGAGCAAACGG 15 GATTAGATACCCCGGTAGTCC TGGCCGTAAACGATGGATACT AGGTGTAGGAGGTATCGACTC CTTCTGTGCCGGAGTTAACGC AATAAGTATCCCGCCTGGGGA 20 GTACGGCCGCAAGGCTGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCC CGCACAAGCGGTGGAGTATGT GGTTTAATTCGACGCAACGCG AAGAACCTTACCAAGCCTTGA 25 CATTGATTGCTACGGAAAGAG ATTTCCGGTTCTTCTTCGGAA GACAAGAAAACAGGTGGTGCA CGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTTAAGTCC 30 CGCAACGAGCGCAACCCCTAT CTTCTGTTGCCAGCACTAAGG
---	--	--	--

5			GTGGGGACTCAGAAGAGACTG CCGCAGACAATGCGGAGGAAG GCGGGGATGACGTCAAGTCAT CATGCCCCCTTATGGCTTGGGC TACACACGTACTACAATGGCT CTTAATAGAGGGAAGCGAAGG AGCGATCCGGAGCAAACCCCA AAAACAGAGTCCCAGTTCGGA TTGCAGGCTGCAACTCGCCTG
10			CATGAAGCAGGAATCGCTAGT AATCGCAGGTCAGCATACTGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCT TGTACACACCGCCCGTCACAC CACGAAAGTCATTACACCCG
15			AAGCCGGTGAGGCAACCGCAA GGAACCAGCCGTCGAAGGTGG GGGCGATGATTGGGGTGAAGT CGTAACAAGGTAGCCGTATCG GAAGGTGCGGCTGGATCACCT
20			CCTTT
25	Selenomonas felix		GTTGGTGAGGTAACGGCTCAC CAAGGCGACGATCAGTAGCCG GTCTGAGAGGATGAACGGCCA CATTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTGGGGAATCTTCCGCAATG GGCGCAAGCCTGACGGAGCAA CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
30			CTTCGGATCGTAAAGCTCTGT TGACGGGGACGAACGTGCGGA

5			GTGCGAATAGCGCTTTGTAAT GACGGTACCTGTCGAGGAAGC CACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCGAGCGTTGTCCGGAATCAT TGGGCGTAAAGGGAGCGCAGG CGGGCCGGTAAGTCTTACTTA AAAGTGCGGGGCTCAACCCCG TGATGGGAGAGAACTATCGG 10TCTTGAGTACAGGAGAGGAAA GCGGAATTCCCAGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGATATTGGGA AGAACACCAGTGGCGAAGGCG GCTTTCTGGACTGCAACTGAC 15GCTGAGGCTCGAAAGCCAGGG GAGCGAACGGGATTAGATACC CCGGTAGTCCTGGCCGTAAAC GATGGATACTAGGTGTGGGAG GTATCGACCCCTACCGTGCCG 20GAGTTAACGCAATAAGTATCC CGCCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGG TGGAGTATGTGGTTTAATTCTG 25AAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAGGCCTTGACATTGACTGAA AGCACTAGAGATAGTGCCCTC TCTTCGGAGACAGGAAAACAG GTGGTGCAATGGCTGTCGTCAG 30CTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
---	--	--	---

5			ACCCCTGTTCTTTGTTGCCAT CAGGTAAAGCTGGGCACTCAA AGGAGACTGCCGCGGAGAACG CGGAGGAAGGCGGGGATGACG TCAAGTCATCATGCCCCTTAT GGCCTGGGCTACACACGTACT ACAATGGAACGGACAGAGAGC AGCGAACCCGCGAGGGCAAGC GAACCTCAAAAACCGTTTCCC AGTTCGGATTGCAGGCTGCAA CCCGCCTGCATGAAGTCGGAA TCGCTAGTAATCGCAGGTCAG CATACTGCGGTGAATACGTTC CCGGGTCTTGTACACACCGCC CGTCACACCACGGAAGTCATT CACACCCGAAGCCGGCGCAGC CGTCTAAGGTGGGGAAGGTGA CTGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTAGCCGTATCGGAAGGTGCG GCTGGATCACCTCCTTT
10			
15			
20			
25	Enterococcus gallinarum Cepa A		CTGACCGAGCACGCCGCGTGA GTGAAGAAGTTTTTCGGATCG TAAAACTCTGTTGTTAGAGAA GAACAAGGATGAGAGTAAAC GTTTCATCCCTTGACGGTATCT AACCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATACGTAGGTGGCAAGCGTTG TCCGGATTTATTGGGCGTAAA GCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA
30			

5			AGTCTGATGTGAAAGCCCCCG GCTCAACCGGGGAGGGTCATT GGAAACTGGGAGACTTGAGTG CAGAAGAGGAGAGTGGAATTC CATGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATATGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG TCTGTAACTGACGCTGAGGCT CGAAAGCGTGGGGAGCGAACA 10GGATTAGATAACCCTGGTAGTC CACGCCGTAAACGATGAGTGC TAAGTGTTGGAGGGTTTCCGC CCTTCAGTGCTGCAGCAAACG CATTAAAGCACTCCGCCTGGGG 15AGTACGACCGCAAGGTTGAAA CTCAAAGGAATTGACGGGGGC CCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTGCAAGCAACGC GAAGAACCCTTACCAGGTCTTG 20ACATCCTTTGACCACTCTAGA GATAGAGCTTCCCCTTCGGGG GCAAAGTGACAGGTGGTGCA GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTAAAGTCCC 25GCAACGAGCGCAACCCTTATT GTTAGTTGCCATCATTTAGTT GGGCACTCTAGCGAGACTGCC GGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATCA 30TGCCCCCTTATGACCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGGAAG
---	--	--	--

5			TACAACGAGTTGCGAAGTCGC GAGGCTAAGCTAATCTCTTAA AGCTTCTCTCAGTTCGGATTG TAGGCTGCAACTCGCCTACAT GAAGCCGGAATCGCTAGTAAT CGCGGATCAGCACGCCGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGT ACACACCGCCCGTCACACCAC GAGAGTTTGTAACACCCGAAG TCGGTGAGGTAACCTTT
10			
15			CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT CGGATCGTAAACTCTGTTGT TAGAGAAGAACAAGGATGAGA GTAGAACGTTTCATCCCTTGAC GGTATCTAACCAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGTGGCA AGCGTTGTCCGGATTTATTGG GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG TTTCTTAAGTCTGATGTGAAA GCCCCCGGCTCAACCGGGGAG GGTCATTGGAACTGGGAGAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT GGAATTCCATGTGTAGCGGTG AAATGCGTAGATATATGGAGG AACACCAGTGGCGAAGGCGGC TCTCTGGTCTGTAAC TGACGC TGAGGCTCGAAAGCGTG GGA GCGAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAAACGA
20	Enterococcus Gallinarum Cepa B		
25			
30			

5			TGAGTGCTAAGTGTGGAGGG TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA GCAAACGCATTAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGACCGCAAG GTTGAAACTCAAAGGAATTGA CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTGAA GCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCCTTTGACCA 10CTCTAGAGATAGAGCTTCCCC TTCGGGGGCAAAGTGACAGGT GGTGCAATGGTTGTCGTCAGCT CGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAAC 15CCTTATTGTTAGTTGCCATCA TTTAGTTGGGCACTCTAGCGA GACTGCCGGTGACAAACCGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAA ATCATCATGCCCCCTTATGACC 20TGGGCTACACACGTGCTACAA TGGGAAGTACAACGAGTTGCG AAGTCGCGAGGCTAAGCTAAT CTCTTAAAGCTTCTCTCAGTT CGGATTGTAGGCTGCAACTCG 25CCTACATGAAGCCGGAATCGC TAGTAATCGCGGATCAGCACG CCGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTC ACACCACGAGAGTTTGTAACA 30CCCGAAGTCGGTGAGGTAACC TTTTNGGAGCCAGCCGC
---	--	--	--

5

Fournierella massiliensis	PTA-126694		Fournierella massiliensis
Harryflintia acetispora	PTA-126696		Harryflintia acetispora

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

- o *Akkermansia*, *Christensenella*, *Blautia*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides*,
10 *Parabacteroides* o *Erysipelatoclostridium*
- o *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris*, *Blautia wexlerae*, *Eubacterium faecium*, *Eubacterium contortum*, *Eubacterium rectale*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus villorum*, *Enterococcus gallinarum*;
15 *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*,
o *Bifidobacterium breve*
- o *BCG*, *Parabacteroides*, *Blautia*, *Veillonella*, *Lactobacillus salivarius*, *Agathobaculum*, *Ruminococcus*
20 *gnavus*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Turicibacter sanguinus*, *Burkholderia*, *Klebsiella quasipneumoniae* ssp
similpneumoniae, *Klebsiella oxytoca*, *Tyzzerella nexilis*, o *Neisseria*
- o *Blautia hydrogenotrophica*
- 25 o *Blautia stercoris*
- o *Blautia wexlerae*
- o *Enterococcus gallinarum*
- o *Enterococcus faecium*
- o *Bifidobacterium bifidum*
- 30 o *Bifidobacterium breve*
- o *Bifidobacterium longum*

- o *Roseburia hominis*
- o *Bacteroides thetaiotaomicron*
- o *Bacteroides coprocola*
- o *Erysipelatoclostridium ramosum*
- 5 o *Megasphaera, incluida Megasphaera massiliensis*
- o *Parabacteroides distasonis*
- o *Eubacterium contortum*
- o *Eubacterium hallii*
- o *Intestimonas butyriciproducens*
- 10 o *Streptococcus australis*
- o *Eubacterium eligens*
- o *Faecalibacterium prausnitzii*
- o *Anaerostipes caccae*
- o *Erysipelotrichaceae*
- 15 o *Rikenellaceae*
- o *Lactococcus, Prevotella, Bifidobacterium, Veillonella*
- o *Lactococcus lactis cremoris*
- o *Prevotella histicola*
- 20 o *Bifidobacterium animalis lactis*
- o *Veillonella parvula*

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).

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).

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.

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

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.

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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)

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

10 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
15 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.

20 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
25 realizaciones, las bacterias se cultivan en una densidad óptica elevada y luces centrifugan para sedimentar las
30

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.

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.

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 μ m 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.

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
5 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.

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
10 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
15 proteinasa K.

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)).
20 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.
25 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.

30 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
5 filtración (p. ej., columnas Amicon Ultra), diálisis o ultracentrifugación (200,000 x g, ≥3 horas, 4 °C) y resuspensión.

En algunas realizaciones, la esterilidad de las preparaciones de smEV puede confirmarse colocando en placas
10 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.

En algunas realizaciones, las smEV seleccionadas se aíslan y se enriquecen mediante cromatografía y restos de
15 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
20 técnica.

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

En algunas realizaciones, se liofilizan las smEV.

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

En algunas realizaciones, las smEV se irradian con UV.

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

30 En algunas realizaciones, las smEV se tratan con ácido.

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

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.

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	Respuesta al estrés
	Cambio de temperatura de TA hasta 37 °C	Simula una infección
	Cambio de temperatura de 37 °C a 40 °C	Infección febril
ROS		
	Plumbagina	Respuesta al estrés oxidativo

5		Hidroperóxido de cumeno	Respuesta al estrés oxidativo
		Peróxido de hidrógeno	Respuesta al estrés oxidativo
	Antibióticos		
		Ciprofloxacino	Respuesta SOS bacteriana
		Gentamicina	Síntesis de proteínas
10		Polimixina B	Membrana externa
		D-cilcloserina	Pared celular
	Osmolito		
		NaCl	Estrés osmótico
15	Estrés de iones metálicos		
		Quelación de hierro	Niveles de hierro
		EDTA	Elimina cationes divalentes
		Hemina baja	Niveles de hierro
20	Aditivos o eliminación de medios		
		Lactato	Crecimiento
		Falta de aminoácidos	Estrés
		Hexadecano	Estrés
25		Glucosa	Crecimiento
		Bicarbonato de sodio	Inducción de ToxT
		PQS	Vesiculador (a partir de bacterias)
30			

5		Diaminas + DFMO	Anclaje de membranas (solamente <i>Negativicutes</i>)
		Nutrientes elevados	Crecimiento potenciado
		Nutrientes bajos	
10	Otros mecanismos		
		Oxígeno	Estrés de oxígeno en anaerobios
		Sin cisteína	Estrés de oxígeno en anaerobios
15		Inducción de biopelícula o floculación	
		Crecimiento diaúxico	
		Fago	
		Urea	

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

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
5 composición de smEV comprende una smEV y/o una combinación de smEV descritas en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden las mEV (tales como smEV)
10 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
15 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
20 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
25 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).

En algunas realizaciones, para cuantificar las cantidades de las mEV (tales como smEV) y/o bacterias
30 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 μm .

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

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.

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.

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.

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.

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.

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).

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

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).

5 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
10 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
15 los mismos.

 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,
20 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
25 que tienen la misma actividad o similar a la de la vitamina y metabolitos de la vitamina.

 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un excipiente. Los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados incluyen un agente tampón, un
30 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.

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

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

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un aglutinante como un excipiente. Los ejemplos no
15 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,
20 polietilenglicol, polioles, sacáridos, oligosacáridos, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un lubricante como un excipiente. Los ejemplos no
limitantes de lubricantes adecuados incluyen estearato de
25 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.

30 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.

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.

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; 5 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; 10 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 15 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 20 y jaleas.

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 25 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, 30 etc., pero los animales no se limitan a los mismos.

Formas farmacéuticas

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).

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

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).

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.

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, trietilcitrate, talco, ácido cítrico anhidro e hidróxido de sodio y un recubrimiento externo puede comprender, por ejemplo, EUDRAGIT L30 D-55, trietilcitrate 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.

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.

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

10 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.

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.

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.

5 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.

10 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
15 800 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
20 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,
25 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
30

totales. Se pueden determinar las proteínas totales, p. ej., mediante un ensayo de Bradford.

Irradiación con radiación gamma

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.

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

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.

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).

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).

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
5 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
10 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,
15 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
20 los antibióticos de enedina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gammaI y calicheamicina omegall1; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de
25 enediina relacionados con cromoproteínas, aclacinomisinas, actinomicina, autrarnicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinis, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo
30 morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina,

esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, 5 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-mercaptopurina, tiamiprina, 10 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; 15 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; 20 elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; 25 losoxantrona; ácido podofílinico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; triclofecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y 30 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.

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 Gardail, 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.

5 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
10 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
15 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,
20 MSB-0010718C (avelumab), AUR-012 y STI-A1010.

 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento en combinación con uno o más agentes terapéuticos
25 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
30 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).

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
5 (L), BCR-ABL proteína de fusión b3a2, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), CASP-10 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
15 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-
20 DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralfa2, carboxil esterasa intestinal, K-ras, Calicreína 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KMHN-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,
25 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
30 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, Triosafofato 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, 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, KMHN-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.

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, linfotóxina-alfa ("TNF alfa"), factor de necrosis tumoral, linfotóxina-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 insulina 1 ("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
5 ("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
10 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"),
15 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
20 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"),
25 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
30 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
5 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"),
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
5 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"),
10 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
15 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
20 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
25 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"), Cathepsina L, CD200, CD97,
30 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
5 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
10 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-
15 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,
20 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"), cistaina C, Decorina ("DCN"),
proteína relacionada a Dickkopf 3 ("Dkk-3"), proteína
25 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
30 granulocitos ("GCSF 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
5 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-
10 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").

En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra
15 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®),
20 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
25 (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
30 (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®).

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®).

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

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™).

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®).

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.

5 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
10 compuestos a base de rutenio, derivados de ferroceno, compuestos a base de titanio, y compuestos a base de galio.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un resto radiactivo que comprende un radionúclido. Los radionúclidos ilustrativos incluyen, pero
15 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-
20 67, Sc-47, Pt-195m, Ce-141, I-131, Tb-161, As-77, Pt-197, Sm-153, Gd-159, Tm-173, Pr-143, Au-198, Tm-170, Re-186, Ag-111, Pd-109, Ga-73, Dy-165, Pm-149, Sn-123, Sr-89, Ho-166, P-32, Re-188, Pr-142, Ir-194, In-114m/In-114 e Y-90.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra
25 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
30 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).

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.

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.

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.

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.

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

5 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.

10 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, 15 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* 20 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.

25 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 30 la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas.

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.

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.

Los macrólidos incluyen, pero sin limitación, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espiromicina. 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.

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.

Los nitrofuranos incluyen, pero sin limitación, furazolidona y nitrofurantoína.

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

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.

10 Las combinaciones de penicilina incluyen, pero sin limitación, amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactama, piperacilina/tazobactam y ticarcilina/clavulanato.

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.

Las quinolonas y fluoroquinolonas incluyen, pero sin limitación, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, gemifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, ácido nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, sparsaxina, 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.

Las sulfonamidas incluyen, pero sin limitación, mafenida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfadimetoxina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfonamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim-
5 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.

10 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
15 la síntesis de proteínas bacterianas.

Los compuestos antimicobacterianos incluyen, pero sin limitación, clofazimina, dapsona, capreomicina, cicloserina, etambutol, etionamida, isoniazid, pirazinamida, rifampicina, rifabutina, rifapentina, y estreptomina.

20 Los antibióticos adecuados también incluyen arsfenamina, cloranfenicol, fosfomicina, ácido fusídico, metronidazol, mupirocina, platensimicina, quinupristina/dalfopristina, tigeciclina, tinidazol, trimetoprima amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam,
25 anfomicina-ristocetina, azitromicina, bacitracina, buforina II, carbomicina, cecropina Pl, claritromicina, eritromicinas, furazolidona, ácido fusídico, fusidato de Na, gramicidina, imipenem, indolicidina, josamicina, magainan II, metronidazol, nitroimidazoles, mikamicina, mutacina B-Ny266, mutacina B-JH1 140, mutacina J-T8, nisina, nisina A,
30 novobiocina, oleandomicina, ostreogricina,

piperacilina/tazobactam, pristinamicina, ramoplanina, ranalexina, reuterina, rifaximina, rosamicina, rosaramicina, espectinomicina, espiamicina, estafilomicina, estreptogramina, estreptogramina A, sinergistina, 5 tauroolidina, teicoplanina, telitromicina, ticarcilina/ácido clavulánico, triacetiloleandomicina, tilosina, tirocidina, tirotricina, vancomicina, vemamicina, y virginiamicina.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente inmunosupresor, un DMARD, un fármaco 10 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, 15 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, 20 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, 25 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, 30 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),
5 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,
10 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,
15 dexametasona, cortisol, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, betametasona, triamcinolona, beclometasoma, fludrocortisona, desoxicorticosterona, aldosterona, Doxiciclina, vancomicina, pioglitazona, SBI-087, SCIO-469, Cura-100, Oncoxina + Viusid, TwHF,
20 Metoxsaleno, Vitamina D - ergocalciferol, Milnaciprano, Paclitaxel, rosig tazone, Tacrolimus (Prograf®), RADOOL, rapamune, rapamicina, fostamatinib, Fentanilo, XOMA 052, Fostamatinib disódico, rosig tazone, Curcumina (Longvida™), Rosuvastatina, Maraviroc, ramipnl, Milnaciprán,
25 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,
30 antagonistas de CTLA4, antagonistas de IL-8, antagonistas de IL-21, antagonistas de IL-22, antagonistas de integrinas

(Tysarabri® (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).

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, cromolín sódico, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos 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

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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 el sujeto y, preferentemente, el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad para la que se está tratando el sujeto.

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.

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.

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.

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

5 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
10 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
15 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.

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
20 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
25 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,
30 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, 5 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, 10 palpitaciones del corazón, acidez estomacal, hematoma, cistitis hemorrágica, hepatotoxicidad, hiperamilasemia, hipercalcemia, hipercloremia, hiperglucemia, hipercalcemia, hiperlipasemia, hipermagnesemia, hipernatremia, hiperfosfatemia, hiperpigmentación, hipertrigliceridemia, 15 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, 20 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, eritrodístesia palmo- 25 plantar, pancitopenia, pericarditis, neuropatía periférica, faringitis, fotofobia, fotosensibilidad, neumonía, neumonitis, proteinuria, embolia pulmonar, fibrosis pulmonar, toxicidad pulmonar, erupción cutánea, latidos cardíacos rápidos, sangrado rectal, inquietud, rinitis, 30 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 xerostomia. En general, la toxicidad es aceptable si los beneficios para el sujeto logrados a través de la terapia
5 superan los acontecimientos adversos experimentados por el sujeto debido a la terapia.

Trastornos inmunitarios

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento se refieren
10 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
15 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.

Los métodos descritos en el presente documento pueden
20 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),
25 así como cualquier sujeto con una mayor probabilidad de adquirir una enfermedad o trastorno.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, como una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento
30 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,
5 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
10 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;
15 un suplemento, alimento, o bebida para mejorar las funciones
inmunes; o un reactivo para suprimir la proliferación o
función de células inmunes.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en
el presente documento son útiles para el tratamiento de la
20 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
25 reproductivo y otras inflamaciones, como se discute a
continuación.

Los trastornos inmunitarios del sistema
musculoesquelético incluyen, pero sin limitación, las
afecciones que afectan a las articulaciones esqueléticas,
30 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).

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.

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.

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.

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.

Los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden usarse para tratar las

5 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

10 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

15 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

20 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,

25 sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa, y vitíligo.

Los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades de hipersensibilidad mediada por linfocitos T que tienen un

30 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).

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
5 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
10 infecciosos (por ejemplo, septicemia).

Trastornos metabólicos

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se refieren al tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno
15 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, hiperlipoproteinemia, hiperlipidemia,
20 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,
25 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
30 esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y esteatohepatitis no alcohólica (ENA).

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.

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.

25 Cáncer

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, 5 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; 10 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 15 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 20 branquiololoalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromófobo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifíilico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante 25 no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; 30 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 granulosas, 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;
5 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;
10 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;
15 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.

20 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
25 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
30 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,
5 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
10 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
15 mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica
mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli,
leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, y
leucemia promielocítica.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones
20 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
25 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
30 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
5 cuerpo, carcinoma cribiforme, carcinoma en cuirasse,
carcinoma cutaneum, carcinoma cilíndrico, carcinoma de
células cilíndricas, carcinoma de conducto, carcinoma durum,
carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma
epiennioide, adenoides epiteliales de carcinoma, carcinoma
10 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
15 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 vellosa,
20 carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de
células granulosa, carcinoma de matriz capilar, carcinoma
hematoide, carcinoma hepatocelular, Carcinoma de células de
Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipernefroide,
carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma
25 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
30 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
5 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.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones
10 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
15 en una sustancia fibrilar, heterogénea u homogénea. Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfossarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma endometrial, sarcoma del estroma, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico,
20 sarcoma de células gigantes, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioide, sarcoma de cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin,
25 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
30 parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectaltico.

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.

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.

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

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

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

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

En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer de vejiga.

5 En algunas realizaciones, el cáncer comprende cáncer gastroesofágico.

Las categorías particulares de tumores que pueden tratarse usando los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen trastornos
10 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
15 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,
20 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
25 pulmonares, carcinoma de células basales, adenocarcinoma (bien diferenciado, moderadamente diferenciado, poco diferenciado o indiferenciado), carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma de células renales, hipernefoma, adenocarcinoma hipernefroide, carcinoma de
30 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.

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.

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

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, precopatía 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.

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

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>).

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.

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.

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)

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.

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.

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.

5 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
10 disbiosis y uno o más de sus efectos en el recipiente. La disbiosis puede ser una disbiosis del tracto gastrointestinal o disbiosis distal.

 En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tratar una disbiosis
15 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.

20 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
25 barrera epitelial intestinal.

 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
30 inmunitarias del hospedador.

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
5 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.

10 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
15 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.

20 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
25 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).

30 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
5 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).

10 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
15 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
20 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
25 y se describen en el presente documento.

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
30 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.

5 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

10 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
15 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
20 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
25 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
30 electroporación), transducción de fagos, evolución dirigida, CRISPR/Cas9, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la bacteria se modifica mediante evolución dirigida. En algunas realizaciones, la evolución dirigida comprende 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

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).

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

 Opcionalmente, las pmEV se pueden separar de otros componentes bacterianos y residuos usando métodos conocidos
30 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

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 a -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 inmunoadfinidad. 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.

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.

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

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.

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.

Como alternativa, 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.

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.

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

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.

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.

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 inoculan oralmente por sonda gástrica con aproximadamente 7.0×10^9 a 3.0×10^{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 mm^3 . Se toman muestras de sangre semanalmente y se realiza una necropsia completa en condiciones estériles al terminar el protocolo.

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-
5 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
10 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
15 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).

20 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
25 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.

30 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.

5 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
10 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
15 los pulmones.

 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
20 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
25 encuentran 200-250 nódulos pulmonares en los pulmones de los ratones del grupo de control (es decir, sonda de PBS).

 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
30 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.

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.

10 *Secuenciación de ARN para determinar el mecanismo de acción*

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.

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

30 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.

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.

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).

Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1x10⁴ y 5x10⁹ 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 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 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)

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
5 (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).

Se puede inducir DTH en una variedad de cepas de ratas
10 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
15 infiltración de células presentadoras de antígeno (APC),
eosinófilos, linfocitos T CD4+ activados y linfocitos Th2
que expresan citocinas.

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

La dexametasona, un corticoesteroide, es un
antiinflamatorio conocido que mejora las reacciones de DTH
25 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
30 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.

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).

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 1×10^{12} :1 (pmEV: células bacterianas).

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.

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

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.

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 (6.0×10^7), medias (6.0×10^9) y elevadas (6.0×10^{11}).

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**).

5 Según lo determinado por el grosor de la oreja, las pmEV *P. histicola* fueron eficaces al suprimir la inflamación.

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.

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.

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, Rory-gamma-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 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.

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.

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)

EAE es un modelo animal bien estudiado de esclerosis múltiple, según lo revisado por Constantinescu *et al.*,
5 (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
10 encefalitogénicas activadas, o el uso de ratones transgénicos TCR susceptibles a EAE, como se discute en Mangalam *et al.*, (Two discrete subsets of CD8+ T cells modulate PLP₉₁₋₁₁₀ induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. J Autoimmun.
15 2012 jun; 38(4): 344-353).

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
20 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
25 (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).
30 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).

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).

5 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
10 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.

Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes
15 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
20 puntos de tiempo y a dosis eficaces.

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
25 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 sacrifican los ratones y pueden extirparse los sitios de inflamación (p. ej.,
30 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, 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 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.

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)

5 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.* 10 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).

15 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 20 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. 25 154: 688-700.

30 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.

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).

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.

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.

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 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, 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 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.

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

5 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
10 Chassaing *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 4 de feb de 2014; 104: Unidad 15.25).

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

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
20 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
25 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
30 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).

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.

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).

5 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
10 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.

Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agente
15 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.

20 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
25 pocos días antes del tratamiento. Algunos ratones reciben DSS sin recibir antibióticos de antemano.

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
30 isoflurano. Se registran imágenes fijas y videos para evaluar la extensión de la colitis y la respuesta al tratamiento. Se

puntuía la colitis usando criterios conocidos en la técnica. Se recoge el material fecal para estudio.

En varios puntos de tiempo, se sacrifican ratones y se recogen el colon, el intestino delgado, el bazo y los
5 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
10 inflamatorias y agotamiento de células caliciformes.

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
15 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),
20 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-
25 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-
30 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.

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)

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.

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.

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.

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).

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.

5 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.

Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina 10 (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.

15 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 20 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 25 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 30 todas las células inmunitarias CD45, 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). 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.

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)

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).

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.

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

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 7.0×10^9 y 3.0×10^{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).

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
5 irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las pmEV.

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.

10 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
15 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.

En diversos puntos de tiempo, se sacrifican ratones, se
20 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
25 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
30 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, 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.

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, Col11a1, 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
5 medir neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

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
10 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

Como alternativa, se someten a prueba pmEV para
15 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
20 (BDL). Algunos animales de control reciben una cirugía simulada. El procedimiento de BDL causa daño hepático, inflamación y fibrosis a los 7-21 días.

Se inicia el tratamiento con pmEV en algún momento, o bien en el momento de la cirugía o bien algún tiempo después
25 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
30 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
5 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
10 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).

Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden
15 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
20 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.

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

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
30 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.

5 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
10 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,
15 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.
20 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,
25 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
30 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 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*.

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.

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)

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).

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).

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.

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.

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.

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, Coll1a1, CHOP, y NRF2.

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, Coll1a1, CHOP, y NRF2.

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 7.0×10^9 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).

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.

5 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.

10 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
15 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
20 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,
25 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
30 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.

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

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).

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.

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.

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- 1×10^{12} :1 (pmEV: células bacterianas).

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.

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.

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 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, 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 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.

5 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
10 la respuesta en los grupos de ratones reexpuestos.

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

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.
15 (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.

Se someten a prueba las pmEV para determinar su eficacia
20 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.

Dependiendo del método de inducción de DIO y/o si el
25 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.
30 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, 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).

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.

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.

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.

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.

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

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.

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).

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.

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).

Las pmEV pueden marcarse con conjugados que contienen
5 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
10 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
15 (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,
20 Miller et al., Nanoscale. 7 de mayo de 2014;6(9):4928-35).

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

Se preparan las pmEV a partir de cultivos de lotes bacterianos. Se puede usar el microscopio electrónico de
25 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
30 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

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

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

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

5 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
10 (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)

15 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 ditioneol (DTT) y digestión de proteínas usando enzimas como LysC y tripsina como se describe en
20 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
25 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
30 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.

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.

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)

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

5 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 10 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 15 palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG)) de concentraciones conocidas. Se puede usar la lipidómica para identificar los lípidos presentes en las pmEV.

Proteínas totales

Se cuantifican los niveles de proteínas mediante 20 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 25 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 30 (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

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

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

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

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, MHCI y MHCII, 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.

5 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
10 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.

 Como una medida adicional de la activación de DC, se
15 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,
20 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
25 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
30 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.

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 pmEV.

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

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 bazo 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 Biotec, 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 μ l 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 μ g/ml. Se deja que los cocultivos se incuben a 37 °C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

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 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.

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.

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 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.

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.

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.

5 **Ejemplo 19: Selección *in vitro* de pmEV para una mayor destrucción de células tumorales por PBMC**

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.

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
5 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.

Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para
10 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).
15 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
20 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
25 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.

Como una medida adicional de la activación de los
30 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.

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
5 hospedador estimulan una respuesta inmunitaria similar a la respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

Puede repetirse este protocolo de estimulación de PBMC usando combinaciones de pmEV purificadas con o sin combinaciones de cepas bacterianas vivas, destruí dadas o
10 inactivas dadas/debilitadas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

Ejemplo 20: Detección in vitro de pmEV en células presentadoras de antígenos

Las células dendríticas en la lámina propia muestrean
15 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
20 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.

25 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
30 3: Unidad 3.7).

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

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
5 kit de aislamiento de células NK siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyl Biotec).

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
10 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
15 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
20 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.

Tras esta incubación, se usa citometría de flujo para
25 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
30 se muestran los datos como el número absoluto de células tumorales muertas por pocillo.

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.

5 **Ejemplo 22: Uso de ensayos de activación inmune *in vitro* para predecir la eficacia de la inmunoterapia del cáncer *in vivo* de composiciones pmEV**

10 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.

20 **Ejemplo 23: Determinación de la biodistribución de pmEV cuando se administran por vía oral a ratones**

25 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.

30

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.

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.

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 (2015)).

10 **Ejemplo 24: Purificación y preparación de vesículas extracelulares microbianas secretadas (smEV) a partir de bacterias**

Purificación

15 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)).

20 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
25 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.
30 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
5 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.

10 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
15 las instrucciones del fabricante. El sistema ATF retiene células intactas (>0.22 um) 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 um
20 pase después a través de un segundo filtro de 100 kDa, lo que permite recoger especies tales como las smEV de entre 0.22 um 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
25 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.

30 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

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 um para excluir

células intactas. Para aumentar adicionalmente la pureza, las smEV aisladas pueden tratarse con DNasa o proteinasa K.

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 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).

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.

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

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.

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.

Estrés antibiótico

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.

Estrés de temperatura

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.

Privación y limitación de nutrientes

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.

Saturación

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.

Estrés salino

Las bacterias se cultivan o se exponen durante períodos breves a medio que contiene NaCl, sales biliares u otras sales.

Estrés de UV

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.

Estrés de oxígeno reactivo

Las bacterias se cultivan en presencia de concentraciones subletales de peróxido de hidrógeno (250-1,000 μ M) 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.

Estrés por detergente

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

Estrés de pH

Las bacterias se cultivan o se exponen durante tiempos limitados a medios de diferentes pH.

Ejemplo 26: Preparación de bacterias libres de smEV

Se preparan muestras de bacterias que contienen
5 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
10 proteínas.

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
15 de una forma estable (p. ej., mezclado con glicerol, ultracongelación y se almacena a -80 °C).

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
20 pueden separar, además, de las smEV residuales mediante la centrifugación y el lavado, como se ha descrito anteriormente.

c. Las bacterias crecen en condiciones que se observa que limitan la producción de smEV. Las condiciones que se
25 pueden variar.

Ejemplo 27: Un modelo de carcinoma colorrectal

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
30 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*.

Por ejemplo, se obtienen ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY) u otro proveedor.

5 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

10 100 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

15 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

20 (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 µg smEV/ratón. Otros ratones pueden recibir 25, 50 o 100 mg de smEV por ratón. Como alternativa,

25 algunos ratones reciben entre 7.0e+09 to 3.0e+12 partículas de smEV por dosis.

Como alternativa, cuando los volúmenes tumorales alcanzan un promedio de 100 mm³ (aproximadamente 10-12 días después de la inoculación de las células tumorales), los

30 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 µg/ratón (100 µl 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.

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; y 3) smEV *V. parvula* (7.0 e+10 recuento de partículas). Se administraron por vía intraperitoneal (ip) los anticuerpos a 200 µg/ratón (100 µl 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

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.

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
5 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)
10 el día 7 después de la inyección del tumor.

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
15 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
20 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
25 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
30 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.

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).

Se analizan adicionalmente las muestras de tejido
5 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.,
10 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.

En varios puntos de tiempo, se sacrifican ratones y se
15 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
20 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
25 cuele 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
30 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, 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.

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.

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).

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.

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

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
5 antígenos y vías de presentación, presentación cruzada y coestimulación de linfocitos T.

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
10 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

15 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.

Las smEV se evalúan por su eficacia en el modelo de
20 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
25 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.

Las smEV se pueden administrar a los ratones por vía oral, intravenosa o intratumoral. Por ejemplo, se inyecta a
30 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
5 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
10 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).

Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden
15 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
20 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.

También se inyectan a algunos grupos de ratones con
25 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
30 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)

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).

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.

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.

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.

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 ul 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 ul por oreja (control del vehículo (DMSO al 0.01 % en solución salina) en la oreja izquierda y antígeno (21.2 ug (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).

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 ug/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.

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).

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.

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

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.

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 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 ($6.0E+11$).

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 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.

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.

En varios puntos temporales, se pueden tomar muestras de suero. Se pueden sacrificar otros grupos de ratones y
5 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
10 desangran algunos ratones desde el plexo orbital con anestesia con O₂/CO₂ y se realizan ensayos ELISA.

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
15 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
20 panimunitarias CD45, marcadores de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, T-bet, Gata3, Rory-gamma-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
25 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 realizarse en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u
30 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.

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.

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)

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 discrete subsets of CD8+ T cells modulate PLP₉₁₋₁₁₀ induced experimental autoimmune

encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. J Autoimmun. 2012 jun; 38(4): 344-353).

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).

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).

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.

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
5 otros tratamientos), y/o un tratamiento apropiado control (p. ej., vehículo o control de anticuerpos) en diversos puntos de tiempo y a dosis eficaces.

Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina
10 (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.

15 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
20 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
25 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-
30 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 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.

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)

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).

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.

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.

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
5 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
10 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).

Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una
15 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
20 bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

Pueden tratarse algunos grupos de ratones con agentes antiinflamatorios adicionales o agentes terapéuticos CIA
25 (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.

30 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 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, 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 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.

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

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).

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.

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)).

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.

Las smEV se administran en varias dosis y a intervalos
5 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.),
10 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
15 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
20 bacterianas) a $1-1 \times 10^{12}$:1 (smEV: células bacterianas).

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
25 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
30 antes de la administración con las smEV.

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.

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.

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.

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.

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, 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 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.

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)

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.

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.

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.

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).

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.

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.

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.

Se controla la glucosa en sangre quincenalmente antes del inicio del experimento. En diversos puntos de tiempo
5 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
10 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
15 (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,
20 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,
25 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
30 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.

5 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
10 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)

15 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).

20 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
25 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
30 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
5 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.

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

Colangitis inducida por DCC

Por ejemplo, se obtienen ratones C57bl/6 de 6-8 semanas
de edad de Taconic u otro proveedor. Se alimentan los ratones
15 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
20 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,
25 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
30 intravenosa a algunos ratones con smEV a 10, 15, o
20 ug/ratón. Como alternativa, algunos ratones pueden

recibir entre 7.0×10^9 y 3.0×10^{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).

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.

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.

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.

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
5 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.

Se prepara el tejido hepático para el análisis
10 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
15 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, Coll1a1, y TIMP-. Las mediciones de metabolitos pueden
20 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
25 dendríticas u otros infiltrados de células inmunitarias.

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

Colangitis inducida por BDL

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.

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).

5 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.

15 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.

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.

25 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

30

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
5 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
10 (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,
15 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,
20 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 las citocinas puede llevarse a cabo en células inmunitarias obtenidas de ganglios linfáticos u otro tejido, y/o en células inmunitarias
25 purificadas infiltradas del conducto biliar CD45 + obtenidas *ex vivo*.

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
30 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.

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)

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).

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).

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
5 durante el cual se desarrollan las características ENA, incluyendo la esteatosis, inflamación, hinchazón y fibrosis.

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
10 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
15 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
20 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.

Un sistema de puntuación NAS adaptado de Kleiner et al. (Design and validation of a histological scoring system for
25 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
30 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.

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, Coll1a1, CHOP, y NRF2.

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 7.0e+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 (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
5 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).

Como alternativa, algunos grupos de ratones pueden recibir entre 1×10^4 y 5×10^9 células bacterianas en una
10 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
15 bacterianas recién preparadas (o congeladas) y administrarse, o pueden irradiarse o destruirse con calor antes de la administración con las smEV.

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
20 control apropiado en diversos puntos temporales y dosis efectivas.

En diversos puntos de tiempo y/o al final del tratamiento, se sacrifican los ratones y pueden extirparse
25 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
30 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, Col1a1, 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.

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

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
5 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).

10 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.

Se someten a prueba las smEV para determinar su eficacia
15 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
20 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
25 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.

30 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 $7.0e+09$ 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 (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).

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.

5 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.

10 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.

15 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
20 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
25 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-
30 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 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.

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)

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.

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.

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 $7.0e+09$ to $3.0e+12$ 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).

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
5 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.

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

Además, se tratan algunos ratones con antibióticos antes del tratamiento. Por ejemplo, se añade vancomicina
15 (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.

20 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
25 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
30 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.

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

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
5 conjugados que contienen metales e isótopos de metales.

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
10 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,
15 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
20 et al, Small. 11, N.º 4, 456-461(2017).

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
25 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
30 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).

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

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

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

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

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

Para identificar y cuantificar los componentes
5 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.

10 *Proteómica de smEV y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM/EM) y espectrometría de masas (EM)*

Las proteínas presentes en las smEV se identifican y cuantifican mediante técnicas de espectrometría de masas. Se
15 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,
20 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,
25 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
30 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.

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.

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)

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

Los niveles de lípidos se cuantifican usando FM4-64
5 (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,
10 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
15 concentraciones conocidas. Se puede usar la lipidómica para
identificar los lípidos presentes en las smEV.

Proteínas totales

Se cuantifican los niveles de proteínas mediante
ensayos estándar como los ensayos de Bradford y BCA. Se
20 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
25 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
30 (Thermo-Fisher Scientific). Además, se puede usar la
proteómica para identificar las proteínas en la muestra.

Razones de lípido:proteína

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

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

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

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. 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.

Para detectar la capacidad de las células epiteliales activadas por smEV para estimular las DC, se sigue el
5 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
10 como anteriormente. Las líneas celulares epiteliales pueden incluir Int407, HEL293, HT29, T84 y CACO2.

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
15 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
20 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
25 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
30 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.

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.

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

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 bazo 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 μ l 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 μ g/ml. Se deja que los cocultivos se incuben a 37 °C durante 96 horas en condiciones normales de oxígeno.

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.

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.

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 µl de tampón de lavado. Se añaden 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado 1X y la suspensión se
5 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
10 125 µl de tampón de lavado con agitación de 2-3 minutos. Posteriormente, los pocillos se someten a análisis en el sistema Luminex xMAP.

Las normas permiten una cuantificación cuidadosa de las citocinas, incluyendo GM-CSF, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-1α, IL-1β,
15 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
20 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
25 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.

30 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

5 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 bazos de ratón. Después de la incubación de 10 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., 15 200,000 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.

25 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 30 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.

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.

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.

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 smEV. Estos cambios en las células del hospedador estimulan una respuesta inmunitaria similar a la respuesta in vivo en un microentorno de cáncer.

5 Puede repetirse este protocolo de estimulación de PBMC usando combinaciones de smEV purificadas con o sin combinaciones de cepas bacterianas vivas, destruí dadas o inactivas dadas/debilitadas para maximizar el potencial de estimulación inmunológica.

10 **Ejemplo 45: Detección *in vitro* de smEV en células presentadoras de antígeno**

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
15 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
20 presentadoras de antígeno. Opcionalmente, estos métodos pueden aplicarse para evaluar el comportamiento inmunomodulador de las smEV administradas a un paciente.

Las células dendríticas (DC) se aíslan de médula ósea, sangre o bazo de ratón o humano de acuerdo con los métodos
25 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).

Para evaluar la entrada y/o la presencia de smEV en las
30 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

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).

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.

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.

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

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

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.

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.

5 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.

10 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
15 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
20 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
25 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
30 de marcaje de smEV.

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

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.

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

Puede prepararse el inóculo en matraces o en biorreactores más pequeños y se controla el crecimiento. Por
10 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,
15 10,000 l.

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
20 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
25 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 (N₂, CO₂, y H₂) para
30 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 5 horas a 48 horas.

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
10 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,
15 puede estar influenciada por el estado actual de los microbios (por ejemplo, crecimiento exponencial, crecimiento estacionario, sin estrés, estresado).

La inoculación de los fermentadores de producción puede afectar a la cinética de crecimiento y a la actividad
20 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
25 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
30 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.

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.

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.

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.

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
5 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.

La liofilización del material, incluidas las bacterias
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

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.

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.

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.

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

Para los estudios descritos en el Ejemplo 50, se prepararon las smEV y pmEV de la siguiente manera.

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.

Prevotella histicola pmEV:

Se retiraron sedimentos de células del congelador y se colocaron en hielo. Se anotaron los pesos de los sedimentos.

Se añadió Tris-HCl 100 mM frío pH 7.5 a los gránulos congelados y los sedimentos se descongelaron girando a 4 °C.

Se añadieron 10 mg/ml de disolución madre de Dnasa a los sedimentos descongelados a una concentración final de 1 mg/ml.

Se incuban los sedimentos en el inversor durante 40 min a TA (temperatura ambiente).

Se filtró la muestra en un filtro de células de 70 μ m antes de discurrir por el Emulsiflex.

Se lisaron las muestras usando el Emulsiflex con 8 ciclos discretos a 22,000 psi.

5 Para eliminar los restos celulares de la muestra lisada, se centrifugó la muestra a 12,500 x g, 15 min, 4 °C.

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.

10 Para sedimentar las proteínas de la membrana, se centrifugó la muestra a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

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.

15 Se centrifugó la muestra a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

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.

Se resuspendió el sedimento y se centrifugó la muestra a 120,000xg durante 1 hora a 4 °C.

20 Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un volumen mínimo de PBS.

Veillonella parvula pmEV:

Las pmEV de *V. parvula* usadas en los estudios en el Ejemplo 50 provenían de tres aislamientos diferentes
25 (aislamientos 1, 2 y 3). Hubo pequeñas variaciones en el protocolo.

Se retiraron sedimentos de células del congelador y se colocaron en hielo. Se anotaron los pesos de los sedimentos.

30 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.

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.

5 Se lisaron las muestras usando el Emulsiflex con 8 ciclos individuales a 20,000-30,000 psi.

Para los aislamientos 1 y 2, se filtraron las muestras en un filtro de células de 70 μ m antes de discurrir por el Emulsiflex para eliminar los grumos.

10 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
15 grandes grumos.

Para eliminar los restos celulares del lisado celular, se centrifugaron las muestras a 12,500 x g, 15 min, 4 °C.

Se centrifugó el sobrenadante del aislamiento 3 un tiempo adicional mientras que los sobrenadantes de
20 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.

Se centrifugó el sobrenadante a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

Se resuspendió el sedimento de la membrana en 10 ml de
25 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.

Se centrifugaron las muestras a 120,000 x g, 1 h, 4 °C.

Se añadieron 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7.5 al
30 sedimento y se resuspendió el sedimento.

Se centrifugó la muestra a 120,000xg durante 1 hora a 4 °C.

Se descartó el sobrenadante y los sedimentos estaban en un volumen mínimo de en PBS (aislamientos 1 y 2) o PBS que
5 contenía sacarosa 250 mM (aislamiento 3).

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
10 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.

Irradiación con rayos gamma: Para la irradiación gamma, se prepararon las pmEV de *V. parvula* en forma congelada y se
15 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.

Liofilización: Las muestras se colocaron en un equipo
20 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 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
30 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

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

Los microbios se deben sedimentar y filtrar del sobrenadante con el fin de recuperar las smEV y no microbios.

10 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.

15 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 20 4 °C. El sobrenadante filtrado luego se puede concentrar usando TFF.

Aislamiento de smEV usando ultracentrifugación

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 25 200,000 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 30 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

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.

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.

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
5 un mínimo de 16 horas.

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.

Para limpiar y eliminar el optiprep residual de las
10 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
15 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
20 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

Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 5 semanas de
25 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
30 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.

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.

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.

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

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 CO₂ 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
5 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 CO₂ durante 72 horas. Se lavaron e incubaron las células diferenciadas adherentes en un medio fresco sin PMA durante 24 horas antes de la experimentación.

10 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
15 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.

Criterios de valoración experimentales: Después de
20 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
25 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®
30 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.

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 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.

Ejemplo 55: Suministro oral de smEV de *Megasphaera sp.* en estudios tumorales CT26, primer estudio representativo de oncología

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.

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

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.

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*

Las pmEV de las dos cepas de *Enterococcus gallinarum* se prepararon de la siguiente manera: Se agregó el tampón MP
5 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.
10 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.

15 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
20 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
25 conservó en hielo y a 4 °C hasta que estuviera listo para cargarse en el Superloop.

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
30 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.

5 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.

10 **Ejemplo 58: Datos in vivo generados con las pmEV**

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
15 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
20 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
25 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
30 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.

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.

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* Cepa A.

Ejemplo 59: Resultados de Negativicutes U937

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.

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</i> sp. Cepa A	Veillonellaceae
<i>Megasphaera</i> sp. Cepa B	Veillonellaceae
<i>Selenomonas felix</i>	Selenomonadaceae
<i>Acidaminococcus intestini</i>	Acidaminococcaceae

<i>Propionospora sp.</i>	Sporomusaceae
--------------------------	---------------

Incorporación por referencia

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

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.

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.