

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 669**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 21198256 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3978598**

54 Título: **Bacterias derivadas de humano que inducen proliferación o acumulación de células T reguladoras**

30 Prioridad:

01.12.2011 US 201161565976 P
06.03.2012 US 201261607360 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2025

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.00%)
3-1, Hongo 7-chome
Bunkyo-kuTokyo 113-8654, JP y
SCHOOL CORPORATION, AZABU VETERINARY
MEDICINE EDUCATIONAL INSTITUTION (50.00%)

72 Inventor/es:

HONDA, KENYA;
ATARASHI, KOJI;
TANOUE, TAKESHI;
HATTORI, MASAHIRA y
MORITA, HIDETOSHI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 669 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bacterias derivadas de humano que inducen proliferación o acumulación de células T reguladoras

5 **Campo técnico**

El objeto descrito en el presente documento se refiere a una composición de bacterias derivadas de humano que induce proliferación, acumulación, o proliferación y acumulación de células T reguladoras y que comprende, como componente activo, bacterias derivadas de humano que pertenecen a la clase *Clostridia*. También se refiere a la composición para su uso en la inducción de proliferación, acumulación, o proliferación y acumulación de células T reguladoras. La composición se denomina composición bacteriana. Además, el objeto se refiere a la composición para su uso en el tratamiento o la prevención de al menos una enfermedad o afección que es sensible a la inducción de células T reguladoras, tal como enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y enfermedades infecciosas, mediante la administración de la composición bacteriana a un individuo que lo necesita.

15 **Antecedentes de la técnica**

Cientos de especies de microorganismos comensales se encuentran en los tractos gastrointestinales de mamíferos, donde interactúan con el sistema inmunitario del huésped. La investigación usando animales libres de gérmenes (GF) ha demostrado que los microorganismos comensales influyen en el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa, tal como histogénesis de placas de Peyer (PP) y folículos linfoides aislados (ILF), secreción de péptidos antimicrobianos a partir del epitelio, y acumulación de linfocitos singulares en los tejidos mucosos, incluyendo células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A, linfocitos intraepiteliales, células T positivas para CD4 productoras de IL-17 (Th17), y células similares a NK productoras de IL-22 (bibliografía no de patentes (NPL) 1 a 7). Por consiguiente, la presencia de bacterias intestinales potencia las funciones protectoras de las membranas mucosas, lo que permite al huésped producir respuestas inmunitarias robustas contra microbios patógenos que invaden el cuerpo. Por otro lado, el sistema inmunitario de la mucosa mantiene la insensibilidad a antígenos alimentarios y microbios inofensivos (NPL 3). Una anomalía en la regulación de la interferencia entre las bacterias comensales y el sistema inmunitario (disbiosis intestinal) puede conducir a una respuesta inmunitaria demasiado robusta a antígenos medioambientales y puede resultar en enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (NPL 8 a 10).

Estudios recientes han demostrado que las bacterias comensales individuales controlan la diferenciación de sus células inmunitarias específicas en el sistema inmunitario de la mucosa. Por ejemplo, *Bacteroides fragilis*, que es una bacteria comensal en humanos, induce específicamente una respuesta de células Th1 sistémica y una respuesta de células T productoras de IL-10 en la mucosa en ratones, y desempeña un papel en la protección del huésped frente a la colitis, que está provocada por un patógeno (NPL 3). Se sugirió que *F. prausnitzii* induce la secreción de IL-10 en un modelo de colitis en ratones (NPL 21). Las bacterias filamentosas segmentadas, que son bacterias comensales intestinales en ratones, inducen una respuesta de células Th17 en la mucosa y potencian la resistencia contra la infección de los tractos gastrointestinales del huésped con un patógeno (NPL 11 a 13). Además, se sabe que los ácidos grasos de cadena corta derivados de varias bacterias comensales suprimen la inflamación intestinal (NPL 14). Además, se ha observado que la presencia de algunas especies de microbiota intestinal influye en gran medida en la diferenciación de células T reguladoras (a continuación en el presente documento, denominadas "células Treg") que ayudan a mantener la homeostasis del sistema inmunitario. Aunque se han identificado especies específicas de comensales bacterianos murinos que pueden estimular fuertemente las Treg (NPL 15), todavía se desconoce si las especies de bacterias comensales humanas ejercen una influencia equivalente sobre el sistema inmunitario humano. Además, el tracto intestinal humano alberga más de mil especies bacterianas, muchas de las cuales aún no se han cultivado (NPL 16). No es factible adivinar *a priori* cuáles, si las hay, podrían tener un efecto sobre las Treg.

Con el fin de desarrollar fármacos, complementos alimenticios o alimentos con funciones inmunitarias beneficiosas para su uso en humanos, es deseable identificar microorganismos comensales que colonicen de manera natural a los humanos y tengan propiedades inmunomoduladoras. Además, puesto que muchos de los comensales en el microbioma humano aún no se han cultivado, es necesario desarrollar métodos para cultivarlos de modo que puedan producirse mediante procedimientos de fermentación industriales tradicionales e incorporarse posteriormente en formulaciones farmacéuticas o alimenticias.

Las células T CD4⁺ son células T reguladoras que se han identificado como un subconjunto de células que suprimen la inmunidad. Un factor de transcripción, Foxp3, se expresa en células T CD4⁺, que se sabe que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica (NPL 8, 9, 17 y 18). Las células que expresan Foxp3 están presentes mayoritariamente en el colon y sólo las células Treg presentes localmente en el colon expresan constantemente IL-10, una citocina inmunosupresora, a un nivel elevado (NPL 19). Los animales que tienen células CD4⁺Foxp3⁺ a partir de las cuales se eliminan específicamente IL-10 desarrollan enfermedad intestinal inflamatoria (NPL 20).

Por consiguiente, existe la necesidad de identificar especies bacterianas comensales derivadas de humano con la capacidad de inducir fuertemente a las células Treg a producir IL-10 en el colon a un nivel elevado y desarrollar

métodos para cultivar tales especies. Tales especies podrían usarse para potenciar la inmunosupresión, que, a su vez, pueden aplicarse al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades inflamatorias, alergias, o trasplante de órganos, entre otras enfermedades y afecciones.

5 Lista de referencias

Bibliografía no de patentes

- [NPL 1] J. J. Cebra, "Am J Clin Nutr", mayo, 1999, 69, 1046S
- [NPL 2] A. J. Macpherson, N. L. Harris, "Nat Rev Immunol", junio de 2004, 4, 478
- [NPL 3] J. L. Round, S. K. Mazmanian, "Nat Rev Immunol", mayo de 2009, 9, 313
- [NPL 4] D. Bouskra *et al.*, "Nature", 27 de noviembre de 2008, 456, 507
- [NPL 5] K. Atarashi *et al.*, "Nature", 9 de octubre de 2008, 455, 808
- [NPL 6] Ivanov, II *et al.*, "Cell Host Microbe", 16 de octubre de 2008, 4, 337
- [NPL 7] S. L. Sanos *et al.*, "Nat Immunol", enero de 2009, 10, 83
- [NPL 8] M. A. Curotto de Lafaille, J. J. Lafaille, "Immunity", mayo de 2009, 30, 626
- [NPL 9] M. J. Barnes, F. Powrie, "Immunity", 18 de septiembre de 2009, 31, 401
- [NPL 10] W. S. Garrett *et al.*, "Cell", 5 de octubre de 2007, 131, 33
- [NPL 11] Ivanov, II *et al.*, "Cell", 30 de octubre de 2009, 139, 485
- [NPL 12] V. Gaboriau-Routhiau *et al.*, "Immunity", 16 de octubre de 2009, 31, 677
- [NPL 13] N. H. Salzman *et al.*, "Nat Immunol", 17, 76.
- [NPL 14] K. M. Maslowski *et al.*, "Nature", 29 de octubre de 2009, 461, 1282
- [NPL 15] K. Atarashi *et al.*, "Science", 21 de enero de 2011, 331, 337
- [NPL 16] J. Quin *et al.*, "Nature", 4 de marzo de 2010, 464, 59
- [NPL 17] L. F. Lu, A. Rudensky, "Genes Dev", 1 de junio de 2009, 23, 1270
- [NPL 18] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, "Cell", 30 de mayo de 2008, 133, 775
- [NPL 19] C. L. Maynard *et al.*, "Nat Immunol", septiembre de 2007, 8, 931
- [NPL 20] Y. P. Rubtsov *et al.*, "Immunity", abril de 2008, 28, 546
- [NPL 21] H. Sokol *et al.*, "PNAS", octubre de 2008, 105, 16731

Sumario de la invención

Problema técnico

- Las presentes composiciones se han preparado en vista de los problemas descritos anteriormente en la técnica. La presente invención proporciona una composición que induce proliferación y/o acumulación de células T reguladoras, consistiendo la composición en una combinación de 5-17 cepas bacterianas pertenecientes a 5-17 de las siguientes unidades taxonómicas operativas (OTU):

OTU	SEQ ID NO	ESPECIE MÁS CERCANA
136	19	<i>Clostridium saccharogumia</i> <i>Clostridium ramosum</i> JCM1298

46	20	<i>Clostridium ramosum</i>
221	21	<i>Flavonifractor plautii</i> <i>Pseudoflavonifractor capillosus</i> ATCC 29799
9	22	<i>Clostridium hathewayi</i> <i>Clostridium saccharolyticum</i> WM1
21	24	<i>Blautia coccoides</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA</i>
166	25	<i>Clostridium sp.</i> <i>Clostridium boltea</i> ATCC BAA-613
73	26	<i>Clostridium sp.</i> MLG055 <i>Erysipelotrichaceae bacterium 2_2_44A</i>
174	27	<i>Clostridium indolis</i> <i>Anaerostipes caccae</i> DSM 14662
337	30	<i>Anaerotruncus colihominis</i> <i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
314	31	<i>Ruminococcus sp.</i> ID8 <i>Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA</i>
195	32	<i>Clostridium lavalense</i> <i>Clostridium asparagiforme</i> DSM 15981
306	33	<i>Clostridium symbiosum</i> <i>Clostridium symbiosum</i> WAL-14163
87	34	<i>Eubacterium contortum</i> <i>Clostridium sp.</i> D5
281	39	<i>Clostridium scindens</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 5_1_57FAA</i>
288	40	<i>Lachnospiraceae bacterium A4</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1</i>
334	41	<i>Clostridium sp.</i> 316002/08 <i>Clostridiales bacterium 1_7_47FAA</i>
359	42	<i>Lachnospiraceae bacterium A4</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1.</i>

En las reivindicaciones dependientes se definen aspectos adicionales de la invención.

5 En realizaciones específicas, las composiciones bacterianas inducen, y preferiblemente inducen fuertemente, proliferación, acumulación, o proliferación y acumulación de células T reguladoras que producen una citocina inmunosupresora, tal como IL-10, en el colon (por ejemplo, el colon humano) a niveles elevados.

10 Tales composiciones bacterianas son útiles, por ejemplo, para potenciar la inmunosupresión y, como resultado, para tratar enfermedades autoinmunitarias.

10 Solución al problema

15 Tal como se describe en el presente documento, entre las más de mil especies de bacterias en el microbioma humano, hay varias especies que inducen fuertemente la acumulación de Treg en el colon.

Además, tal como se describe, aunque la mayoría de las especies bacterianas presentes en muestras fecales de

individuos sanos no tiene la capacidad de estimular a las Treg, las especies que pertenecen a la clase *Clostridia* tienen la capacidad de provocar una inducción robusta de Treg en el colon. Además, los inventores han obtenido cultivos *in vitro* de cada una de las especies bacterianas identificadas y han demostrado que la inoculación de ratones con las especies cultivadas *in vitro* también conduce a una acumulación robusta de Treg en el colon.

Tal como se describe en el presente documento, las composiciones de la presente invención suprimen las funciones inmunitarias.

En una realización, la composición induce células T reguladoras que son células T reguladoras positivas para factor de transcripción Foxp3 o células T reguladoras productoras de IL-10. En otra realización, la composición tiene un efecto inmunosupresor.

Una realización es una composición farmacéutica que induce proliferación, acumulación, o tanto proliferación como acumulación de células T reguladoras y suprime la función inmunitaria. La composición farmacéutica comprende una composición bacteriana descrita en el presente documento y un componente farmacéuticamente aceptable, tal como un portador, un disolvente o un diluyente.

La composición farmacéutica induce la proliferación y/o acumulación de células T reguladoras (células Treg) y suprime la función inmunitaria.

Además, se proporciona la composición para su uso en un método de inducción de proliferación, acumulación, o tanto proliferación como acumulación de células T reguladoras en un individuo (por ejemplo, un individuo que lo necesita, tal como un individuo que necesita inducción de proliferación y/o acumulación de células T reguladoras). El método comprende administrar al individuo una composición bacteriana descrita en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende una composición bacteriana descrita en el presente documento. El individuo puede ser un individuo sano o un individuo que necesita prevención, reducción o tratamiento de una afección o enfermedad. Por ejemplo, las composiciones descritas pueden administrarse a un individuo que necesita tratamiento, reducción de la gravedad o prevención de una enfermedad o afección tal como una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad alérgica, y una enfermedad infecciosa.

Opcionalmente, la administración de la composición bacteriana puede ser en combinación con, o precedida por, una serie de uno o más antibióticos.

Opcionalmente, la administración de la composición bacteriana puede ser en combinación con la administración de al menos una sustancia prebiótica que favorece preferentemente el crecimiento de las especies en la composición bacteriana a lo largo del crecimiento de otras especies bacterianas comensales humanas. En una realización, la(s) sustancia(s) prebiótica(s) es/son, por ejemplo, un oligosacárido no digerible. En realizaciones específicas, la una o más sustancia(s) prebiótica(s) se selecciona(n) del grupo que consiste en cáscara de almendra, inulina, oligofructosa, rafinosa, lactulosa, pectina, hemicelulosa, amilopectina, acetil-Co A, biotina, melaza de remolacha, extractos de levadura, y almidón resistente. También se contempla en el presente documento una composición que comprende la composición bacteriana y al menos una sustancia prebiótica.

La composición bacteriana puede administrarse en combinación con una sustancia seleccionada del grupo que consiste en corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistamínicos, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromoglicato disódico, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas, inhibidores anti-TNF tales como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept, y combinaciones de los mismos. También se describe en el presente documento una composición que comprende la composición bacteriana y al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistamínicos, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromoglicato disódico, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas, inhibidores anti-TNF tales como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept, y combinaciones de los mismos.

En una realización adicional, la composición bacteriana puede usarse como adyuvante para mejorar la eficacia de una formulación de vacuna. Por ejemplo, la composición bacteriana puede usarse como adyuvante para una vacuna para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad alérgica. En algunas realizaciones, se proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento, comprendiendo el método administrar la composición bacteriana y administrar una vacuna.

La evaluación del grado de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras que resulta de la administración de una composición descrita en el presente documento puede llevarse a cabo mediante una variedad de enfoques, tales como mediante la medición del número de Treg que expresan Foxp3 en una muestra del paciente (tal como una biopsia o una muestra de sangre), la promoción de la expresión de IL-10, la promoción de la expresión

de CTLA4, la promoción de la expresión de IDO, la supresión de la expresión de IL-4, o la colonización de un individuo con la composición bacteriana. Los resultados de tales evaluaciones se usan como índice de la inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras en el individuo.

- 5 En una realización, la administración de una composición descrita en el presente documento provoca la inducción de las células T reguladoras que son células T reguladoras positivas para factor de transcripción Foxp3 o células T reguladoras productoras de IL-10.

- 10 La composición descrita en el presente documento puede administrarse mediante una variedad de vías, y en una realización se administra por vía a un individuo que lo necesita, tal como un paciente que lo necesita. La composición puede administrarse en varias formas orales, tales como en forma de esporas (en un polvo seco o en disolución en una formulación líquida), en cápsulas entéricas, en sobres, o en una matriz alimentaria, tal como yogur o una bebida.

- 15 Predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento (predecir si el sujeto responderá o no al tratamiento) con las composiciones de la invención puede implicar (a) obtener una muestra (al menos una, una o más), tal como una muestra fecal o una biopsia colónica, de un paciente antes de que se trate con una composición bacteriana descrita en el presente documento; (b) medir o determinar el porcentaje o los recuentos absolutos en la muestra de al menos una especie bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298, *Clostridium ramosum*, *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799, *Clostridium*
 20 *hathewayi*, *Clostridium saccharolyticum* WM1, *Bacteroides* sp. MANG, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium scindens*, *Lachnospiraceae bacterium* 5_1_57FAA, *Lachnospiraceae bacterium* 6_1_63FAA, *Clostridium* sp. 14616, *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613, cf. *Clostridium* sp. MLG055, *Erysipelotrichaceae bacterium* 2_2_44A, *Clostridium indolis*, *Anaerostipes caccae*, *Clostridium bolteae*, *Lachnospiraceae bacterium* DJF_VP30,
 25 *Lachnospiraceae bacterium* 3_1_57FAA_CT1, *Anaerotruncus colihominis*, *Anaerotruncus colihominis* DSM 17241, *Ruminococcus* sp. ID8, *Lachnospiraceae bacterium* 2_1_46FAA, *Clostridium lavalense*, *Clostridium asparagiforme* DSM 15981, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium symbiosum* WAL-14163, *Eubacterium contortum*, *Clostridium* sp. D5, *Oscillospiraceae bacterium* NML 061048, *Oscillibacter valericigenes*, *Lachnospiraceae bacterium* A4, *Clostridium*
 30 sp. 316002/08, *Clostridiales bacterium* 1_7_47FAA, *Blautia cocoides* y *Anaerostipes caccae* DSM 14662, produciendo de ese modo un porcentaje o recuento, y (c) comparar el porcentaje o recuento resultante (medición) con un valor de nivel inicial de la misma medición en un sujeto sano, en la que un porcentaje o recuento en la muestra obtenida del paciente que es inferior al valor de nivel inicial indica que el sujeto puede responder favorablemente a la administración de la composición bacteriana.

- 35 En algunas realizaciones, la composición de la invención se administra al paciente si el porcentaje o recuento en la muestra obtenida del paciente es inferior al valor de nivel inicial. Predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento puede implicar además medir, en una muestra del paciente (por ejemplo, una muestra fecal o una biopsia colónica), los porcentajes o recuentos absolutos de otras especies comensales que pertenecen a las agrupaciones IV y XIVA de *Clostridium*, pero no están presentes en la composición bacteriana, en la que un valor del porcentaje o recuento
 40 absoluto (medición) inferior al nivel inicial indica además que el sujeto puede responder favorablemente a la administración de las composiciones bacterianas. En algunas realizaciones, la composición de la invención se administra al paciente si el valor del porcentaje o recuento absoluto (medición) es inferior al nivel inicial. En una realización, el paciente que está evaluándose padece enfermedad intestinal inflamatoria o una infección por *C. difficile*.

- 45 Monitorizar la respuesta de un sujeto al tratamiento con las composiciones bacterianas de la invención puede implicar (a) obtener una muestra (al menos una), tal como una muestra fecal o una biopsia colónica, de un paciente antes del tratamiento con una composición bacteriana descrita en el presente documento; (b) obtener una muestra (al menos una) correspondientes del paciente después del tratamiento con una composición bacteriana descrita en
 50 el presente documento; y (c) comparar el porcentaje o los recuentos absolutos de al menos una especie bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298, *Clostridium ramosum*, *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium saccharolyticum* WM1, *Bacteroides* sp. MANG, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium scindens*, *Lachnospiraceae bacterium* 5_1_57FAA, *Lachnospiraceae bacterium* 6_1_63FAA, *Clostridium* sp. 14616, *Clostridium bolteae* ATCC
 55 BAA-613, cf. *Clostridium* sp. MLG055, *Erysipelotrichaceae bacterium* 2_2_44A, *Clostridium indolis*, *Anaerostipes caccae*, *Clostridium bolteae*, *Lachnospiraceae bacterium* DJF_VP30, *Lachnospiraceae bacterium* 3_1_57FAA_CT1, *Anaerotruncus colihominis*, *Anaerotruncus colihominis* DSM 17241, *Ruminococcus* sp. ID8, *Lachnospiraceae bacterium* 2_1_46FAA, *Clostridium lavalense*, *Clostridium asparagiforme* DSM 15981, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium*
 60 *symbiosum* WAL-14163, *Eubacterium contortum*, *Clostridium* sp. D5, *Oscillospiraceae bacterium* NML 061048, *Oscillibacter valericigenes*, *Lachnospiraceae bacterium* A4, *Clostridium* sp. 316002/08, *Clostridiales bacterium* 1_7_47FAA, *Blautia cocoides* y *Anaerostipes caccae* DSM 14662 en la muestra obtenida en (a) con el porcentaje o los recuentos absolutos de la misma al menos una especie bacteriana en la muestra obtenida en (b), en la que un valor en la muestra obtenida en (b) (después del tratamiento con la composición bacteriana) mayor que en la muestra obtenida en (a) (antes del tratamiento) indica que el sujeto ha respondido favorablemente al tratamiento
 65 (por ejemplo, es un indicador positivo de inmunosupresión potenciada en el sujeto).

Administrar adicionalmente la composición bacteriana al paciente o cesar la administración de la composición bacteriana al paciente puede estar basado en la comparación en (c). La monitorización puede comprender además medir, en la muestras del sujeto, los porcentajes o recuentos absolutos de otras especies comensales que pertenecen a las agrupaciones IV y XIVa de *Clostridium*, pero no están presentes en la composición bacteriana, en la que un valor después del tratamiento mayor que antes del tratamiento indica que el sujeto ha respondido favorablemente al tratamiento.

Efectos ventajosos de la invención

EFFECTOS DE LAS COMPOSICIONES Y LOS MÉTODOS DESCRITOS EN EL PRESENTE DOCUMENTO

Las composiciones descritas en el presente documento son excelentes para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras (células Treg).

La inmunidad en un individuo puede suprimirse a través de la administración de la composición en cuestión, tal como a través de la ingesta de la composición bacteriana en un alimento o una bebida o como complemento alimenticio o a través de la administración de una composición farmacéutica que comprende la composición bacteriana. La composición en cuestión puede usarse, por ejemplo, para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades infecciosas, así como para suprimir el rechazo inmunológico en el trasplante de órganos, o similares. Además, si un alimento o una bebida, tal como un alimento saludable, comprende la composición en cuestión, los individuos sanos pueden ingerir la composición de manera fácil y rutinaria. Como resultado, es posible inducir la proliferación y/o acumulación de células T reguladoras y mejorar de ese modo las funciones inmunitarias.

La composición descrita en el presente documento proporciona una alternativa de tratamiento natural, de larga duración, que se preocupa por el paciente y benigna para afecciones inmunomediadas. Por ejemplo, la enfermedad intestinal inflamatoria se trata actualmente con fármacos sintéticos que pueden tener graves efectos secundarios (tales como corticoesteroides, inhibidores de TNF), no pueden administrarse por vía oral (tales como inhibidores de TNF), tienen una dosificación poco práctica que implica varias pastillas al día (tales como mesalazina o sulfasalazina) o tienen una eficacia limitada y efectos de corta duración (tales como los probióticos comercializados en la actualidad, por ejemplo, *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, etc.).

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1A-B] La figura 1A es un histograma que muestra células CD4 dependientes de la expresión de Foxp3 de la lámina propia del colon (C LPL, panel izquierdo) y la lámina propia del intestino delgado (SI LPL, panel derecho) de ratones GF o ratones GF colonizados con heces humanas sin tratar (+huUT, n=4, enumeración desde #A1 hasta #A4) o tratadas con cloroformo (+huCloro, n=4, enumeración desde #B1 hasta #B4). La figura 1B es un histograma que muestra la expresión de Helios en células Foxp3+CD4+ de la lámina propia del colon (panel izquierdo) y la lámina propia del intestino delgado (panel derecho) de ratones GF o ratones GF colonizados con heces humanas sin tratar (+huUT) o tratadas con cloroformo (+huCloro). Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) y (B) indican el porcentaje de la población.

[Figura 1C-D] Las figuras 1C-D son gráficos que muestran, respectivamente, datos combinados para la expresión de Foxp3 en células CD4+, y para la expresión de Helios en células Foxp3+CD4+, de la lámina propia del colon (panel izquierdo) y la lámina propia del intestino delgado (panel derecho) de ratones GF o ratones GF colonizados con heces humanas sin tratar (+huUT) o tratadas con cloroformo (+huCloro). Cada círculo en (C) y (D) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. *P < 0,05; **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 1E] La figura 1E muestra gráficos de puntos de citometría de flujo representativos para las expresiones intracelulares de IL-17 e IFN-γ en células CD4+ de la lámina propia del colon (panel superior) y la lámina propia del intestino delgado (panel inferior) de ratones GF o ratones GF colonizados con heces humanas sin tratar (+huUT) o tratadas con cloroformo (+huCloro). El número en cada cuadrante en (E) indica el porcentaje de la población.

[Figura 1F-G] Las figuras 1F-G muestran, respectivamente, datos combinados de todos los ratones para la expresión de IL-17 e IFN-γ en células CD4+ de la lámina propia del colon (panel izquierdo) y la lámina propia del intestino delgado (panel derecho) de ratones GF o ratones GF colonizados con heces humanas sin tratar (+huUT) o tratadas con cloroformo (+huCloro). Cada círculo en (F, G) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. *P < 0,05; ns, no significativo (P > 0,05), prueba de la t para datos independientes.

[Figura 2] La figura 2 muestra gráficos representativos (A) y datos combinados (B-C) para la expresión de Foxp3 en células CD4+ (panel superior en A, panel izquierdo en B) o la expresión de Helios en células Foxp3+CD4+ (panel inferior en A, panel derecho en C) para ratones GF y ratones GF a los que se les inoculó por vía oral (una vez a la semana durante 4 semanas) una suspensión de heces humanas tratadas con cloroformo que se habían sometido previamente a tratamiento en autoclave. Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el

porcentaje de la población. Cada círculo en (B, C) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. ns, no significativo ($P > 0,05$), prueba de la t para datos independientes.

[Figura 3] La figura 3 muestra gráficos representativos (A, en este caso se muestran datos del ratón #C4) y datos combinados (B) para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ de linfocitos de la lámina propia del colon y del intestino delgado para ratones GF y ratones GF a los que se les inocularon por vía oral heces humanas tratadas con cloroformo (+huCloro, n=7, enumeración desde #C1 hasta #C7). Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (B) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 4] La figura 4 muestra gráficos representativos (A) y datos combinados (B) para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ de la lámina propia del colon (C LPL) y la lámina propia del intestino delgado (SI LPL) para ratones GF y ratones GF (enumeración desde #D1 hasta #D6) que se coalojaron con los ratones ex-GF #C6 y #C7 colonizados con heces humanas tratadas con cloroformo. Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (B) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 5] La figura 5 muestra gráficos representativos y datos combinados para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ (A, B) o la expresión de Helios en células Foxp3+CD4⁺ (C) de la lámina propia del colon (C LPL) y la lámina propia del intestino delgado (SI LPL) para ratones GF, ratones GF a los que se les inoculó suspensión fecal diluida 2000 veces (+x2000, n=4, enumeración desde #E1 hasta #E4) o 20000 veces (+x20000, n=8, enumeración desde #F1 hasta #F8) del ratón #C4. Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (B) y (C) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. *P < 0,05; **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 6] La figura 6 muestra gráficos representativos (A, B) y datos combinados (C, D) para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ (A, C) o la expresión de Helios en células Foxp3+CD4⁺ (B, D) de la lámina propia del colon (C LPL) y la lámina propia del intestino delgado (SI LPL) para ratones GF y ratones GF a los que se les inoculó suspensión fecal del ratón #F3 (n=5), #F7 (n=4) o #F8 (n=4). Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) y (B) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (C) y (D) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. *P < 0,05; **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 7] La figura 7 muestra gráficos representativos (A) y datos combinados (B, C) para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ (A, B) o la expresión de Helios en células Foxp3+CD4⁺ para ratones GF y ratones GF a los que se les inocularon 3 cepas aisladas de bacterias procedentes del contenido cecal del ratón #F8 (n=4, enumeración desde #J1 hasta #J4). Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (B) y (C) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. ns, no significativo ($P > 0,05$), prueba de la t para datos independientes.

[Figura 8] La figura 8 muestra las abundancias relativas de OTU que tienen el mismo pariente más cercano en cada muestra cecal (se extrajo ADN bacteriano a partir del contenido cecal de los ratones #A1, #C4, #F8, #G2, #H3, #I3, #J3 y #K3, mostrados en las barras). El número total de OTU detectadas en cada muestra se representa debajo de la barra. Los nombres de OTU detectadas en la muestra #H3, #I3 o #K3, su pariente más cercano y su similitud con el pariente más cercano se representan en la tabla de la derecha.

[Figura 9] La figura 9 muestra gráficos representativos (A) y datos combinados (B, C) para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ (A, B) o la expresión de Helios en células Foxp3+CD4⁺ (A, C) de la lámina propia del colon (C LPL) y la lámina propia del intestino delgado (SI LPL) para ratones GF y ratones GF a los que se les inocularon colecciones de bacterias procedentes de la placa de cultivo de contenido cecal del ratón #G2 (n=4, enumeración desde #K1 hasta #K4). Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (B) y (C) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. *P < 0,05; **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 10] La figura 10 muestra gráficos representativos (A) y datos combinados (B, C) para la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ (A, B) o la expresión de Helios en células Foxp3+CD4⁺ (A, C) de la lámina propia del colon (C LPL) y la lámina propia del intestino delgado (SI LPL) para ratones GF y ratones GF a los que se les inoculó una mezcla de 23 cepas bacterianas que se aislaron y se muestran en la tabla 2 (23-mix). Los números encima de las líneas entre corchetes en (A) indican el porcentaje de la población. Cada círculo en (B) y (C) representa un animal independiente, y las barras de error indican la DE. *P < 0,05; **P < 0,001, prueba de la t para datos independientes.

[Figura 11] La figura 11 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4⁺ en ratones GF adultos a los que se les inocularon muestras cecales diluidas de 2×10^4 a 2×10^7 veces de ratones +huCloro. Los experimentos se realizaron más de dos veces. Las barras de error indican la DE. **P < 0,01, *P < 0,05, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.

[Figura 12] La figura 12 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4⁺ en el colon de

ratones GF adultos a los que se les inoculó una mezcla de 23 cepas bacterianas que se aislaron y se muestran en la tabla 2 (23-mix), heces humanas tratadas con cloroformo (+huCloro) y *Faecalibacterium prausnitzii* (+Faecali). Las barras de error indican la DE. **P<0,01, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.

- 5 [Figura 13] La figura 13 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4+ en ratones GF adultos que eran los receptores secundarios (+2x10⁴-re) y terciarios (+2x10⁴-re-re) de inoculaciones con el contenido cecal de ratones +2x10⁴, y ratones GF adultos a los que se les inocularon muestras cecales diluidas 2x10⁴ veces de ratones +2x10⁴ (+2x10⁴)².
- 10 [Figura 14] La figura 14 muestra los resultados de la pirosecuenciación de ADNr 16S del contenido cecal de los ratones definidos (+hu, +huCloro, +2x10⁴, +2x10⁴-re, (+2x10⁴)², +23-mix) usando un secuenciador 454. Se muestran la abundancia relativa de las OTU (%) en la comunidad de bacterias cecales en cada ratón y las cepas más cercanas en la base de datos y el número de cepa aislada correspondiente para las OTU indicadas.
- 15 [Figura 15] La figura 15 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4+ en el colon de ratones GF IQL, BALB y B6 adultos tras la inoculación de una mezcla de 17 cepas bacterianas que se aislaron y se muestran en la tabla 4 (17-mix), **P<0,01, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.
- 20 [Figura 16] La figura 16 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4+ en ratones GF IQL adultos monocolonizados con cada una de las 17 cepas enumeradas en la tabla 4 (17-mix).
- 25 [Figura 17] La figura 17 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4+ en ratones GF IQL adultos colonizados con 3-mix, 5-mix-A, 5-mix-B, 5-mix-C o 17-mix tal como se enumeran en la tabla 4. Los círculos indican animales individuales. Los experimentos se realizaron más de dos veces con resultados similares. Las barras de error indican la DE. **P<0,01, *P<0,05, ns, no significativo, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.
- 30 [Figura 18] La figura 18 muestra un gráfico representativo de la acumulación de células Foxp3+CD4+ en ratones SPF adultos a los que se les inoculó repetidamente 17-mix (SPF+17-mix; n=5) o control (SPF+cont.; n=6). **P<0,01, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.
- 35 [Figura 19] La figura S19 muestra los efectos de la inoculación de 17-mix sobre un modelo OVA de diarrea, tal como se mide mediante una puntuación de diarrea cualitativa. *P<0,05, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.
- 40 [Figura 20] La figura 20 muestra la supervivencia de ratones adultos a los que se les inoculó una mezcla de 17 cepas bacterianas enumeradas en la tabla 4 (17-mix) tras la exposición a ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), un agente usado en modelos experimentales de colitis.
- 45 [Figura 21] La figura 21 muestra la abundancia relativa de cada una de las cepas de 17-mix en la microbiota fecal humana de sujetos sanos y con colitis ulcerosa. Las lecturas públicamente disponibles de 15 sujetos sanos y 20 sujetos con colitis ulcerosa en la base de datos de MetaHIT se alinearon con el genoma de las 17 cepas. Se muestran los números medios de lecturas mapeadas en grupos sanos y grupos con UC para cada uno de los genomas de las 17 cepas. Las barras de error representan el EEM. *P<0,05, tal como se calcula mediante la prueba de la t de Student.

Breve descripción de las tablas

- 50 La tabla 1 muestra los números de lecturas detectadas y los parientes más cercanos para cada OTU obtenida a partir de la clasificación de secuencias (3400 lecturas para cada muestra) resultantes de la amplificación de genes codificantes de ARNr 16S y la metasecuenciación por PCR de ADN bacteriano extraído del contenido cecal de los ratones #A1, #C4, #F8, #G2, #H3, #I3, #J3 y #K3 (clasificación basada en la similitud de secuencia, >97 % de identidad con las secuencias en la base de datos de ácidos nucleicos usando BLAST).
- 55 La tabla 2 muestra, para cada una de las diecisiete cepas bacterianas aisladas del contenido cecal de los ratones #F8, #G2, #I1 y #K3 usando placas de agar BL o agar EG, el pariente más cercano en las especies conocidas, la máxima similitud con el pariente más cercano, su clasificación en la agrupación de *Clostridiaceae*, el origen de ID de ratón, y el medio de cultivo para el aislamiento.
- 60 La tabla 3 muestra, para cada una de las 31 cepas bacterianas aisladas del contenido cecal de los ratones #F8, #G2, #I1 y #K3 usando placas de agar BL o agar EG, el pariente más cercano en las especies conocidas, la máxima similitud con el pariente más cercano, la base de datos usada para la búsqueda en BLAST, y la similitud entre cepas.
- 65 La tabla 4 muestra el análisis de ADNr 16S para cada una de las 31 cepas que se aislaron. Se aisló ADN bacteriano a partir de cada una de las 31 cepas y se amplificó el ADNr 16S de los aislados mediante PCR de colonias. Se

purificó cada ADN amplificado, se secuenció, y se alineó usando el programa de software ClustalW. Basándose en la secuencia de ADNr 16S para cada cepa, se muestran su especie más cercana, el % de similitud con la especie más cercana, y la similitud con otras cepas. Las cepas que se incluyeron en 23-mix, 17-mix, 5-mix-A, 5-mix-B, 5-mix-C y 3-mix están marcadas en la columna de la derecha.

Descripción de realizaciones

DESCRIPCIÓN DETALLADA

<Composición que tiene efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras>

En el presente documento se describe una composición que induce proliferación, acumulación de células T reguladoras, o tanto proliferación como acumulación de células T reguladoras. La composición es según la reivindicación 1. Las bacterias descritas en el presente documento se aislaron de muestras fecales humanas usando los métodos expuestos en los ejemplos 19 a 28.

El término "células T reguladoras" se refiere a células T que suprimen una respuesta inmunitaria anómala o excesiva y desempeñan un papel en la inmunotolerancia. Las células T reguladoras son normalmente células T positivas para CD4 y positivas para factor de transcripción Foxp3. Las células T reguladoras de la presente invención también incluyen células T reguladoras negativas para factor de transcripción Foxp3 que son células T positivas para CD4 productoras de IL-10.

El término "induce proliferación o acumulación de células T reguladoras" se refiere a un efecto de inducción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras, diferenciación que conduce a la proliferación y/o a la acumulación de células T reguladoras. Además, el significado de "induce proliferación o acumulación de células T reguladoras" incluye efectos *in vivo*, efectos *in vitro*, y efectos *ex vivo*. Se incluyen todos los efectos siguientes: un efecto de inducción de proliferación o acumulación *in vivo* de células T reguladoras a través de la administración o ingesta de las bacterias mencionadas anteriormente pertenecientes a la clase *Clostridia*; un efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras cultivadas provocando que las bacterias mencionadas anteriormente pertenecientes a la clase *Clostridia* actúen sobre las células T reguladoras cultivadas; y un efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras que se recogen de un organismo vivo y que están destinadas a introducirse posteriormente en un organismo vivo, tal como el organismo del que se obtuvieron u otro organismo, provocando que las bacterias mencionadas anteriormente pertenecientes a la clase *Clostridia* actúen sobre las células T reguladoras. El efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras puede evaluarse, por ejemplo, de la siguiente manera. Específicamente, las bacterias mencionadas anteriormente pertenecientes a la clase *Clostridia* se administran por vía oral a un animal de experimentación, tal como un ratón libre de gérmenes, luego se aíslan células positivas para CD4 en el colon, y se mide la razón de células T reguladoras contenidas en las células positivas para CD4 mediante citometría de flujo (véase el ejemplo 7).

Las células T reguladoras cuya proliferación o acumulación se induce mediante la composición de la presente invención son preferiblemente células T reguladoras positivas para factor de transcripción Foxp3 o células T reguladoras productoras de IL-10.

En la presente invención, "bacterias derivadas de humano" significa especies bacterianas que se han aislado de una muestra fecal o de una biopsia gastrointestinal obtenida de un individuo humano o cuyos progenitores se aislaron de una muestra fecal o de una biopsia gastrointestinal obtenida de un humano (por ejemplo, son progenie de bacterias obtenidas de una muestra fecal o una biopsia gastrointestinal). Por ejemplo, las especies bacterianas pueden haberse aislado previamente de una muestra fecal o de una biopsia gastrointestinal obtenida de un humano y cultivado durante un tiempo suficiente para generar progenie. Luego puede cultivarse o congelarse adicionalmente la progenie. Las bacterias derivadas de humano son comensales que se producen de manera natural que pueblan el tracto gastrointestinal de individuos humanos, preferiblemente individuos humanos sanos.

En la presente invención, el término "clase *Clostridia*" (como en "composiciones que contienen bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia*") se refiere a una clase de bacterias anaerobias estrictas Gram+ pertenecientes al filo *Firmicutes* que tienen la capacidad de forma esporas. Es importante destacar que, aunque actualmente la mayoría de las bacterias de esta clase se incluyen en el orden *Clostridiales*, esta categorización todavía se basa parcialmente en métodos antiguos y probablemente se redefinirá en el futuro basándose en los nuevos avances en las tecnologías de secuenciación que están permitiendo la secuenciación de los genomas completos de bacterias de esta clase. La tabla 2 proporciona un resumen de la categorización de 17 especies abundantes pertenecientes a la clase *Clostridia* que se han identificado por los inventores como fuertes inductores de Treg y cultivado *in vitro*. Todas estas especies se encuentran, según las normas de categorización actuales, en la familia *Clostridiaceae*, y pertenecen a las agrupaciones IV, XIVa, XVI, y XVIII.

En algunas realizaciones, las 17 ó 5 mezclas de especies enumeradas en la tabla 4 pueden usarse juntas (y administrarse en una o varias composiciones) para afectar a las células T reguladoras.

En algunas realizaciones, pueden combinarse las siguientes cepas (la composición comprende: cepa 1 (OTU136, especie más cercana: *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298), cepa 3 (OTU221, especie más cercana: *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799), cepa 4 (OTU9, especie más cercana: *Clostridium hathewayi*, *Clostridium saccharolyticum* WM1), cepa 6 (OTU21, especie más cercana: *Blautia coccooides*, *Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA*), cepa 7 (OTU166, especie más cercana: *Clostridium sp.*, *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613), cepa 8 (OTU73, especie más cercana: cf. *Clostridium sp.* MLG055, *Erysipelotrichaceae bacterium 2_2_44A*), cepa 9 (OTU174, especie más cercana: *Clostridium indolis*, *Anaerostipes caccae* DSM 14662), cepa 13 (OTU337, especie más cercana: *Anaerotruncus colihominis*, *Anaerotruncus colihominis* DSM 17241), cepa 14 (OTU314, especie más cercana: *Ruminococcus sp.* ID8, *Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA*), cepa 15 (OTU195, especie más cercana: *Clostridium lavalense*, *Clostridium asparagiforme* DSM 15981), cepa 16 (OTU306, especie más cercana: *Clostridium symbiosum*, *Clostridium symbiosum* WAL-14163), cepa 18 (OTU46, especie más cercana: *Clostridium ramosum*, *Clostridium ramosum*), cepa 21 (OTU87, especie más cercana: *Eubacterium contortum*, *Clostridium sp.* D5), cepa 26 (OTU281, especie más cercana: *Clostridium scindens*, *Lachnospiraceae bacterium 5_1_57FAA*), cepa 27 (OTU288, especie más cercana: *Lachnospiraceae bacterium A4*, *Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1*), cepa 28 (OTU344, especie más cercana: *Clostridium sp.* 316002/08, *Clostridiales bacterium 1_7_47FAA*), y cepa 29 (OTU359, especie más cercana: *Lachnospiraceae bacterium A4*, *Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1*) tal como se describe en la tabla 4.

En algunas realizaciones, pueden combinarse las siguientes cepas (la composición comprende: cepa 1 (OTU136, especie más cercana: *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298), cepa 4 (OTU9, especie más cercana: *Clostridium hathewayi*, *Clostridium saccharolyticum* WM1), cepa 16 (OTU306, especie más cercana: *Clostridium symbiosum*, *Clostridium symbiosum* WAL-14163), cepa 27 (OTU288, especie más cercana: *Lachnospiraceae bacterium A4*, *Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1*), y cepa 29 (OTU359, especie más cercana: *Lachnospiraceae bacterium A4*, *Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1*) tal como se describe en la tabla 4. En algunas realizaciones, pueden combinarse las siguientes cepas: cepa 6 (OTU21, especie más cercana: *Blautia coccooides*, *Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA*), cepa 8 (OTU73, especie más cercana: cf. *Clostridium sp.* MLG055, *Erysipelotrichaceae bacterium 2_2_44A*), cepa 13 (OTU337, especie más cercana: *Anaerotruncus colihominis*, *Anaerotruncus colihominis* DSM 17241), cepa 14 (OTU314, especie más cercana: *Ruminococcus sp.* ID8, *Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA*), y cepa 26 (OTU281, especie más cercana: *Clostridium scindens*, *Lachnospiraceae bacterium 5_1_57FAA*) tal como se describe en la tabla 4. En algunas realizaciones, pueden combinarse las siguientes cepas: cepa 3 (OTU221, especie más cercana: *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799), cepa 7 (OTU166, especie más cercana: *Clostridium sp.*, *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613), cepa 9 (OTU174, especie más cercana: *Clostridium indolis*, *Anaerostipes caccae* DSM 14662), cepa 15 (OTU195, especie más cercana: *Clostridium lavalense*, *Clostridium asparagiforme* DSM 15981), y cepa 28 (OTU344, especie más cercana: *Clostridium sp.* 316002/08, *Clostridiales bacterium 1_7_47FAA*) tal como se describe en la tabla 4. En algunas realizaciones, pueden combinarse las siguientes cepas: cepa 1 (OTU136, especie más cercana: *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298), cepa 2 (OTU46, especie más cercana: *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799), y cepa 3 (OTU221, especie más cercana: *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799) tal como se describe en la tabla 4.

El uso de múltiples cepas de las especies de bacterias mencionadas anteriormente, preferiblemente pertenecientes a la agrupación XIVA o a la agrupación IV de *Clostridium* en combinación, puede producir un excelente efecto sobre las células T reguladoras. Además de las bacterias pertenecientes a las agrupaciones XIVA y IV, también pueden usarse *Clostridium ramosum*, *Clostridium saccharogumia* (perteneciente a la agrupación XVIII) y cf. *Clostridium sp.* MLG055 (perteneciente a la agrupación XVI). Si se usa más de una cepa de bacterias (por ejemplo, una o más cepas pertenecientes a la agrupación XIVA, una o más cepas pertenecientes a la agrupación IV, una o más cepas pertenecientes a las agrupaciones XVIII o XVI, o una combinación de cualquiera de las anteriores), pueden variar ampliamente el número y la razón de las cepas usadas. El número y la razón que van a usarse pueden determinarse basándose en una variedad de factores (por ejemplo, el efecto deseado, tal como inducción o inhibición de la proliferación o acumulación de células T reguladoras; la enfermedad o afección que va a tratarse, prevenirse o reducirse en cuanto a gravedad; la edad y el género del receptor; las cantidades típicas de las cepas en humanos sanos).

Las cepas pueden estar presentes en una única composición, en cuyo caso pueden consumirse o ingerirse juntas (en una única composición), o pueden estar presentes en más de una composición (por ejemplo, cada una puede estar en una composición independiente), en cuyo caso pueden consumirse individualmente o pueden combinarse las composiciones y consumirse o ingerirse la combinación resultante (composiciones combinadas).

En algunas realizaciones, pueden usarse las combinaciones específicas de 5 ó 17 cepas descritas en la tabla 4 (la composición comprende combinaciones de 5 ó 17 cepas descritas en la tabla 4).

Las células de bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia*, tales como las descritas específicamente en el presente documento, pueden usarse en forma de esporas o en forma vegetativa. Desde el punto de vista de estabilidad frente a condiciones de temperatura y presión elevadas, semivida prolongada, facilidad de manipulación, resistencia a los antibióticos y no necesidad de almacenamiento y distribución en cadena fría, las bacterias pueden estar preferiblemente en forma de esporas. Desde el punto de vista del cumplimiento de las directrices de determinadas

organizaciones de fabricación que no toleran la contaminación por esporas en sus instalaciones, las bacterias pueden producirse alternativamente (y luego administrarse) en forma de células vegetativas.

El término "sustancia fisiológicamente activa derivada de bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia*" de la presente invención incluye sustancias contenidas en las bacterias, productos de secreción de las bacterias y metabolitos de las bacterias. Una sustancia fisiológicamente activa de este tipo puede identificarse purificando un componente activo a partir de las bacterias, un sobrenadante de cultivo de las mismas, o el contenido del tracto intestinal en el tracto intestinal de un ratón en el que sólo se colonizan bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia* mediante un método de purificación ya conocido.

El "tratamiento con cloroformo" de una muestra fecal obtenida de un humano es un método que aísla las bacterias en la muestra fecal que tienen la capacidad de formar esporas, y no está particularmente limitado, siempre que la fracción formadora de esporas se obtenga tratando heces de un humano con cloroformo (por ejemplo, cloroformo al 3 %), y tenga el efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras, incluyendo células T reguladoras de mamífero tales como células T reguladoras murinas y células T reguladoras humanas.

Cuando las "bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia*" mencionadas anteriormente se cultivan en un medio, las sustancias contenidas en las bacterias, los productos de secreción y los metabolitos producidos por las bacterias se liberan de las bacterias. El significado del principio activo "sobrenadante de cultivo de las bacterias" en la composición de la presente invención incluye tales sustancias, productos de secreción y metabolitos. El sobrenadante de cultivo no está particularmente limitado, siempre que el sobrenadante de cultivo tenga el efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras. Los ejemplos del sobrenadante de cultivo incluyen una fracción de proteínas del sobrenadante de cultivo, una fracción de polisacáridos del sobrenadante de cultivo, una fracción de lípidos del sobrenadante de cultivo, y una fracción de metabolitos de bajo peso molecular del sobrenadante de cultivo.

La composición bacteriana puede administrarse en forma de una composición farmacéutica, un complemento alimenticio, o un alimento o una bebida (que también puede ser un pienso), o puede usarse como reactivo para un experimento de modelo animal. La composición farmacéutica, el complemento alimenticio, el alimento o la bebida, y el reactivo inducen proliferación o acumulación de células T reguladoras. Un ejemplo presentado en el presente documento reveló que las células T reguladoras (células Treg) inducidas por bacterias o similares pertenecientes a la clase *Clostridia* suprimieron la proliferación de células T efectoras. La composición de la presente invención puede usarse adecuadamente como composición que tiene un efecto inmunosupresor. El efecto inmunosupresor puede evaluarse, por ejemplo, de la siguiente manera. Se provoca que las células T reguladoras aisladas de un animal de experimentación, tal como un ratón, al que se le administra por vía oral la composición de la presente invención, actúen sobre las células T efectoras (células CD4⁺ CD25⁺) aisladas del bazo, y se mide la capacidad de proliferación de las mismas usando la cantidad de ingesta de [³H]-timidina como índice (véase el ejemplo 14).

La composición bacteriana de la presente invención puede usarse, por ejemplo, como composición farmacéutica para prevenir o tratar (reducir, de manera parcial o completa, los efectos adversos de) una enfermedad autoinmunitaria, tal como enfermedad intestinal inflamatoria crónica, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, o enfermedad de Hashimoto; una enfermedad alérgica, tal como una alergia alimentaria, alergia al polen, o asma; una enfermedad infecciosa, tal como una infección por *Clostridium difficile*; una enfermedad inflamatoria tal como una enfermedad inflamatoria mediada por TNF (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, tal como reservoritis, una afección inflamatoria 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 ocurrir rechazo de tejidos; un complemento, un alimento, o una bebida para mejorar las funciones inmunitarias; o un reactivo para suprimir la proliferación o función de células T efectoras.

Los ejemplos más específicos de enfermedades diana para las que la composición es útil para su tratamiento (reducción de efectos adversos o prevención) incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades infecciosas, y rechazo en trasplantes de órganos, tales como enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esprúe, artritis autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra huésped después de trasplante de médula ósea, artrosis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus insulín dependiente, tiroiditis, asma, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, dermatitis atópica, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Graves, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schönlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome del choque tóxico, síndrome séptico, caquexia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, síndrome de deficiencia poliglandular de tipo I y síndrome de deficiencia poliglandular de tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria aguda (del adulto), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, clamidia, artropatía asociada con

Yersinia y *Salmonella*, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, colitis alérgica, alergia atópica, alergias alimentarias tales como alergia al cacahuete, alergia a los frutos secos, alergia al huevo, alergia a la leche, alergia a la soja, alergia al trigo, alergia al marisco, alergia a los crustáceos, o alergia a la semilla de sésamo, enfermedad ampollosa autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad por depósitos lineales de IgA, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica positiva para la prueba de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria criptogénica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), miocardiopatía dilatada, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial posinflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad del tejido conjuntivo asociada con enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad mixta del tejido conjuntivo asociada con enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada con enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada con enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso sistémico asociado con enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad de Sjögren asociada con enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hem siderosis asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial posinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 (hepatitis lupoide o autoinmunitaria clásica), hepatitis autoinmunitaria de tipo 2 (hepatitis por anticuerpos anti-LKM), hipoglucemia autoinmunomediada, resistencia a la insulina de tipo B con acantosis pigmentaria, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con trasplante de órganos, artrosis, colangitis esclerosante primaria, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmunitaria, enfermedad renal sin especificar, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o sin especificar, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), diabetes mellitus insulino dependiente, oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, arteritis/enfermedad de Takayasu, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmunitario bociogénico (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmunitario atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, rinitis alérgica (alergias al polen), anafilaxis, alergias a las mascotas, alergias al látex, alergias a los fármacos, rinoconjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, gastroenteritis eosinofílica, lupus eritematoso cutáneo, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, y gastroenteritis eosinofílica, y diarrea.

Los ejemplos adicionales de enfermedades diana para las que la composición es útil para su tratamiento incluyen cáncer de colon, fibrosis quística, celiaquía, diabetes de tipo 2, e inmunopatologías relacionadas con el autismo. Estas enfermedades se caracterizan por una reducción de las agrupaciones IV y XIV de *Clostridium* en la microbiota gastrointestinal.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden usarse como composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades infecciosas en un individuo cuya resistencia a las enfermedades infecciosas está alterada, por ejemplo, debido a daño que se debe a una inflamación excesiva provocada por la inmunidad o debido a una alteración del microbioma del paciente. Los ejemplos de patógenos infecciosos que alteran el mantenimiento o la recuperación de la homeostasis de un huésped, y que eventualmente producen tal daño tisular inmunopatológico, incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium* (que provocan la enfermedad tuberculosis), protozoos (que provocan la malaria), nematodos filarias (que provocan la enfermedad filariasis), *Schistosoma* (que provocan la esquistosomiasis), *Toxoplasma* (que provocan la enfermedad toxoplasmosis), *Leishmania* (que provocan la enfermedad leishmaniosis), VHC y VHB (que provocan la enfermedad hepatitis C y hepatitis B), y virus del herpes simple (que provocan la enfermedad herpes).

Las preparaciones farmacéuticas pueden formularse a partir de las composiciones bacterianas descritas mediante métodos de formulación de fármacos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición puede usarse por vía oral o parenteral en forma de cápsulas, comprimidos, pastillas, sobres, líquidos, polvos, gránulos, gránulos finos, preparaciones recubiertas con película, microgránulos, trociscos, preparaciones sublinguales, comprimidos masticables, preparaciones bucales, pastas, jarabes, suspensiones, elixires, emulsiones, linimentos, pomadas, emplastos, cataplasmas, sistemas de absorción transdérmica, lociones, inhalaciones, aerosoles, inyecciones, supositorios, y similares.

Para formular estas preparaciones, las composiciones bacterianas pueden usarse en combinación apropiada con portadores que son farmacológicamente aceptables o aceptables para su ingesta, tal como en un alimento o una bebida, incluyendo uno o más de los siguientes: agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, disolvente, un material de base, un emulsionante, un agente de suspensión, un tensioactivo, un estabilizador, un agente aromatizante, un compuesto aromático, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, un diluyente, un agente de ajuste de la tonicidad, un agente calmante, un agente de relleno, un agente disgregante, un agente tampón, un agente de recubrimiento, un lubricante, un colorante, un edulcorante, un agente espesante, un corrector

de aroma, un solubilizador, y otros aditivos.

Una preparación o formulación farmacéutica, y particularmente una preparación farmacéutica para administración oral, comprende un componente adicional que permite la administración eficiente de la composición bacteriana de la presente invención al colon, con el fin de inducir más eficientemente la proliferación o acumulación de células T reguladoras en el colon. Pueden usarse una variedad de preparaciones farmacéuticas que permiten la administración de la composición bacteriana al colon. Los ejemplos de las mismas incluyen composiciones sensibles al pH, más específicamente, formulaciones de sobre tamponadas o polímeros entéricos que liberan sus contenidos cuando el pH se vuelve alcalino después de que los polímeros entéricos pasen a través del estómago. Cuando se usa una composición sensible al pH para formular la preparación farmacéutica, la composición sensible al pH es preferiblemente un polímero cuyo umbral de pH de la descomposición de la composición es de entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,5. Un intervalo de valores numéricos de este tipo es un intervalo en el que el pH se desplaza hacia el lado alcalino en una porción distal del estómago y, por tanto, es un intervalo adecuado para su uso en la administración al colon.

Otra realización de una preparación farmacéutica útil para la administración de la composición bacteriana al colon es una que garantiza la administración al colon retrasando la liberación del contenido (por ejemplo, la composición bacteriana) en de aproximadamente 3 a 5 horas, que corresponde al tiempo de tránsito del intestino delgado. En una realización de una preparación farmacéutica para liberación retardada, se usa un hidrogel como cubierta. El hidrogel se hidrata y se hincha al entrar en contacto con el fluido gastrointestinal, con el resultado de que el contenido se libera eficazmente (se libera predominantemente en el colon). Las unidades de dosificación de liberación retardada incluyen composiciones que contienen fármaco que tienen un material que recubre o recubre selectivamente un fármaco o principio activo que va a administrarse. Los ejemplos de un material de recubrimiento selectivo de este tipo incluyen polímeros degradables *in vivo*, polímeros gradualmente hidrolizables, polímeros gradualmente solubles en agua y/o polímeros degradables por enzimas. Se dispone de una amplia variedad de materiales de recubrimiento para retrasar eficientemente la liberación e incluyen, por ejemplo, polímeros basados en celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, polímeros y copolímeros de ácido acrílico tales como polímeros y copolímeros de ácido metacrílico, y polímeros y copolímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona.

Los ejemplos de la composición que permite la administración al colon incluyen además composiciones bioadhesivas que se adhieren específicamente a la membrana mucosa colónica (por ejemplo, un polímero descrito en la memoria descriptiva de la patente estadounidense n.º 6.368.586) y composiciones en las que se incorpora un inhibidor de proteasas para proteger particularmente una preparación biofarmacéutica en los tractos gastrointestinales frente a la descomposición debida a una actividad de una proteasa.

Un ejemplo de un sistema que permite la administración al colon es un sistema de administración de una composición al colon por cambio de presión de tal manera que el contenido se libere utilizando un cambio de presión provocado por la generación de gas en la fermentación bacteriana en una porción distal del estómago. Un sistema de este tipo no está particularmente limitado, y un ejemplo más específico del mismo es una cápsula que tiene su contenido disperso en una base para supositorios y que está recubierta con un polímero hidrófobo (por ejemplo, etilcelulosa).

Otro ejemplo del sistema que permite la administración al colon es un sistema de administración de una composición al colon, descomponiéndose específicamente el sistema por una enzima (por ejemplo, una carbohidrato hidrolasa o una carbohidrato reductasa) presente en el colon. Un sistema de este tipo no está particularmente limitado, y los ejemplos más específicos del mismo incluyen sistemas que usan componentes alimenticios tales como polisacáridos no amiláceos, amilosa, goma xantana, y polímeros azoicos.

Cuando se usa como preparación farmacéutica, la composición bacteriana puede usarse en combinación con una composición farmacéutica ya conocida para su uso en inmunosupresión. En algunas realizaciones, la preparación farmacéutica puede comprender tanto la composición bacteriana como la composición farmacéutica ya conocida. Una composición farmacéutica conocida de este tipo no está particularmente limitada, y puede ser al menos una composición terapéutica seleccionada del grupo que consiste en corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistamínicos, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromoglicato disódico, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas (preferiblemente vacunas usadas para vacunación donde la cantidad de un alérgeno se aumenta gradualmente), inhibidores anti-TNF tales como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept, y combinaciones de los mismos. Es preferible usar estas composiciones terapéuticas en combinación con la composición bacteriana descrita en el presente documento. La composición bacteriana también puede usarse como adyuvante para mejorar la eficacia de una formulación de vacuna tal como una vacuna para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad alérgica.

La composición bacteriana puede usarse como alimento o bebida, tal como un alimento o una bebida saludable, un alimento o una bebida para lactantes, un alimento o una bebida para mujeres embarazadas, atletas, ancianos u otro

grupo especificado, un alimento funcional, a bebida, un alimento o una bebida para uso saludable especificado, un complemento alimenticio, un alimento o una bebida para pacientes, o un pienso. Los ejemplos específicos de los alimentos y las bebidas incluyen diversas bebidas tales como zumos, refrescos, bebidas de té, preparaciones de bebidas, bebidas de gelatina, y bebidas funcionales; bebidas alcohólicas tales como cervezas; alimentos que contienen hidratos de carbono tales como productos alimenticios de arroz, fideos, panes, y pastas; productos pastosos tales como jamones de pescado, salchichas, productos pastosos de marisco; productos de bolsa de retorta tales como curris, alimentos preparados con salsas amiláceas espesas, y sopas chinas; sopas; productos lácteos tales como leche, bebidas lácteas, helados, quesos, y yogures; productos fermentados tales como pastas de soja fermentadas, yogures, bebidas fermentadas, y encurtidos; productos de granos; diversos productos de confitería tales como productos de confitería occidentales incluyendo panecillos, galletas, y similares, productos de confitería japoneses incluyendo bollos al vapor rellenos de mermelada de judías, gelatinas blandas de judías azuki, y similares, dulces, chicles, gominolas, postres fríos incluyendo gelatinas, caramelos cremosos, y postres congelados; alimentos instantáneos tales como sopas instantáneas y sopas de soja instantáneas; alimentos para microondas; y similares. Además, los ejemplos también incluyen alimentos y bebidas saludables preparados en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, líquidos, pastas, y gelatinas. La composición de la presente invención puede usarse para animales, incluyendo humanos. Los animales, distintos de los humanos, no están particularmente limitados, y la composición puede usarse para diversos animales de ganado, aves de corral, mascotas, animales de experimentación, y similares. Los ejemplos específicos de los animales incluyen cerdos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, pollos, patos silvestres, avestruces, patos domésticos, perros, gatos, conejos, hámsteres, ratones, ratas, monos, y similares, pero los animales no se limitan a los mismos.

Sin querer restringirse a la teoría, aumenta más el peso corporal en los individuos en los que son relativamente abundantes las bacterias pertenecientes al grupo *Firmicutes* (el grupo al que pertenecen las agrupaciones IV y XIVA de *Clostridium*) que en los individuos en los que son relativamente abundantes las bacterias pertenecientes al grupo *Bacteroidetes* es grande. La composición bacteriana es capaz de acondicionar la absorción de nutrientes y mejorar la eficiencia alimentaria. Desde un punto de vista de este tipo, la composición bacteriana puede usarse para fomentar el aumento de peso corporal, o para una alimentación de alta eficiencia. Las enfermedades y afecciones que se beneficiarían de un aumento de peso corporal incluyen, por ejemplo, inanición, cáncer, SIDA, trastornos gastrointestinales (por ejemplo, celiaquía, úlcera péptica, enfermedad intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), pancreatitis, gastritis, diarrea), hipertiroidismo, infección, enfermedad renal, enfermedad cardíaca, enfermedad pulmonar, enfermedad del tejido conjuntivo, adelgazamiento provocado por medicamentos, anorexia, enfermedad de Addison, demencia, depresión, hipercalcemia, enfermedad de Parkinson y tuberculosis.

La adición de la composición bacteriana a un pienso libre de antibióticos hace posible aumentar el peso corporal de un animal que ingiere el pienso hasta un nivel igual o superior al conseguido por el animal que ingiere piensos que contienen antibióticos, y también hace posible reducir las bacterias patógenas en el estómago hasta un nivel igual a los animales que consumen piensos que contienen antibióticos típicos. La composición bacteriana puede usarse como componente de un pienso que no necesita la adición de antibióticos.

Además, a diferencia de las bacterias convencionales (*Lactobacillus* y *Bifidobacteria*) en uso comercial, que no son fáciles de incorporar en la producción ganadera, la presente composición bacteriana en forma de esporas puede microgranularse, pulverizarse, o mezclarse fácilmente con un pienso y también puede añadirse al agua de beber.

El pienso que comprende la composición bacteriana puede alimentarse a una amplia variedad de tipos de animales y animales de diversas edades y puede alimentarse a intervalos regulares o durante un cierto periodo (por ejemplo, al nacer, durante el destete, o cuando el animal se reubica o traslada).

La composición bacteriana puede usarse para fomentar el aumento de peso y potenciar la absorción de energía en humanos y no humanos (por ejemplo, animales de granja u otros animales de producción).

Los componentes activos bacterianos de la composición bacteriana pueden fabricarse usando técnicas de fermentación bien conocidas en la técnica. En una realización, los principios activos se fabrican usando fermentadores anaerobios, que pueden soportar el rápido crecimiento de especies bacterianas que pertenecen a la clase *Clostridia*. Los fermentadores anaerobios pueden ser, por ejemplo, reactores de tanque agitado o biorreactores de ondas desechables. Pueden usarse medios de cultivo tales como medio BL y medio EG, o versiones similares de estos medios desprovistos de componentes animales, para soportar el crecimiento de las especies bacterianas. El producto bacteriano puede purificarse y concentrarse a partir del caldo de fermentación mediante técnicas tradicionales, tales como centrifugación y filtración, y puede secarse y liofilizarse opcionalmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica.

Un alimento o una bebida que comprende una composición bacteriana descrita en el presente documento puede fabricarse mediante técnicas de fabricación bien conocidas en el campo técnico. Pueden añadirse uno o más componentes (por ejemplo, un nutriente) que son eficaces para la mejora de una función inmunitaria mediante un efecto inmunosupresor al alimento o a la bebida. Además, el alimento o la bebida puede combinarse con otro componente u otro alimento funcional que presente una función distinta de la función de la mejora de una función inmunitaria para servir de ese modo como alimento o bebida multifuncional.

Además, la composición bacteriana puede incorporarse en alimentos que requieren una etapa de procesamiento que puede destruir cepas probióticas habituales. Específicamente, la mayoría de las cepas probióticas utilizables comercialmente no pueden incorporarse en alimentos que necesitan procesarse, por ejemplo, mediante tratamiento térmico, almacenamiento a largo plazo, congelación, tensión mecánica, o tratamiento a alta presión (por ejemplo, formación por extrusión o formación por rodillo). Por otro lado, debido a la ventajosa naturaleza de formación de esporas, la composición bacteriana descrita en la presente memoria puede incorporarse fácilmente en tales alimentos procesados. Por ejemplo, la composición bacteriana en forma de esporas puede sobrevivir incluso en un alimento seco, y puede permanecer viva incluso después de ingerirse. La composición bacteriana puede soportar procedimientos de esterilización a baja temperatura, normalmente procesos llevados a cabo a una temperatura de desde aproximadamente 70 °C hasta aproximadamente 100 °C, ambos inclusive. La composición bacteriana puede incorporarse en productos lácteos que requieren una etapa de pasteurización. Además, la composición bacteriana puede soportar almacenamiento a largo plazo de muchos años; procesamiento a alta temperatura tal como cocción y ebullición; procesamiento a baja temperatura tal como congelación y almacenamiento en frío; y tratamientos a alta presión tales como formación por extrusión y formación por rodillo.

Muchos tipos de alimentos que necesitan procesarse en tales condiciones rigurosas incluyen alimentos que necesitan procesarse en un horno microondas para ser comestibles (por ejemplo, harina de avena), alimentos que necesitan hornearse para ser comestibles (por ejemplo, una magdalena), alimentos que necesitan someterse a un tratamiento de esterilización a alta temperatura durante un corto periodo de tiempo para ser comestibles (por ejemplo, leche), y alimentos que necesitan calentarse para ser bebibles (por ejemplo, té caliente).

La cantidad de la composición bacteriana que va a administrarse o ingerirse puede determinarse empíricamente, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el peso corporal, el género, los síntomas y las condiciones de salud de un individuo que la recibirá, así como la clase de composición bacteriana (un producto farmacéutico, un alimento o una bebida) que va a administrarse o ingerirse. Por ejemplo, la cantidad por administración o ingestión es generalmente de 0,01 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal, y, en realizaciones específicas, de 1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal.

La composición bacteriana puede administrarse a un individuo una sola vez, o puede administrarse más de una vez. Si la composición se administra más de una vez, puede administrarse de manera regular (por ejemplo, una vez al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada 6 meses, o una vez al año), o según sea necesario o de manera irregular. La frecuencia de administración apropiada (que puede depender de la genética del huésped, la edad, el género y el estado de salud o patológico del sujeto, entre otros factores) puede determinarse empíricamente. Por ejemplo, a un paciente puede administrársele una dosis de la composición, y los niveles de las cepas bacterianas de la composición en muestras fecales obtenidas del paciente pueden medirse en diferentes momentos (por ejemplo, después de 1 día, después de 2 días, después de 1 semana, después de 2 semanas, después de 1 mes). Cuando los niveles de bacterias disminuyen, por ejemplo, hasta la mitad de su valor máximo, puede administrarse una segunda dosis, y así sucesivamente.

Un producto que comprende la composición bacteriana (un producto farmacéutico, un alimento o una bebida, o un reactivo) o un manual del mismo puede ir acompañado de un documento o una declaración que explique que el producto puede usarse para suprimir la inmunidad (incluyendo una declaración de que el producto tiene un efecto inmunosupresor y una declaración de que el producto tiene un efecto de supresión de la proliferación o función de células T efectoras). En este caso, la "provisión de la nota al producto o al manual del mismo" significa que el documento o la declaración se proporciona a un cuerpo principal, un recipiente, un envase, o similar, del producto, o la nota se proporciona a un manual, un prospecto, un folleto, u otros objetos impresos, que divulgan información sobre el producto.

<Inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras>

Tal como se describió anteriormente, y tal como se muestra en los ejemplos, la administración de la composición bacteriana a un individuo hace posible inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en el individuo. Esto proporciona una composición para su uso en un método de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método: administrar, al individuo, la composición de la presente invención. La composición bacteriana se administra (proporciona) al individuo en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado de inducción de proliferación, acumulación, o tanto proliferación como acumulación de células T reguladoras. Puede administrarse a un individuo que necesita tratamiento, reducción de la gravedad o prevención de al menos una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad alérgica, y una enfermedad infecciosa.

Obsérvese que el "individuo" o "sujeto" puede estar en un estado sano o un estado enfermo. El método puede comprender además la etapa opcional de administrar al menos un antibiótico (uno, uno o más) antes de, o en combinación con, la composición bacteriana. El antibiótico administrado puede ser, por ejemplo, uno que facilita la recolonización del intestino por bacterias Gram-positivas de la clase *Clostridia*, tal como un antibiótico que reduce las bacterias Gram-negativas. Los ejemplos de tales antibióticos incluyen antibióticos aminoglucósidos (amikacina,

gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina, y paromomicina), antibióticos cefalosporinas (cefactor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, y cefoxotina), sulfonamidas, ampicilina, y estreptomycin.

- 5 Además, una composición prebiótica tal como cáscara de almendra, inulina, oligofructosa, rafinosa, lactulosa, pectina, hemicelulosa (tal como xiloglucano y alfa-glucanos), amilopectina y almidón resistente que no se descomponen en el tracto gastrointestinal superior y fomentan el crecimiento de microbios intestinales en el tracto intestinal, así como factores de crecimiento tales como acetil-CoA, biotina, melaza de remolacha y extractos de levadura, contribuyen preferentemente a la proliferación de las especies bacterianas en la composición
- 10 pertenecientes a la clase *Clostridia*. La inducción de proliferación y/o acumulación de células T reguladoras en un individuo puede comprender administrar, al individuo, al menos una sustancia seleccionada de las anteriores en combinación con la composición bacteriana. También se contempla en el presente documento una composición que comprende la composición bacteriana y una composición prebiótica.
- 15 El antibiótico descrito anteriormente y la composición prebiótica o el factor de crecimiento descritos anteriormente pueden usarse en combinación. Además, puede administrarse una composición terapéutica a un individuo junto con la composición bacteriana sola o en combinación con un antibiótico, una composición prebiótica y/o un factor de crecimiento.
- 20 Una composición terapéutica puede ser, por ejemplo, una composición terapéutica seleccionada del grupo que consiste en corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistamínicos, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromoglicato disódico, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas
- 25 (preferiblemente, vacunas usadas para vacunación donde la cantidad de un alérgeno se aumenta gradualmente), inhibidores anti-TNF tales como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept, y combinaciones de los mismos. Estas composiciones terapéuticas pueden administrarse antes de, en combinación con, o después de, la administración de la composición bacteriana y opcionalmente también en combinación con un antibiótico, una composición prebiótica, un factor de crecimiento, o cualquier combinación de un antibiótico, una
- 30 composición prebiótica y un factor de crecimiento.

No hay limitación particular impuesta sobre el uso combinado de la composición terapéutica con la composición bacteriana. Por ejemplo, la composición bacteriana y la composición terapéutica se administran por vía oral o parenteral a un individuo de manera simultánea o secuencial/individual en cualquier momento apropiado.

- 35 Si la administración de la composición bacteriana induce la proliferación y/o acumulación de células T reguladoras puede determinarse usando, como índice, el aumento o refuerzo de al menos uno de los siguientes: el número de células T reguladoras, la razón de células T reguladoras en el grupo de células T del colon, una función de las células T reguladoras, o la expresión de un marcador de células T reguladoras. Como índice de la inducción de
- 40 proliferación o acumulación de células T reguladoras, un enfoque específico es la medición del recuento o porcentaje de Treg que expresan Foxp3 en una muestra del paciente, tal como una biopsia o una muestra de sangre, la promoción (potenciación) de la expresión de IL-10, la promoción (potenciación) de expresión de CTLA4, la promoción (potenciación) de la expresión de IDO, la supresión de la expresión de IL-4, o la colonización de un individuo con la composición bacteriana administrada.

- 45 Los métodos para detectar tal expresión incluyen transferencia de tipo Northern, RT-PCR y transferencia por puntos para la detección de la expresión génica al nivel de transcripción; ELISA, radioinmunoensayos, inmunotransferencia, inmunoprecipitación y citometría de flujo para la detección de la expresión génica al nivel de traducción.

- 50 Las muestras que pueden usarse para medir un índice de este tipo incluyen tejidos y fluidos obtenidos de un individuo, tales como sangre, obtenidos en una biopsia, y una muestra fecal.

<Predicción de la respuesta de un individuo a la composición bacteriana mediante la monitorización de la respuesta del individuo al tratamiento con la composición>

- 55 Puede determinarse una cantidad (por ejemplo, recuento) o el porcentaje de al menos una especie bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298, *Clostridium ramosum*, *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium saccharolyticum* WM1, *Bacteroides* sp. MANG, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium scindens*, *Lachnospiraceae bacterium* 5_1_57FAA, *Lachnospiraceae bacterium* 6_1_63FAA, *Clostridium* sp. 14616, *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613, cf. *Clostridium* sp. MLG055, *Erysipelotrichaceae bacterium* 2_2_44A, *Clostridium indolis*, *Anaerostipes caccae*, *Clostridium bolteae*, *Lachnospiraceae bacterium* DJF_VP30, *Lachnospiraceae bacterium* 3_1_57FAA_CT1, *Anaerotruncus colihominis*, *Anaerotruncus colihominis* DSM 17241, *Ruminococcus* sp. ID8, *Lachnospiraceae bacterium* 2_1_46FAA, *Clostridium lavalense*, *Clostridium asparagiforme* DSM 15981, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium symbiosum* WAL-14163, *Eubacterium contortum*, *Clostridium* sp. D5, *Oscillospiraceae bacterium* NML 061048, *Oscillibacter valericigenes*, *Lachnospiraceae bacterium* A4, *Clostridium* sp. 316002/08, *Clostridiales*

bacterium 1_7_47FAA, *Blautia cocoides* y *Anaerostipes caccae* DSM 14662 en una muestra del paciente (por ejemplo, una biopsia colónica o una muestra fecal). Cuando el porcentaje o recuento de las bacterias seleccionadas de la lista en un individuo es menor que un valor de nivel inicial obtenido realizando una determinación similar en un individuo sano (por ejemplo, un individuo que no tiene/no se ha identificado como que tiene una enfermedad o afección para la que la composición bacteriana es un posible tratamiento, tal como una enfermedad autoinmunitaria, una afección alérgica, cáncer, rechazo de órganos), se determina que es probable que el individuo sea sensible a la composición bacteriana. Esta determinación puede usarse, por ejemplo, por un médico para determinar si es probable que un individuo o paciente se beneficie del tratamiento con la composición bacteriana, o para seleccionar a un individuo o paciente para su inclusión en un ensayo clínico. El médico puede administrar entonces la composición bacteriana al individuo o paciente basándose en la determinación de que es probable que el individuo o paciente se beneficie del tratamiento. Esta determinación también puede usarse para monitorizar la respuesta de un individuo al tratamiento con las composiciones bacterianas descritas, en la que un mayor valor de la determinación después del tratamiento con la composición bacteriana (en comparación con una determinación antes del tratamiento) indica que el individuo ha respondido favorablemente al tratamiento (por ejemplo, es un indicador positivo de colonización exitosa e inmunosupresión potenciada en el individuo). Opcionalmente, el pronóstico y la monitorización pueden comprender además la etapa de medir, en las muestras del individuo, los porcentajes o recuentos absolutos de otras especies comensales perteneciente a las agrupaciones IV y XIVa de *Clostridium* que no están presentes en la composición bacteriana, en la que valores inferiores al nivel inicial antes del tratamiento indican una mayor probabilidad de una respuesta positiva al tratamiento, y en la que un valor aumentado después del tratamiento indica que el individuo ha respondido favorablemente al tratamiento. Pueden usarse una variedad de métodos conocidos para determinar la composición de la microbiota. Por ejemplo, puede usarse secuenciación de ARNr 16S.

<Composición de adyuvante de vacuna y método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmunitaria usando la composición de vacuna>

Tal como se describió anteriormente, y tal como se muestra en los ejemplos, la inducción de células Treg en el colon por bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia* tiene un papel importante en las respuestas inmunitarias sistémicas y locales. La composición bacteriana también puede usarse como adyuvante para mejorar la eficacia de una formulación de vacuna. En una realización, la composición bacteriana puede usarse como adyuvante para una vacuna para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad alérgica (por ejemplo, como adyuvante para un protocolo de vacunación donde la cantidad de un alérgeno se aumenta gradualmente).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas incluyen las descritas como "ejemplos específicos de enfermedades diana" en la sección <Composición que tiene efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras>.

Otra realización

La composición bacteriana también puede administrarse a un individuo que también está recibiendo un tratamiento con antibióticos. Los presentes inventores han demostrado que los antibióticos que actúan contra bacterias Gram+, tales como vancomicina o metronidazol, pueden eliminar eficazmente o reducir en gran medida las especies bacterianas pertenecientes a la clase *Clostridia* del tracto gastrointestinal de mamíferos y posteriormente disminuir los niveles de células T reguladoras (ejemplo 5, figura 30). Sin querer restringirse a la teoría, el papel clave de las bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia* en la conservación de la inmunotolerancia indica fuertemente que su ausencia o niveles reducidos pueden desempeñar un papel clave en enfermedades autoinmunitarias caracterizadas por fallos de inmunotolerancia. Por consiguiente, los individuos que se someten a series de antibióticos contra las bacterias Gram+ (por ejemplo, individuos que están tratándose de infecciones con patógenos tales como *C. difficile* y *Giardia*), que están un alto riesgo de experimentar una pérdida de las bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia* y, por tanto, experimentar déficits de inmunotolerancia, pueden "repoblarse" de manera preventiva a través del uso de la composición bacteriana. La composición bacteriana puede administrarse antes de, simultáneamente con, o después del tratamiento con antibióticos, pero preferiblemente se administra simultáneamente o después del tratamiento con antibióticos. La composición bacteriana se administra preferiblemente en forma de esporas, para mejorar su resistencia a los antibióticos residuales. Los antibióticos contra bacterias Gram-positivas incluyen, pero no se limitan a, vancomicina, metronidazol, linezolid, ramoplanina, fidaxomicina, antibióticos cefalosporinas (cefalexina, cefuroxima, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo y ceftobiprol); antibióticos fluoroquinolonas (cipro, Levaquin, floxina, tequina, avelox y norflox); antibióticos tetraciclinas (tetraciclina, minociclina, oxitetraciclina y doxiciclina); antibióticos penicilinas (amoxicilina, ampicilina, penicilina V, dicloxacilina, carbenicilina, vancomicina y meticilina); y antibióticos carbapenémicos (ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina y meropenem).

<Métodos para seleccionar organismos inductores de Treg>

Las bacterias capaces de inducir Treg que van a usarse en la composición reivindicada pueden obtenerse mediante (1) aislar la fracción formadora de esporas bacteriana de una muestra fecal o de biopsia obtenida de un mamífero,

preferiblemente un humano (por ejemplo, mediante tratamiento con cloroformo o mediante tratamiento térmico), (2) opcionalmente, administrar por vía oral la fracción formadora de esporas a un mamífero no humano, preferiblemente un mamífero no humano libre de gérmenes; (3) opcionalmente, obtener una muestra fecal del mamífero no humano, diluir la muestra fecal (por ejemplo, diluirla en volumen en un factor de 10, 100, 1.000 ó 10.000), produciendo de ese modo una muestra fecal diluida, y administrar por vía oral la muestra diluida a un segundo mamífero no humano libre de gérmenes, en la que la etapa (3) opcional puede repetirse más de una vez, (4) sembrar en placa diluciones en serie, en condiciones aerobias o condiciones estrictamente anaerobias, o bien de la fracción formadora de esporas obtenida en (1) o bien de una muestra del contenido intestinal del mamífero no humano de (3), y (5) recoger una colonia individual de la placa de cultivo. La colonia puede evaluarse adicionalmente para determinar la capacidad de las bacterias para inducir proliferación de células T reguladoras y/o acumulación de células T reguladoras usando métodos conocidos, tales como los descritos en los ejemplos.

Lo siguiente son ejemplos, que describen aspectos específicos. No se pretende que sean limitativos en modo alguno.

Obsérvese que los ratones usados en los ejemplos se prepararon o produjeron de la siguiente manera. En la siguiente descripción, los ratones pueden denominarse "SPF" o "GF". "SPF" y "GF" indican que los ratones se mantuvieron en ausencia de bacterias patógenas específicas (libres de patógenos específicos, SPF) y que los ratones se mantuvieron en condiciones libres de gérmenes (GF), respectivamente.

<Ratones>

Se adquirieron ratones C57BL/6, Balb/c e IQI mantenidos en condiciones SPF o GF de Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Japón), JAPAN SLC, INC. (Japón), CLEA Japan, Inc. (Japón), o The Jackson Laboratory (EE. UU.). Se criaron ratones GF y ratones gnotobióticos y se mantuvieron dentro de la instalación gnotobiótica de la Universidad de Tokio, Instituto Central Yakult para la Investigación Microbiológica, o Sankyo Labo Service Corporation, Inc. Se produjeron ratones *Myd88^{-/-}*, *Rip2^{-/-}* y *Card9^{-/-}* tal como se describe en NPL 1 a 3, y se sometieron a retrocruzamiento durante 8 generaciones o más, de modo que se logró un acervo genético C57BL/6. Se adquirieron ratones Fxp3^{eGFP} de The Jackson Laboratory.

<Ratones *Il10^{Venus}*>

Para formar un locus bicistrónico que codificara tanto para *Il10* como para *Venus* bajo el control de un promotor de *Il10*, en primer lugar se creó un constructo de direccionamiento. Específicamente, se insertó un casete (casete IRES-*Venus*-señal de poliA de SV40, véase el documento no de patente 4), que se preparó a partir de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), una proteína fluorescente amarilla (*Venus*) y una señal de poliA de SV40 (poliA de SV40) y que se dispuso próximo a un gen resistente a neomicina (*neo*), entre un codón de parada y una señal de poliA (exón 5) de un gen *Il10*. A continuación, se usó el constructo de direccionamiento obtenido para provocar recombinación homóloga con la región de gen *Il10* en el genoma de ratones. Por tanto, se produjeron ratones *Il10^{Venus}* que tenían un alelo de *Il10^{Venus}* (véase la figura 1). Obsérvese que, en la figura 1, "tk" representa un gen que codifica para timidina cinasa, "neo" representa el gen resistente a neomicina, y "BamH1" representa un sitio de escisión por la enzima de restricción BamH1.

Se extrajeron ADN genómicos a partir de los ratones *Il10^{Venus}*, se trataron con BamH1, y se sometieron a transferencia de tipo Southern mediante el uso de una sonda mostrada en la figura 1. La figura 2 muestra los resultados obtenidos. Se detectaron alelos de tipo natural y de *Il10^{Venus}* como bandas que tenían tamaños de 19 kb y 5,5 kb, respectivamente. Por tanto, tal como resulta evidente a partir de los resultados obtenidos, se produjo recombinación homóloga en el genoma de los ratones *Il10^{Venus}*.

Además, se clasificaron células CD4⁺ *Venus⁻* o células CD4⁺ *Venus⁺* en la lámina propia del colon de los ratones *Il10^{Venus}* mediante el uso de un dispositivo FACS Aria. Luego, se llevó a cabo RT-PCR en tiempo real en un sistema ABI 7300 mediante un método que se describirá más adelante, para determinar la cantidad de ARNm de IL-10 expresado. Se halló que, puesto que el desarrollo del ARNm de IL-10 se detectó sólo en las células CD4⁺ *Venus⁺*, la expresión de ARNm de IL-10 en los ratones *Il10^{Venus}* se reflejó correctamente en la expresión de *Venus*. Obsérvese que los estados libres de gérmenes de tales ratones *Il10^{Venus}* se establecieron en el Instituto Central para Animales de Experimentación (Kawasaki, Japón). Los ratones *Il10^{Venus}* en los estados libres de gérmenes se mantuvieron en dispositivos de aislamiento de vinilo en Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Tokio, Japón), y se usaron en los siguientes ejemplos.

Los experimentos y los análisis en los ejemplos se llevaron a cabo de la siguiente manera.

<Método para la colonización de ratones con bacterias murinas y análisis de los mismos>

Según la descripción en NPL 5 y 6, se produjeron ratones en los que se colonizaron SFB o *Clostridium*. Se disolvieron los contenidos cecales o las heces de los ratones gnotobióticos obtenidos en agua estéril o una disolución de dilución anaerobia. Se administraron por vía oral a ratones GF los contenidos cecales o las heces

disueltos como tales o después de un tratamiento con cloroformo. Se cultivaron independientemente entre sí tres cepas de *Lactobacillus* y 16 cepas de *Bacteroides* en un medio de agar BL o EG de manera anaerobia. Se recogieron las bacterias cultivadas, se suspendieron en un caldo TS anaerobio, y se administraron por vía oral de manera forzada a ratones GF. Se evaluó el estado de la colonización de las bacterias en los ratones mediante observación microscópica realizada en una preparación de frotis de sedimentos fecales.

<Aislamiento de linfocitos de lámina propia intestinal y citometría de flujo>

Se recogieron el intestino delgado y el colon y se abrieron longitudinalmente. También se aisló el ciego, y el contenido cecal se congeló directamente a -80 °C o se suspendió en 2 ml de PBS, luego se le añadió glicerol al 40 % (concentración final del 20 %), se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se lavaron el colon y el intestino delgado en PBS para eliminar todo el contenido luminal y se agitaron en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía EDTA 5 mM durante 20 min a 37 °C. Después de retirar las células epiteliales, las capas musculares y el tejido graso usando unas pinzas, se cortaron las capas de lámina propia en trozos pequeños y se incubaron con RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 4 %, colagenasa D 1 mg/ml, dispasa 0,5 mg/ml y ADNasa I 40 microgramos/ml (todos ellos de Roche Diagnostics) durante 1 h a 37 °C en un baño de agua con agitación. Se lavaron los tejidos digeridos con HBSS que contenía EDTA 5 mM, se resuspendieron en 5 ml de Percoll al 40 % (GE Healthcare) y se dispusieron en 2,5 ml de Percoll al 80 % en un tubo Falcon de 15 ml. Se realizó separación por gradiente de Percoll mediante centrifugación a 800 g durante 20 min a 25 °C. Se recogieron los linfocitos de lámina propia de la interfase del gradiente de Percoll y se suspendieron en PBS helada. Para el análisis de células T reguladoras, se marcaron los linfocitos aislados con el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Violet (Invitrogen) para excluir las células muertas en el análisis. Se lavaron las células con tampón de tinción que contenía PBS, FBS al 2 %, EDTA 2 mM y NaN₃ al 0,09 % y se tiñó la superficie de CD4 con Ac anti-CD4 marcado con PECy7 (RM4-5, BD Biosciences). Se realizó tinción intracelular de Foxp3 y Helios usando el Ac anti-Foxp3 marcado con Alexa700 (FJK-16s, eBioscience), el Ac anti-Helios marcado con Alexa647 (22F6, eBioscience) y el conjunto de tampón de tinción de Foxp3 (eBioscience). Para el análisis de células Th1 y Th17, se estimularon los linfocitos aislados durante 4 horas con 12-miristato-13-acetato de forbol 50 ng/ml (PMA, Sigma) y ionomicina 1 microgramo/ml (Sigma) en presencia de GolgiStop (BD Biosciences). Después de la incubación durante 4 horas, se lavaron las células en PBS, se marcaron con el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Violet y se tiñó la superficie de CD4 con Ac anti-CD4 marcado con PECy7. Se lavaron las células, se fijaron en Cytfix/Cytoperm, se permeabilizaron con tampón de permeación/lavado (BD Biosciences), y se tiñeron con el Ac anti-IL-17 marcado con APC (eBio17B7, eBioscience) y el Ac anti-IFN-gamma marcado con FITC (XMG1.2, BD Biosciences). Se analizaron las células teñidas con Ac con un dispositivo LSR Fortessa (BD Biosciences), y se analizaron los datos usando el software Flow Jo (Treestar).

<RT-PCR en tiempo real>

A partir de un ARN preparado usando el minikit RNeasy (Qiagen), se sintetizó un ADNc mediante el uso de una transcriptasa inversa MMV (Promega KK). Se analizó el ADNc obtenido mediante RT-PCR en tiempo real usando la mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems) y el sistema de PCR en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems), o RT-PCR en tiempo real usando SYBR Premix Ex Taq (TAKARA) y el dispositivo LightCycler 480. Para cada muestra, se normalizó un valor obtenido para la cantidad de GAPDH. Se diseñó un conjunto de cebadores mediante el uso de Primer Express versión 3.0 (Applied Biosystems), y se seleccionaron aquellos que mostraban una identidad de secuencia del 90 % o superior en una evaluación inicial. El conjunto de cebadores usado fue de la siguiente manera:

Foxp3

5'-GGCAATAGTTCCTTCCCAGAGTT-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-GGGTCGCATATTGTGGTACTTG-3' (SEQ ID NO: 2)

CTLA4

5'-CCTTTTGTAGCCCTGCTCACTCT-3' (SEQ ID NO: 3)

5'-GGGTCACCTGTATGGCTTCAG-3' (SEQ ID NO: 4)

GITR

5'-TCAGTGCAAGATCTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-ACACCGGAAGCCAAACACA-3' (SEQ ID NO: 6)

IL-10

5'-GATTTTAATAAGCTCCAAGACCAAGGT-3' (SEQ ID NO: 7)

5'-CTTCTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA-3' (SEQ ID NO: 8)

GAPDH

5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3' (SEQ ID NO: 9)

5'-TCTCCACTTTGCCACTGCAA-3' (SEQ ID NO: 10)

Mmp2

5'-GGACATTGTCTTTGATGGCA-3' (SEQ ID NO: 11)

5'-CTTGTCACGTGGTGTCACTG-3' (SEQ ID NO: 12)

Mmp9

5'-TCTCTGGACGTCAAATGTGG-3' (SEQ ID NO: 13)

5'-GCTGAACAGCAGAGCCTTC-3' (SEQ ID NO: 14)

Mmp13

5'-AGGTCTGGATCACTCCAAGG-3' (SEQ ID NO: 15)

5'-TCGCCTGGACCATAAAGAA-3' (SEQ ID NO: 16)

Ido1

5'-AGAGGATGCGTGACTTTGTG-3' (SEQ ID NO: 17)

5'-ATACAGCAGACCTTCTGGCA-3' (SEQ ID NO: 18).

<Preparación y cultivo de células epiteliales del intestino grueso (IEC)>

5 En primer lugar, se recogió el colon, se cortó longitudinalmente, y se enjuagó con PBS. Posteriormente, se trató el colon con ditioneitol (DTT) 1 mM a 37 °C durante 30 minutos en un agitador, y luego se agitó con vórtice durante un minuto para alterar la integridad epitelial. Se recogieron las células epiteliales intestinales (IEC) liberadas, y se suspendieron en 5 ml de Percoll al 20 %. Se dispuso en capas la suspensión en 2,5 ml de Percoll al 80 % en un tubo Falcon de 15 ml. Luego, se centrifugó el tubo a 25 °C y 780 g durante 20 minutos para realizar la separación de células mediante centrifugación por gradiente de densidad de Percoll. Se recogieron las células de la interfase, y se usaron como IEC colónicas (pureza: 90 % o superior, viabilidad: 95 %). Se suspendieron las IEC obtenidas recogidas en RPMI que contenía FBS al 10 %, y se cultivaron 1×10^5 células de las IEC en una placa de 24 pocillos durante 24 horas. Después de eso, se recogió el sobrenadante de cultivo, y se midió para determinar el nivel de TGF-beta1 activo mediante ELISA (Promega).

Mientras tanto, para cultivar las células T *in vitro*, se cultivaron $1,5 \times 10^5$ células T CD4⁺ esplénicas purificadas mediante MACS en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, junto con un medio acondicionado al 50 % en el que se cultivaron IEC aisladas de ratones GF o ratones colonizados con *Clostridium*, y con hIL-2 25 ng/ml (Peprotech), en presencia o ausencia de 25 microgramos/ml de un anticuerpo anti-TGF-beta (R&D). Obsérvese que se unieron 10 microgramos/ml de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 (BD Bioscience) a la placa de fondo redondo. Después de un cultivo de 5 días, se recogieron las células T CD4⁺ y se sometieron a una PCR en tiempo real.

<Modelo experimental de colitis>

Se administró por vía oral una suspensión fecal procedente de ratones colonizados con *Clostridium* a ratones C57BL/6 (2 semanas de edad), que se criaron en un entorno convencional durante seis semanas.

30 Para preparar un modelo de colitis inducida por DSS, se administró DSS (calidad de reactivo, sal de DSS, peso molecular = de 36 a 50 kD, fabricado por MP Biomedicals) al 2 % (p/v), junto con agua de beber, a los ratones durante seis días.

35 Mientras tanto, para preparar un modelo de colitis inducida por oxazolona, se sensibilizaron previamente los ratones mediante la aplicación transdérmica, a los ratones, de 150 microlitros de una disolución de oxazolona (4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona, Sigma-Aldrich) al 3 %/etanol al 100 %. Cinco días después, se administraron por vía intrarrectal 150 microlitros de una disolución de oxazolona al 1 %/etanol al 50 % de nuevo a los ratones previamente sensibilizados bajo una ligera anestesia. Obsérvese que la administración intrarrectal se realizó mediante el uso de un catéter 3.5F.

Se analizó diariamente el peso corporal, la sangre oculta en heces, hemorragia visible a simple vista (sangre macroscópica) y la dureza de las heces de cada ratón. Además, se evaluaron numéricamente el porcentaje de pérdida de peso corporal, la hemorragia intestinal (sin hemorragia, sangre oculta en heces (prueba de sangre oculta en heces positiva) o hemorragia visible a simple vista) y la dureza de las heces (heces normales, heces sueltas o diarrea), y se calculó el índice de actividad de enfermedad (DAI) según la descripción en "S. Wirtz, C. Neufert. B. Weigmann, M. F. Neurath, Nat Protoc 2, 541 (2007)".

<Reacción de IgE específica de OVA>

A ratones SPF BALB/c se les inoculó una suspensión fecal procedente de ratones colonizados con *Clostridium* (2 semanas de edad), y se criaron en un entorno convencional. Luego, se inyectaron por vía intraperitoneal 1 microgramo de OVA (grado V, Sigma) y 2 mg de alumbre (Thermo Scientific), 0,2 ml en total, a los ratones (a sus edades de 4 semanas y 6 semanas). Se recogieron sueros cada semana de los ratones en la raíz de su cola, y se midió la IgE específica de OVA mediante ELISA (Chondrex). Luego, a sus edades de 8 semanas, se recogieron células esplénicas, se inocularon en una placa de 96 pocillos a 1×10^6 células por pocillo, y se estimularon con OVA (100 microgramos/ml) durante tres días. Después de eso, se recogió el sobrenadante de cultivo, y se midió para determinar los niveles de IL-4 e IL-10 mediante ELISA (R&D).

<Análisis estadístico>

Se evaluó la diferencia entre los grupos de control y experimentales mediante la prueba de la t de Student.

<Tratamiento con cloroformo e inoculación oral de muestras fecales en ratones GF>

Se suspendieron heces humanas (2 g) de un voluntario sano (japonés, varón, 29 años) con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se hicieron pasar a través de un filtro celular de 70 micrómetros para eliminar grumos y residuos. Luego, se mezcló la suspensión fecal con o sin cloroformo (concentración final del 3 %), y se incubó en un baño de agua con agitación durante 60 min. Se inocularon por vía oral las suspensiones fecales sin tratamiento con cloroformo en ratones libres de gérmenes (GF) (250 microlitros/ratón). Después de la evaporación del cloroformo mediante burbujeo con gas de N_2 durante 30 min, se inocularon las alícuotas que contenían fracción resistente a cloroformo (formadora de esporas) de bacterias intestinales humanas en ratones GF IQI. Cada grupo de ratones ex-GF se mantuvo por separado en un dispositivo de aislamiento de vinilo durante 3 ó 4 semanas.

<Experimento de coalojamiento>

Para evaluar si las bacterias humanas inductoras de Treg pueden transmitirse horizontalmente, se coalojaron ratones GF IQI durante 4 semanas con ratones ex-GF colonizados con heces humanas tratadas con cloroformo (ratones del ejemplo 21) en un dispositivo de aislamiento de vinilo (6 ratones, designados como ratón #D1 hasta #D6).

<Inoculación de contenido cecal diluido en ratones GF>

Se suspendió el contenido cecal congelado procedente de ratones ex-GF a los que se les inocularon heces humanas tratadas con cloroformo (#C4) en 10 veces el volumen (p/v) de PBS, se hizo pasar a través de un filtro celular de 70 micrómetros y se trató con cloroformo al 3 %. Luego, se diluyó la suspensión 2000 veces (para 4 ratones, designados como ratón #E1 hasta #E4) o 20000 veces (para 8 ratones, designados como ratón #F1 hasta #F8) con PBS y se inoculó por vía oral en ratones GF IQI ($2,5 \times 10^5$ ó $2,5 \times 10^4$ células/250 microlitros/ratón). Después de 4 semanas, se recogieron linfocitos del colon y el intestino delgado y se analizaron para determinar la proporción de células Treg Foxp3+ y su expresión de Helios. Se congeló el contenido cecal y se almacenó a -80°C hasta su uso.

<Experimentos de recolonización>

Se suspendió el contenido cecal congelado procedente de ratones ex-GF a los que se les inoculó dilución de 20000 veces (#F3, 7 y 8) en 10 veces el volumen (p/v) de PBS, se hizo pasar a través de un filtro celular de 70 micrómetros y se trató con cloroformo al 3 %. Se inocularon por vía oral las suspensiones en ratones GF IQI (5, 4 ó 4 ratones; designados como ratón #G1 hasta #G5, #H1 hasta #H4 o #I1 hasta #I4, respectivamente). Después de 4 semanas, se recogieron el colon y el intestino delgado y se analizaron para determinar la proporción de células Treg Foxp3+ y su expresión de Helios. Se suspendió el contenido cecal en disolución de glicerol al 20 %, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C .

<Experimentos de colonización de bacterias cultivadas>

Se diluyó la reserva en glicerol de contenido cecal del ratón #G2 con PBS y se sembró en una placa de agar BL. Después de 48 horas, se recogieron todas las colonias bacterianas raspando las placas con un raspador de placas y

se inocularon en ratones GF IQI (4 ratones, designados como ratón #K1 hasta #K4). Se aislaron seis cepas bacterianas de la reserva congelada de contenido cecal del ratón #F8 usando una placa de agar BL. Se inocularon estas cepas aisladas en ratones GF IQI (4 ratones, designados como ratón #J1 hasta #J4) (a continuación se describen los detalles del método de cultivo).

<Análisis por PCR cuantitativa de genes de ARNr 16S>

Usando un minikit QIAamp DNA Stool (QIAGEN), se aisló ADN genómico bacteriano a partir de heces humanas de un voluntario sano tal como se describió anteriormente (heces humanas), contenido cecal procedente de ratones GF alimentados por sonda gástrica con heces humanas tratadas con cloroformo (contenido cecal del ratón #B4) o heces procedentes de ratón SPF ICR (heces de ratón SPF). Se usó el ADN aislado como molde para la PCR cuantitativa. El programa de amplificación consistía en un ciclo a 95 °C durante 1 min, seguido de 50 ciclos a 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 30 s. El análisis por PCR cuantitativa se llevó a cabo usando un dispositivo LightCycler 480 (Roche). Se calculó la cantidad relativa mediante el método de delta Ct y se normalizó con respecto a la cantidad de bacterias totales. Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores: bacterias totales, 5'-GGTGAATACGTTCCCGG-3' (SEQ ID NO.: 45) y 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO.: 46); agrupación XIVa de *Clostridium* (subgrupo *Clostridium coccoides*), 5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3' (SEQ ID NO.: 47) y 5'-CTTTGAGTTTCATTCTFGCGAA-3' (SEQ ID NO.: 48); agrupación IV de *Clostridium* (*Clostridium leptum*) 5'-CCTTCCGTGCCGSAGTTA-3' (SEQ ID NO.: 49) y 5'-GAATTAAACCATACTCCACTGCTT-3' (SEQ ID NO.: 50); *Bacteroides*, 5'-GAGAGGAAGGTCCCCAC-3' (SEQ ID NO.: 51) y 5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3' (SEQ ID NO.: 52); *Bifidobacterium*, 5'-CGGGTGAGTAATGCGTGACC-3' (SEQ ID NO.: 53) y 5'-TGATAGGACGCGACCCCA-3' (SEQ ID NO.: 54). Obsérvese que los ratones alimentados por sonda gástrica con heces humanas tratadas con cloroformo mostraron altos niveles de bacterias formadoras de esporas, tales como las agrupaciones XIVa y IV de *Clostridium*, y una grave disminución de bacterias no formadoras de esporas, tales como *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, en comparación con las heces humanas antes del tratamiento con cloroformo.

<Aislamiento de ADN procedente del contenido cecal para el análisis de metasecuencia de genes de ARNr 16S>

Se recogió el contenido cecal de A1-1, A2-4, B-4, E-3, E-7, E-8, F-2, G-3, H-3, I-3 y J-3 por centrifugación a 5000 × g durante 10 min a 4 °C, se suspendió en 10 ml de Tris-EDTA que contenía Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM (pH 8), y luego se usó para el aislamiento de ADN. Se añadió lisozima (SIGMA, 15 mg/ml) a la suspensión celular. Después de la incubación a 37 °C durante 1 h con mezclado suave, se añadió una acromopeptidasa purificada (Wako) (2000 unidades/ml finales) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Luego, se añadió dodecilsulfato de sodio (1 % final) a la suspensión celular y se mezcló bien. Posteriormente, se añadió proteinasa K (Merck) (1 mg/ml final) a la suspensión y se incubó la mezcla a 55 °C durante 1 h. Se aisló ADN de alto peso molecular y se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo, etanol, y finalmente precipitación con polietilenglicol.

<Metasecuencia de genes de ARNr 16S>

Se usó una alícuota del ADN para la amplificación por PCR y secuenciación de genes de ARNr 16S bacterianos. Se generaron amplicones de ~330 pb, que abarcaban la región variable 1-2 (V1-2) del gen, mediante el uso de (i) el cebador 8F modificado (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG+código de barras+agrgtttgatymtggtcag-3' (SEQ ID NO.: 55)) que consiste en la secuencia adaptadora 454 (subrayada), un código de barras corrector de errores específico de muestra (10 bases, en negrita) y el cebador bacteriano universal 8F y (ii) el cebador 338R modificado (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG+tgctgctcccgtaggagt-3' (SEQ ID NO.: 56)) que contiene la secuencia adaptadora 454 (subrayada) y el cebador bacteriano 338R. Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa para cada muestra de ADN fecal: cada reacción de 50 microlitros contenía 40 ng de ADN, 5 microlitros de tampón 10 X Ex Taq (TAKARA), 5 microlitros de mezcla de dNTP 2,5 mM, 0,2 microlitros de Ex Taq y 0,2 microM de cada cebador. Las condiciones de PCR consistían en una etapa de desnaturalización inicial realizada a 96 °C durante 2 min, seguido de 20 ciclos de desnaturalización (96 °C, 30 s), hibridación (55 °C, 45 s) y amplificación (72 °C, 1 min) y una etapa de amplificación final realizada a 72 °C durante 10 min. Posteriormente se purificaron los amplicones generados a partir de cada muestra usando AMPur XP (Beckman Coulter). Se cuantificó la cantidad de ADN usando el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT Picogreen (Invitrogen) y el fluorómetro TBS-380mini (Turner Biosystems). Se usó el ADN amplificado como molde para la pirosecuenciación en el dispositivo GS Junior 454 (Roche). Las secuencias se realizaron usando el kit GS Junior Titanium emPCR Kit-Lib-L, el kit de secuenciación GS Junior Titanium y el kit GS Junior Titanium PicoTiterPlate (todos ellos de Roche) según los manuales del fabricante (GS Junior Titanium Series, emPCR Amplification Method Manual - Lib-L and Sequencing Method Manual). Se clasificaron las secuencias resultantes (se produjeron 3400 lecturas para cada muestra) en OTU basándose en la similitud de secuencia (>97 % de identidad). Se compararon secuencias representativas de cada OTU con secuencias en bases de datos de ácidos nucleicos (proyecto de base de datos ribosomal) usando BLAST para determinar los parientes más cercanos. Luego, se clasificaron las OTU en especies basándose en los parientes más cercanos. Todos los datos de parientes cercanos y el número de lecturas se muestran en la tabla 1.

<Aislamiento de cepas bacterianas>

Se aislaron cepas bacterianas del contenido cecal de #F8, #G2, #I1 y #K3 sembrando en placa diluciones en serie

de las muestras cecales en condiciones aerobias o condiciones estrictamente anaerobias (el 80 % de N₂, el 10 % de H₂, el 10 % de CO₂) en placas de agar BL (Eiken Chemical) o agar EG que contenían medio con los siguientes componentes (cantidades expresadas por litro): 500 ml de extracto de carne; proteosa-peptona n.º 3 (10,0 g, Difco); extracto de levadura (5,0 g, Difco); Na₂HPO₄ (4,0 g); D(+)-glucosa (1,5 g); almidón soluble (0,5 g); L-cistina (0,2 g); HCl de L-cisteína·H₂O (0,5 g); Tween80 (0,5 g); agar Bacto (16,0 g, Difco); sangre equina desfibrinada (50 ml). Después del cultivo a 37 °C durante 2 ó 4 días, se recogió cada colonia individual y se cultivó durante 2 ó 4 días adicionales a 37 °C en placa de agar EG o caldo ABCM. Se recogieron las cepas aisladas en medio de reserva EG (DMSO al 10 %) y se almacenaron a -80 °C. Para la suspensión de cepas aisladas para volver a inocular a los ratones, se usó medio TS (27,5 g de caldo de tripticasa-soja sin dextrosa, 0,84 g de Na₂CO₃, 0,5 g de HCl de L-cisteína·H₂O, 1000 ml de agua destilada, pH ajustado a 7,2 +/- 0,2 con NaOH, luego sometido a autoclave durante 15 minutos a 115 °C). Para identificar las cepas aisladas, se realizaron secuencias de genes codificantes de ARNr 16S. Se amplificaron los genes de ARNr 16S mediante PCR de colonias usando KOD FX (TOYOBO), pares de cebadores específicos de genes de ARNr 16S: 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO.: 57)) y 519R (5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEQ ID NO.: 58)) para *C. indolis*, *C. bolteae*, *Bacteroides* sp. MANG, *L. bacterium* DJF_VP30, *A. colihominis*, *Ruminococcus* sp. ID8, *C. lavalense*, *C. symbiosum* y *E. contortum* o 1513R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO.: 59)) para *C. saccharogumia*, *C. ramosum*, *F. plautii*, *C. hathewayi*, *C. scindens*, *Clostridium* sp. 2335, *Clostridium* sp. 14616 y cf *Clostridium* sp. MLG055 y el sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). El programa de amplificación consistía en un ciclo a 98 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 98 °C durante 10 s, 57 °C durante 30 s y 68 °C durante 40 s. Se purificó cada ADN amplificado a partir de la mezcla de reacción usando el kit de purificación de banda de gel y ADN de PCR Illustra GFX (GE Healthcare). Se realizó el análisis de secuencias usando el kit de secuenciación de ciclos BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems) y el analizador de ADN Applied Biosystems 3730xl (Applied Biosystems). Se compararon las secuencias resultantes con secuencias en bases de datos de ácidos nucleicos usando BLAST para determinar los parientes más cercanos. Los parientes más cercanos y el % identidad de todas las cepas aisladas, la información de género-especie de los parientes más cercanos, la agrupación de *Clostridium*, la ID de ratón del que se derivó, la similitud máxima y el medio de cultivo de las cepas aisladas se resumen en la tabla 2.

Ejemplo 1

Ejemplo 1: en primer lugar, se investigó si la acumulación de células T reguladoras (células Treg) en la lámina propia del colon dependía o no de las bacterias comensales. Específicamente, se aislaron linfocitos de los ganglios linfáticos periféricos (pLN) de ratones Balb/c criados en ausencia de bacterias patógenas específicas (SPF) o de la lámina propia del colon o el intestino delgado (SI) de los ratones. Se tiñeron CD4 y Foxp3 con anticuerpos. Luego, se analizó la razón de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que las células Treg Foxp3⁺ estaban presentes a una alta frecuencia en la lámina propia de los tractos gastrointestinales, especialmente en la lámina propia del colon, de los ratones mantenidos en el entorno libre de microorganismos patógenos específicos (SPF). Además, también se halló que el número de las células Treg Foxp3⁺ en la lámina propia del colon aumentó gradualmente hasta los tres meses después de su nacimiento, mientras que el número de las células Treg Foxp3⁺ en los ganglios linfáticos periféricos fue básicamente constante desde el tiempo de dos semanas después de su nacimiento.

Ejemplo 2

Ejemplo 2: a continuación, se investigó si la acumulación temporal de las células Treg en el colon tal como se encuentra en el ejemplo 1 tenía o no una relación con la colonización de la microbiota comensal intestinal. Específicamente, se analizaron la expresión de CD4 y la expresión de Foxp3 en linfocitos aislados del intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos periféricos de ratones criados en un entorno libre de gérmenes (GF) o SPF (8 semanas de edad: ratones Balb/c, ratones IQ1 y ratones C57BL/6). Se obtuvieron resultados similares en tres o más experimentos independientes.

Además, se recogieron linfocitos de lámina propia de ratones SPF y ratones GF (ratones Balb/c o ratones C57BL/6). Se tiñeron CD4 y Foxp3 con anticuerpos. Luego, se analizaron los linfocitos de lámina propia mediante FACS.

Además, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon, la lámina propia del intestino delgado (SI), placas de Peyer (PP) y ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones (ratones SPF C57BL/6) a los que se les administraron por vía oral antibióticos con agua durante ocho semanas. Se tiñeron CD4 y Foxp3 con anticuerpos. Luego, se analizaron los linfocitos mediante FACS. Se obtuvieron resultados similares (la razón de las células Foxp3⁺ en las células CD4⁺ de un ratón individual) en dos o más experimentos independientes. Obsérvese que se usaron los siguientes antibióticos en combinación según la descripción en el siguiente documento:

ampicilina (A; 500 mg/l, Sigma)

vancomicina (V; 500 mg/l, NACALAI TESQUE, INC.)

metronidazol (M; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

neomicina (N; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, Cell 118, 229 (23 de julio de 2004)

5 Fagarasan *et al.*, Science 298, 1424 (15 de noviembre de 2002)

Tal como resulta evidente a partir de los resultados, las frecuencias y los números absolutos de células Foxp3⁺ CD4⁺ en el intestino delgado y los ganglios linfáticos periféricos de los ratones GF fueron iguales o superiores a los de los ratones SPF. Además, los números de las células Treg en la lámina propia del intestino delgado, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de los ratones SPF a los que se les administraron por vía oral antibióticos durante ocho semanas fueron iguales o superiores a los de los ratones SPF que no habían recibido antibióticos. Mientras tanto, el número de las células Foxp3⁺ CD4⁺ en la lámina propia del colon de los ratones GF disminuyó significativamente en comparación con el de los ratones SPF. Esta disminución se observó habitualmente entre ratones de acervos genéticos diferentes (Balb/c, IqI y C57BL/6), así como entre ratones criados en instalaciones para animales diferentes. Además, también se mostró que disminuyó significativamente el número de células Treg en la lámina propia del colon de los ratones SPF C57BL/6 a los que se les administraron antibióticos.

Ejemplo 3

20 Ejemplo 3: a continuación, se verificó directamente si la disminución del número de las células Treg en la lámina propia del colon de los ratones GF mostrada en el ejemplo 2 se atribuía o no a la ausencia de microbiota. Específicamente, se administró por vía oral una suspensión fecal de ratones SPF B6 adquiridos de The Jackson Laboratory a ratones GF IqI (convencionalización). Tres semanas después de la administración, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon, y se analizó la expresión de Foxp3 en linfocitos CD4⁺. Los resultados mostraron que el número de células Treg en la lámina propia del intestino delgado no cambió. Sin embargo, el número de las células Treg en la lámina propia del colon aumentó significativamente. Por tanto, se mostró que la interacción microbiana con el huésped desempeñaba un papel importante en la acumulación de células Treg Foxp3⁺ en la lámina propia del colon, mientras que la acumulación de las células Treg en la lámina propia del intestino delgado tenía un mecanismo diferente.

Ejemplo 4

35 Ejemplo 4: a continuación, se investigó la relación entre los tejidos linfoides asociados al intestino de ratones y el número de células Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de los ratones según el método descrito en M. N. Kweon *et al.*, J Immunol 174, 4365 (1 de abril de 2005). Específicamente, se inyectaron por vía intraperitoneal 100 microgramos de una proteína recombinante de dominio extracelular (una proteína de fusión (LT beta R-Ig) entre un receptor de linfotóxina beta (LT beta R) y una región Fc de IgG1 humana, véase Honda *et al.*, J Exp Med 193, 621 (5 de marzo de 2001)) en ratonas C57BL/6 preñadas 14 días después de la concepción. Se inyectó por vía intraperitoneal de nuevo LT beta R-Ig en los fetos obtenidos de tales ratonas, de modo que se produjeron ratones de los que se retiraron por completo los folículos linfoides aislados (ILF), las placas de Peyer (PP) y las placas colónicas (CP). Luego, se analizaron las razones de células Foxp3⁺ en células CD4⁺ en la lámina propia del colon de los ratones tratados con LT beta R-Ig y los ratones tratados con IgG de rata (control) mediante FACS. Los resultados muestran que la razón de las células Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de los ratones deficientes en folículos linfoides aislados, placas de Peyer y placas colónicas (los ratones tratados con LT beta R-Ig) aumentó bastante. Por consiguiente, se sugirió que la disminución del número de las células Treg en la lámina propia del colon de los ratones GF y los ratones tratados con los antibióticos estaba provocada porque no se produjo la transmisión de señales específicas que fomenta la acumulación de células Treg en la lámina propia del colon y que está provocada por los microbios intestinales, en lugar de simplemente debido a un efecto secundario de tejidos linfoides asociados al intestino desorganizados.

Ejemplo 5

50 Ejemplo 5: para investigar si una flora intestinal específica inducía o no la acumulación de células Treg colónicas, se administró vancomicina como antibiótico contra bacterias Gram-positivas o polimixina B como antibiótico contra bacterias Gram-negativas a ratones SPF (a partir de 4 semanas de edad) durante cuatro semanas, y se analizó para determinar la razón de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺ ([%] Foxp3⁺ en CD4).

Los resultados muestran que el número de células Treg en el colon de los ratones a los que se les administró vancomicina disminuyó notablemente en comparación con el del control. En cambio, no se observó ninguna influencia en el número de células Treg de los ratones a los que se les administró polimixina B. Esos hechos sugirieron que las bacterias comensales Gram-positivas desempeñaban un papel principal en la acumulación de células Treg.

Ejemplo 6

65 Ejemplo 6: un informe reciente ha sugerido que las bacterias formadoras de esporas desempeñan un papel

importante en la respuesta de células T intestinales (véase V. Gaboriau-Routhiau *et al.*, Immunity 31, 677 (16 de octubre de 2009)). A este respecto, se administraron por vía oral microorganismos fecales (fracción formadora de esporas) resistentes a cloroformo al 3 % a ratones GF, que luego se analizaron para determinar la razón de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺ ([%] Foxp3⁺ en CD4).

Tres semanas después de la administración de las heces tratadas con cloroformo, el número de células Treg en los ratones administrados aumentó notablemente hasta el mismo nivel que el de los ratones SPF y el de los ratones GF a los que se les administraron de manera forzada heces sin tratar.

Por consiguiente, considerando los resultados mostrados en el ejemplo 5 en combinación, se reveló que los componentes específicos de la microbiota indígena tenían una alta probabilidad de pertenecer al grupo de bacterias Gram-positivas, y que la fracción formadora de esporas desempeñaba un papel importante en la inducción de células Treg.

Ejemplo 7

Ejemplo 7: a continuación, se identificaron las especies de la microbiota intestinal que inducían la acumulación de células Treg en el colon tal como se sugiere en los ejemplos 4 a 6. Específicamente, se administraron por vía oral bacterias filamentosas segmentadas (SFB), 16 cepas de *Bacteroides spp.* (Bactero. (6 cepas de *B. vulgatus*, 7 del grupo 1 de *B. acidifaciens* y 3 del grupo 2 de *B. acidifaciens*)), 3 cepas de *Lactobacillus* (Lacto. (*L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. murinum*)) y 46 cepas de *Clostridium spp.* (Clost., véase "Itoh, K., y Mitsuoka, T. Characterization of *Clostridia* isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. Lab. Animals 19: 111-118 (1985)", o microbiota recogida de ratones (SPF) criados en un entorno convencional, a ratones GF Balb/c o ratones GF IQI. Los ratones se mantuvieron en dispositivos de aislamiento de vinilo durante tres semanas. Luego, se aislaron las células CD4 del colon y el intestino delgado de estos ratones. Se analizaron los números de células Treg en el colon y el intestino delgado mediante citometría de flujo.

Las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican mediante secuenciación de genes de ARNr 16S, de la siguiente manera. Específicamente, se amplificaron los genes de ARNr 16S de las bacterias mediante PCR usando pares de cebadores específicos de genes de ARNr 16S: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO.: 60) y 5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEQ ID NO.: 61) (véase T. Aebischer *et al.*, Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46,221-229(2006)). Luego se introdujo el producto de PCR de 1,5 kb en el vector pCR-Blunt. Se secuenciaron los insertos y se alinearon usando el programa de software ClustalW. Las secuencias resultantes de genes de ARNr 16S derivados de las cepas 1-41 de las 46 cepas de *Clostridium spp.* se muestran en las SEQ ID NO.: 21-61. Se construyó un árbol filogenético mediante el método de unión de vecinos con las secuencias resultantes de las 41 cepas de *Clostridium* y las de bacterias conocidas obtenidas de la base de datos de Genbank usando el software Mega.

Los resultados mostraron que no se observó ningún efecto sobre el número de las células Treg en el colon en los ratones GF en los que se colonizaron las bacterias filamentosas segmentadas (SFB). Además, los ratones en los que se colonizó el cóctel de tres cepas de *Lactobacillus* proporcionaron resultados similares. Por otro lado, se mostró que la acumulación de células Foxp3⁺ en la lámina propia del colon se indujo fuertemente en los ratones en los que se colonizaron las 46 cepas de *Clostridium spp.* De manera importante, tal acumulación se fomentó independientemente de los acervos genéticos de los ratones, y condujo al aumento del número similar al de los ratones SPF, aunque se colonizó la microbiota intestinal sólo de un único género. También se mostró que la colonización de *Clostridium* no cambió el número de células Treg en la lámina propia del intestino delgado. Obsérvese que, cuando se colonizaron las 16 cepas de *Bacteroides spp.*, el número de células Treg en el colon aumentó significativamente. Sin embargo, el grado del aumento variaba en función del acervo genético de los ratones en los que se colonizaron las bacterias.

Ejemplo 8

Ejemplo 8: a continuación, se analizaron la expresión de CD4, la expresión de Foxp3 y la expresión de Helios en linfocitos LP de los timos y los cólores de ratones SPF, ratones GF, ratones colonizados con *Lactobacillus* y ratones colonizados con *Clostridium* mediante citometría de flujo.

Los resultados muestran que la mayoría de las células Foxp3⁺ halladas en los ratones SPF o los ratones colonizados con *Clostridium* no expresaban Helios. Obsérvese que Helios es un factor de transcripción que se sabe que se expresa en células Treg naturales derivadas del timo (véase A. M. Thornton *et al.*, J Immunol 184, 3433 (1 de abril de 2010)). Por consiguiente, se sugirió que la mayoría de las células Treg en los ratones SPF y los ratones colonizados con *Clostridium* eran células Treg inducidas en porciones periféricas (las denominadas células iTreg).

Ejemplo 9

Ejemplo 9: a continuación, se investigó si la colonización de *Clostridium* o similares tenía o no influencia sobre otras células T. Específicamente, se colonizaron SFB, 16 cepas de *Bacteroides spp.* (Bactero.), 46 cepas de *Clostridium*

spp. (Clost.) o microbiota recogida de ratones criados en un entorno convencional (SPF) en ratones GF IQL. Tres semanas más tarde, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon a partir de estos ratones, y se estimularon con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1 microgramo/ml) durante cuatro horas en presencia de Golgistop (BD Bioscience). Después de proporcionar la estimulación, se tiñeron las citocinas intracelulares mediante el uso de un anticuerpo anti-IL-17 marcado con PE (TC11-18H10) y un anticuerpo anti-IFN- γ marcado con FITC (BD Bioscience) según el manual del kit Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience). Luego, se analizó la razón de células IFN- γ ⁺ o células IL-17⁺ en leucocitos CD4⁺ mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que la colonización de *Clostridium* no tuvo ninguna influencia sobre las células Th1 (células CD4⁺ IFN- γ ⁺) en el colon, y provocó sólo un ligero aumento de las células Th17 (células CD4⁺ IL-17⁺). Por consiguiente, se sugirió que el género *Clostridium* era un género de bacterias que inducía específicamente las células Treg.

Ejemplo 10

Ejemplo 10: se ha notificado que 46 cepas de *Clostridium spp.* ejercen una influencia sobre la acumulación de linfocitos intraepiteliales (IEL) del tracto intestinal CD8⁺ en el colon. Por consiguiente, es concebible que *Clostridium* regule el sistema inmunitario en diversos aspectos, y que *Clostridium* muestre una notable capacidad para inducir y mantener las células Treg especialmente en el colon, tal como se describió anteriormente. Además, se sabe que una clase de citocinas, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), desempeña un papel importante en la regulación de la generación de células Treg.

A este respecto, se examinó si la colonización de *Clostridium* proporcionaba o no un enriquecimiento colónico en TGF- β . Específicamente, en primer lugar, se cultivaron los colonos completos de ratones GF, ratones colonizados con *Clostridium* y ratones colonizados con *Lactobacillus* durante 24 horas, y se midieron los sobrenadantes de cultivo de los mismos para determinar la concentración de TGF- β activo (TGF- β 1) mediante ELISA (el número de ratones analizados fue de cuatro por grupo).

Los resultados muestran que la cantidad de TGF- β producido en el colon de los ratones colonizados con *Clostridium* fue significativamente mayor que la de los colonos de los ratones GF y los ratones colonizados con *Lactobacillus*.

A continuación, se cultivaron células epiteliales intestinales (IEC) de ratones GF y ratones colonizados con *Clostridium* durante 24 horas, y se midieron los sobrenadantes de cultivo de las mismas para determinar la concentración de TGF- β activo (TGF- β 1) mediante ELISA (el número de ratones analizados fue de cuatro por grupo).

Los resultados muestran que se detectó TGF- β en el sobrenadante de cultivo de las IEC aisladas de los ratones colonizados con *Clostridium*, mientras que no se detectó TGF- β en el sobrenadante de cultivo de las IEC aisladas de los ratones GF.

A continuación, tal como se describió anteriormente, se cultivaron células T CD4⁺ esplénicas durante cinco días junto con un medio acondicionado al 50 % en el que se cultivaron las IEC aisladas de los ratones GF o los ratones colonizados con *Clostridium*, y con el anticuerpo anti-CD3, en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TGF- β . Luego, se recogieron las células T y se analizaron para determinar la expresión de Foxp3 mediante RT-PCR en tiempo real.

Los resultados muestran que, cuando al sobrenadante de cultivo de las IEC derivadas de los ratones colonizados con *Clostridium* se le añadieron las células T CD4⁺ esplénicas, se aceleró la diferenciación en células que expresan Foxp3. Mientras tanto, el anticuerpo anti-TGF- β inhibió la diferenciación en células Treg.

Se investigó la expresión de MMP2, MMP9 y MMP13, que se piensa que contribuyen a la activación de TGF- β latente. También se investigó la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que se piensa que está implicada en la inducción de células Treg. Específicamente, se administraron por vía oral 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.) a ratones libres de gérmenes C57BL/6. Tres semanas después de la administración, se recogieron las IEC y se analizaron para determinar los niveles de expresión de ARNm relativos de los genes MMP2, MMP9, MMP13 e IDO mediante RT-PCR en tiempo real (el número de ratones analizados fue de tres por grupo).

Para la relación entre la activación de TGF- β latente y la MMP descrita anteriormente, véase D'Angelo *et al.*, J. Biol. Chem. 276, 11347-11353, 2001; Heidinger *et al.*, Biol. Chem. 387, 69-78, 2006; Yu *et al.*, Genes Dev. 14, 163-176, 2000. Para la relación entre IDO y la inducción de células Treg, véase G. Matteoli *et al.*, Gut 59, 595 (mayo de 2010).

Los resultados muestran, de acuerdo con la producción de TGF- β descrita anteriormente, que los productos de transcripción de los genes que codifican para MMP2, MMP9 y MMP13 se expresaron a niveles más altos en las IEC derivadas de los ratones colonizados con *Clostridium* que las de los ratones GF y las de los ratones colonizados con *Lactobacillus*.

Además, IDO se expresó sólo en los ratones colonizados con *Clostridium*. Por consiguiente, se reveló que *Clostridium* activó las IEC y condujo a la producción de TGF-beta y otras moléculas inductoras de células Treg en el colon.

Ejemplo 11

Ejemplo 11: a continuación, se investigó si la acumulación de células Treg inducida por la colonización de *Clostridium* dependía o no de la transmisión de señales por receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos. Específicamente, se examinaron los números de células Treg en la lámina propia del colon de cada uno de los ratones SPF *Myd88*^{-/-} (deficientes en Myd88 (adaptador de señalización para el receptor similar a Toll)), *Rip2*^{-/-} (deficientes en Rip2 (adaptador del receptor de tipo NOD)) y *Card9*^{-/-} (deficientes en Card9 (factor de transmisión de señales esencial para la transmisión de señales de dectina-1)). Además, se provocó la colonización de *Clostridium spp.* en los ratones GF *Myd88*^{-/-}, y se investigó el cambio en el número de células Treg. Los resultados muestran que el número de células Treg de cada clase de los ratones SPF deficientes en los factores asociados de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos no cambió en relación con el de ratones de tipo natural de la misma camada, que sirvieron como control. Además, se halló que, cuando se colonizaron *Clostridium spp.* en ratones GF deficientes en Myd88, se indujo la acumulación de células Treg en la lámina propia del colon. Por consiguiente, se ha sugerido que el mecanismo de inducción de la acumulación de células Treg en la lámina propia del colon no se basa en la activación de la ruta de reconocimiento para los principales patrones moleculares asociados con patógenos tal como ocurre con la mayoría de bacterias, sino que se basa en las especies bacterianas comensales específicas.

Ejemplo 12

Ejemplo 12: se sabe que las células Treg Foxp3⁺ del tracto intestinal ejercen algunas funciones inmunosupresoras a través de la producción de IL-10 (véase NPL 9). Mientras tanto, se sabe que los animales que tienen células CD4⁺ Foxp3⁺ a partir de las cuales se elimina específicamente IL-10 desarrollan enfermedad intestinal inflamatoria (véase NPL 18). A este respecto, en primer lugar, se examinó la expresión de IL-10 en linfocitos de diversos tejidos. Específicamente, se aislaron linfocitos de diversos tejidos de ratones SPF *Il10*^{Venus}, y se analizaron la expresión de CD4 y la expresión de Venus mediante citometría de flujo.

Se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon de ratones *Il10*^{Venus}, y se detectó la expresión de la cadena beta del receptor de células T (TCR beta) en las superficies de las células mediante FACS.

Se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon de ratones *Il10*^{Venus}. Se estimularon los linfocitos con PMA (50 ng/ml) y ionomicina (1 microgramo/ml) durante cuatro horas en presencia de Golgistop (BD Bioscience). Luego, después de proporcionar la estimulación, se tiñeron las citocinas intracelulares mediante el uso de un anticuerpo anti-IL-17 marcado con PE, un anticuerpo anti-IL-4 marcado con APC (11B11) y un anticuerpo anti-IFN-g marcado con FITC (BD Bioscience) según el manual del kit Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience).

Además, se aislaron células Foxp3⁺ CD4⁺ y células Foxp3⁻ CD4⁺ del bazo (Spl) de ratones indicadores Foxp3^{eGFP}, y se aislaron células Venus⁺ de la lámina propia del colon y la lámina propia del intestino delgado (SI) de ratones *Il10*^{Venus}. Se analizaron las células obtenidas en cuanto a la expresión de genes predeterminados. Se analizó la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real usando una mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems) y un sistema de PCR en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems). En este caso, se normalizó el valor para cada célula con respecto a la cantidad de GAPDH.

Los resultados muestran que casi no se detectaron células Venus⁺ (células productoras de IL-10) en los ganglios linfáticos cervicales (ganglios linfáticos periféricos), el timo, la sangre periférica, el pulmón y el hígado de ratones mantenidos en las condiciones SPF. Mientras tanto, en el bazo, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de los mismos, se detectaron ligeramente células Venus⁺. Por otro lado, se hallaron muchas células Venus⁺ en los linfocitos de la lámina propia del intestino delgado y la lámina propia del colon. Además, la mayoría de las células Venus⁺ en los intestinos eran positivas para CD4, y también positivas para la cadena beta del receptor de células T (TCR beta). Se halló que las células T Venus⁺ CD4⁺ expresaban Foxp3 y otros factores asociados con las células Treg tales como un antígeno de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y una proteína asociada con TNFR inducido por glucocorticoides (GITR), aunque las células T Venus⁺ CD4⁺ no mostraron ninguno de los fenotipos de Th2 (productoras de IL-4) y Th17 (productoras de IL-17). Se mostró que el nivel de expresión de CTLA-4 en las células Venus⁺ intestinales era mayor que en las células Treg GFP⁺ esplénicas aisladas de los ratones indicadores Foxp3^{eGFP}.

Ejemplo 13

Ejemplo 13: las células Venus⁺ pueden clasificarse en al menos dos subconjuntos, concretamente, células Treg doblemente positivas (DP) Venus⁺ Foxp3⁺ y células Treg Venus⁺ Foxp3⁻ basándose en la expresión de Foxp3 intracelular. Las células de este último subconjunto corresponden a células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) (véase NPL

8 y 9). A este respecto, se investigaron las células Venus⁺ (células productoras de IL-10) observadas en el ejemplo 8 en cuanto a la expresión de Foxp3. Específicamente, se analizó la expresión de CD4, Foxp3 y Venus en la lámina propia del colon y la lámina propia del intestino delgado de ratones IL10^{Venus} mantenidos en condiciones GF o SPF mediante FACS, y se compararon los números de células Venus⁺ en la lámina propia del tracto intestinal entre ratones SPF IL10^{Venus} y ratones GF IL10^{Venus}.

Además, se analizó la expresión intracelular de Venus y Foxp3 en células CD4 en diversos tejidos de ratones SPF IL10^{Venus} mediante citometría de flujo.

Con el fin de investigar si la presencia de bacterias comensales tenía o no alguna influencia sobre la expresión de IL-10 en células reguladoras en los tractos gastrointestinales, se prepararon ratones libre de gérmenes (GF) IL10^{Venus}. Luego, se provocó la colonización de especies predeterminadas de bacterias en los ratones GF IL10^{Venus} obtenidos. Tres semanas después de la colonización de las especies de bacterias, se analizó un grupo de células CD4⁺ (V⁺F⁻, células Venus⁺ Foxp3⁻; V⁺F⁺, células Venus⁺ Foxp3⁺; y V⁻F⁺, células Venus⁻ Foxp3⁺) en el que se expresaron Foxp3 y/o Venus en el colon y el intestino delgado mediante citometría de flujo.

Con el fin de verificar si la presencia de bacterias comensales tenía o no alguna influencia sobre la expresión de IL-10 en células reguladoras en los tractos gastrointestinales, se administraron por vía oral antibióticos con agua a cinco o seis ratones IL10^{Venus} por grupo durante 10 semanas. Se usaron los siguientes antibióticos en combinación:

ampicilina (A; 500 mg/l, Sigma)

vancomicina (V; 500 mg/l, NACALAI TESQUE, INC.)

metronidazol (M; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

neomicina (N; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

Luego, se tiñeron CD4 y Foxp3 de linfocitos de la lámina propia del colon, la lámina propia del intestino delgado (SI), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y las placas de Peyer (PP) con anticuerpos, y se analizaron mediante FACS. Se obtuvieron resultados de dos o más experimentos independientes que proporcionaron resultados similares.

Los resultados muestran que la lámina propia del intestino delgado era rica en células Venus⁺ Foxp3⁻, concretamente, células similares a Tr1, y que las células Treg DP Venus⁺ Foxp3⁺ estaban presentes a una alta frecuencia en el colon de los ratones SPF. En cambio, aunque también se observaron números suficientes de células Foxp3⁺ en otros tejidos, no se observó la expresión de Venus en casi ninguna de las células.

Además, se mostró que todas las fracciones de células T reguladoras de Venus⁺ Foxp3⁻, Venus⁺ Foxp3⁺ y Venus⁻ Foxp3⁺ en el colon disminuyeron significativamente en las condiciones GF. Además, también se observó una disminución similar en células Venus⁺ en los ratones SPF IL10^{Venus} tratados con los antibióticos.

La colonización de *Clostridium spp.* indujo fuertemente todas las fracciones de células T reguladoras de Venus⁺ Foxp3⁻, Venus⁺ Foxp3⁺ y Venus⁻ Foxp3⁺ en el colon, y los grados de la inducción de las mismas fueron iguales a los de los ratones SPF. Además, se halló que la colonización de las tres cepas de *Lactobacillus* o la colonización de SFB tuvo una influencia extremadamente pequeña sobre el número de células Venus⁺ y/o Foxp3⁺ en el colon. Además, la colonización de 16 cepas de *Bacteroides spp.* también indujo las células Venus⁺, pero la influencia de la colonización fue específica para células similares a Tr1 Venus⁺ Foxp3⁻. Por otro lado, se halló que ninguna de las especies bacterianas sometidas a prueba ejerció ninguna influencia significativa sobre el número de células productoras de IL-10 en la lámina propia del intestino delgado (véase la figura 26).

Por tanto, se mostró que el género *Clostridium* colonizado en el colon o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias proporcionaba una señal para inducir la acumulación de células T reguladoras IL-10⁺ en la lámina propia del colon o la expresión de IL-10 en células T. Se mostró que el número de células Venus⁺ en el intestino delgado no estaba significativamente influenciado por la situación donde las bacterias comensales no estaban presentes o las bacterias comensales estaban disminuidas, y que las células reguladoras IL-10⁺ (células similares a Tr1) se acumularon en la lámina propia del intestino delgado independientemente de las bacterias comensales.

Ejemplo 14

Ejemplo 14: se investigó si las células Venus⁺ inducidas por el género *Clostridium* tenían o no una función inmunosupresora similar a la de las células Venus⁺ en el colon de ratones SPF. Específicamente, se sembraron células CD4⁺ CD25⁻ (células T efectoras, células Tef) aisladas del bazo en una placa de 6 pocillos de fondo plano a 2×10^4 /pocillo, y se cultivaron durante tres días junto con 2×10^4 células CD11c⁺ esplénicas (células representadoras de antígeno) sometidas a tratamiento de irradiación por radiación de 30 Gy, 0,5 microgramos/ml de

un anticuerpo anti-CD3, y una gran cantidad de células Treg. Además, durante las últimas seis horas, se cultivaron células CD4⁺ CD25⁻, a las que se les añadió [³H]-timidina (1 microCi/pocillo). Obsérvese que las células Treg usadas en el ejemplo 14 eran células T CD4⁺ GFP⁺ aisladas del bazo de ratones indicadores Foxp3^{eGFP}, o células T CD4⁺ Venus⁺ de la lámina propia del colon de ratones GF IL10^{Venus} en los que se colonizaron *Clostridium spp.* o ratones SPF IL10^{Venus}. Luego, se determinó la proliferación de las células basándose en la cantidad de captación de [³H]-timidina, y se representó mediante un valor de recuento por minuto (cpm).

Los resultados muestran que las células Venus⁺ CD4⁺ de los ratones en los que se colonizó el género *Clostridium* suprimieron la proliferación *in vitro* de células T activadas CD25⁻ CD4⁺. La actividad de supresión fue ligeramente inferior a la de las células GFP⁺ aisladas de los ratones indicadores Foxp3^{eGFP}, pero igual a la de las células Venus⁺ aisladas de los ratones SPF IL10^{Venus}. Por consiguiente, se ha mostrado que el género *Clostridium* induce células T que expresan IL-10 que tienen actividades inmunosupresoras suficientes, y de ese modo desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria en el colon.

Ejemplo 15

Ejemplo 15: a continuación, se investigaron la influencia de la colonización de un gran número de *Clostridium* sobre la respuesta inmunitaria local y la proliferación resultante de células Treg.

<Modelo de colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS)>

En primer lugar, se preparó el modelo de colitis inducida por DSS tal como se describió anteriormente, y se investigó la influencia sobre los ratones modelo de la inoculación de *Clostridium* y la proliferación de células Treg. Específicamente, se trataron ratones de control y ratones a los que se les inocularon *Clostridium* con DSS al 2 %, luego se observaron y midieron durante seis días para determinar la pérdida de peso corporal, la dureza de las heces y la hemorragia, y luego se evaluaron numéricamente. Además, el día 6, se recogieron los colonos, se disecaron, y se analizaron histológicamente mediante tinción con H&E.

Los resultados muestran que se suprimieron significativamente los síntomas de la colitis tales como la pérdida de peso corporal y la hemorragia rectal en los ratones que tenían un gran número de *Clostridium* (a continuación en el presente documento, también denominados "ratones abundantes en *Clostridium*") en comparación con los ratones de control (ratones C57BL/6 criados en un entorno convencional durante seis semanas y a los que no se les inoculó la suspensión fecal). Todas las características típicas de inflamación crónica, tales como acortamiento del colon, edema y hemorragia, se observaron notablemente en los ratones de control en comparación con los ratones abundantes en *Clostridium*. Además, las características histológicas, tales como erosión de la mucosa, edema, infiltración celular y pérdida de cripta, fueron menos graves en los ratones abundantes en *Clostridium* tratados con DSS que en los ratones de control.

<Modelo de colitis inducida por oxazolona>

A continuación, se preparó el modelo de colitis inducida por oxazolona tal como se describió anteriormente, y se investigó la influencia sobre los ratones modelo de la inoculación de *Clostridium* y la proliferación de células Treg. Específicamente, se sensibilizaron ratones de control y ratones a los que se les inocularon *Clostridium* con oxazolona, y posteriormente se trató el interior de sus rectos con una disolución de oxazolona al 1 %/etanol al 50 %. Luego, se observó y midió la pérdida de peso corporal. Además, se disecaron los colonos, y se analizaron histológicamente mediante tinción con H&E.

Los resultados muestran que la colitis avanzó junto con una pérdida de peso corporal persistente en los ratones de control. Mientras tanto, se redujo la pérdida de peso corporal de los ratones abundantes en *Clostridium*. Además, también se reveló que se redujeron las porciones que tenían enfermedades histológicas, tales como erosión de la mucosa, edema, infiltración celular y hemorragia, en el colon de los ratones abundantes en *Clostridium*.

Ejemplo 16

Ejemplo 16: a continuación, se investigó la influencia, sobre la respuesta inmunitaria sistémica (producción de IgE sistémica), de la colonización de un gran número de *Clostridium* y la proliferación resultante de células Treg. Específicamente, tal como se describió anteriormente, se inmunizaron ratones de control y ratones a los que se les inocularon *Clostridium* mediante la administración de ovoalbúmina (OVA) absorbida sobre alumbre dos veces en un intervalo de 2 semanas. Luego, se recogieron sueros de estos ratones, y se investigó el nivel de IgE específica de OVA de los mismos mediante ELISA. Además, se recogieron células esplénicas de los ratones en cada grupo, y se investigó la producción de IL-4 e IL-10 mediante la reestimulación con OVA *in vitro*.

Los resultados muestran que el nivel de IgE era significativamente inferior en los ratones abundantes en *Clostridium* que en los ratones de control. Además, se redujo la producción de IL-4 mediante la reestimulación con OVA y de ese modo se aumentó la producción de IL-10 en las células esplénicas de los ratones abundantes en *Clostridium* sensibilizados con OVA y alumbre, en comparación con las de los ratones de control.

Por consiguiente, teniendo en cuenta los resultados mostrados en el ejemplo 15 en combinación, la inducción de células Treg por *Clostridium* en el colon desempeña un papel importante en las respuestas inmunitarias locales y sistémicas.

Ejemplo 17

Ejemplo 17: a continuación, se colonizaron ratones GF Balb/c con tres cepas de *Clostridium* pertenecientes a la agrupación IV (cepas 22, 23 y 32 enumeradas en la figura 49). Tres semanas más tarde, se analizaron las células Treg Foxp3⁺ colónicas mediante FACS. Los resultados muestran que los ratones gnotobióticos colonizados con tres cepas de *Clostridium* mostraron un patrón intermedio de inducción de Treg entre los ratones GF y los ratones a los que se les inoculó la totalidad de las 46 cepas.

Ejemplo 18

Ejemplo 18: a continuación, se investigó si una fracción formadora de esporas (por ejemplo, resistente a cloroformo) de una muestra fecal obtenida de humanos tenía o no un efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras similar a la fracción formadora de esporas de la muestra fecal obtenida de ratones.

Se suspendieron heces humanas de un voluntario sano (japonés, varón, 29 años) con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se mezclaron con cloroformo (concentración final del 3 %), y luego se incubaron en un baño de agua con agitación durante 60 min. Después de la evaporación del cloroformo mediante burbujeo con gas de N₂, se inocularon por vía oral las alícuotas que contenían fracción resistente a cloroformo (por ejemplo, formadora de esporas) de bacterias intestinales humanas en ratones libres de gérmenes (GF) (IQL, 8 semanas de edad). Se mantuvieron los ratones tratados en un dispositivo de aislamiento de vinilo durante 3 semanas. Se recogió el colon y se abrió longitudinalmente, se lavó para eliminar el contenido fecal, y se agitó en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía EDTA 5 mM durante 20 min a 37 °C. Después de retirar las células epiteliales y el tejido graso, se cortó el colon en trozos pequeños y se incubó con RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 4 %, colagenasa D 1 mg/ml, dispasa 0,5 mg/ml y ADNasa I 40 microgramos/ml (todos ellos fabricados por Roche Diagnostics) durante 1 hora a 37 °C en una bañera de agua con agitación. Se lavó el tejido digerido con HBSS que contenía EDTA 5 mM, se resuspendió en 5 ml de Percoll al 40 % (fabricado por GE Healthcare) y se dispuso en 2,5 ml de Percoll al 80 % en un tubo Falcon de 15 ml. Se realizó separación por gradiente de Percoll mediante centrifugación a 780 g durante 20 min a 25 °C. Se recogieron las células de la interfase y se suspendieron en tampón de tinción que contenía PBS, FBS al 2 %, EDTA 2 mM y NaN₃ al 0,09 % y se tiñó la superficie de CD4 con Ac anti-CD4 marcado con ficoeritrina (RM4-5, fabricado por BD Biosciences). Se realizó tinción intracelular de Foxp3 usando el Ac anti-Foxp3 marcado con Alexa647 (FJK-16s, fabricado por eBioscience) y el conjunto de tampón de tinción de Foxp3 (fabricado por eBioscience). Se analizó el porcentaje de células positivas para Foxp3 dentro de la población de linfocitos positivos para CD4 mediante citometría de flujo.

Los resultados muestran que, cuando se colonizó la fracción formadora de esporas (por ejemplo, resistente a cloroformo) de bacterias intestinales humanas en ratones GF, se indujo la acumulación de células T reguladoras (Treg) Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de los ratones.

A continuación, se investigó qué especies de bacterias crecieron mediante alimentación por sonda gástrica con heces humanas tratadas con cloroformo.

Específicamente, usando un minikit QIAamp DNA Stool (fabricado por QIAGEN), se aisló ADN genómico bacteriano a partir de heces humanas de un voluntario sano tal como se describió anteriormente (heces humanas) o sedimentos fecales de ratones GF alimentados por sonda gástrica con heces humanas tratadas con cloroformo (GF+Cloro). Se llevó a cabo análisis por PCR cuantitativa usando un dispositivo LightCycler 480 (fabricado por Roche). Se calculó la cantidad relativa mediante el método de delta Ct y se normalizó con respecto a la cantidad de bacterias totales, dilución y peso de la muestra. Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores:

bacterias totales

5'-GGTGAATACGTTCCCGG-3' (SEQ ID NO.: 62) y

5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO.: 63)

agrupación XIVa de *Clostridium* (subgrupo *Clostridium coccoides*)

5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3' (SEQ ID NO.: 64) y

5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3' (SEQ ID NO.: 65)

agrupación IV de *Clostridium* (*Clostridium leptum*)

5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3' (SEQ ID NO.: 66) y

5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA-3' (SEQ ID NO.: 69)

Bacteroides

5'-GAGAGGAAGTCCCCCAC-3' (SEQ ID NO.: 67) y

5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3' (SEQ ID NO.: 68).

Los resultados muestran que los ratones alimentados por sonda gástrica con heces humanas tratadas con cloroformo tenían grandes cantidades de bacterias formadoras de esporas, tales como las agrupaciones XIVA y IV de *Clostridium*, y una grave disminución de bacterias no formadoras de esporas, tales como *Bacteroides*, en comparación con las heces humanas antes del tratamiento con cloroformo.

Ejemplo 19

Ejemplo 19: se suspendieron heces humanas (2 g) de un voluntario sano (japonés, varón, 29 años) con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se mezclaron con o sin cloroformo (concentración final del 3 %), y se incubaron en un baño de agua con agitación durante 60 min. Luego se evaporó el cloroformo mediante burbujeo con gas de N₂ durante 30 min. Se inocularon por vía oral las suspensiones de heces humanas sin tratar (designadas como "huUT") y heces humanas tratadas con cloroformo (designadas como "huCloro") en ratones libres de gérmenes (GF) (IQL, 8 semanas de edad) (250 microlitros/ratón). Se inoculó la suspensión de huUT en 4 ratones GF, que se enumeraron desde #A1 hasta #A4, y se inoculó la de huCloro en 4 ratones GF enumerados desde #B1 hasta #B4. Tales ratones GF a los que se les inocularon suspensiones de heces o similares también se denominan "ratones ex-GF" a continuación en el presente documento. Se mantuvo por separado cada grupo de ratones ex-GF en un dispositivo de aislamiento de vinilo para evitar la contaminación microbiana adicional. Después de 3 semanas, se recogieron por separado linfocitos de la lámina propia del intestino delgado y del colon de cada ratón, y se examinaron para determinar las expresiones de CD4 superficial y Foxp3, Helios, IL-17 e IFN-gamma intracelulares mediante citometría de flujo. Para la tinción de IL-17 e IFN-gamma intracelulares, se estimularon *in vitro* linfocitos aislados con PMA y ionomicina durante 4 horas. Foxp3 es el factor de transcripción esencial para la diferenciación y la función de las células Treg. Helios es un miembro de la familia de factores de transcripción Ikaros, y se ha sugerido que las células Treg Helios⁺ Foxp3⁺ son células Treg inducidas en la periferia [las denominadas células Treg inducidas (iTreg)]. Tal como se muestra en las figuras 1A-D, se aumentaron los porcentajes de células Treg Foxp3⁺ dentro de las células T CD4⁺ en lámina propia del intestino delgado y del colon de ambos grupos de ratones ex-GF, en comparación con los de los ratones GF. También se observaron notables aumentos del porcentaje de células Helios⁺ entre las células Treg Foxp3⁺ en el intestino delgado y el colon en ambos grupos de ratones ex-GF. Notablemente, además de células Treg Foxp3⁺, se observó una acumulación significativa de células CD4⁺ que expresan IL-17 (concretamente, células Th17) en los ratones exGF+huUT, mientras que sólo se observó marginalmente en los ratones exGF+huCloro (figuras 1E, F). En ambos grupos de ratones, los porcentajes de células IFN-gamma⁺ en células CD4⁺ permanecieron sin cambios (figuras 1E, G).

Ejemplo 20

Ejemplo 20: para investigar si las bacterias muertas también tienen o no un efecto sobre la inducción de células Treg, se sometió a autoclave la suspensión de heces humanas tratadas con cloroformo (121 °C durante 20 min) y se inoculó por vía oral en ratones GF (una vez a la semana durante 4 semanas). Después de 4 semanas, se sacrificaron los ratones, y se examinaron los linfocitos de la lámina propia del colon de cada ratón para determinar la expresión de CD4, Foxp3 y Helios mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 2, la inoculación de bacterias muertas no mostró ningún efecto sobre los números de células Foxp3⁺ o células Helios⁺ Foxp3⁺. Estos resultados no descartan la posibilidad de que la cantidad de bacterias muertas inoculadas no era suficiente, pero sugieren que se requieren bacterias vivas para la inducción de células Treg.

Ejemplo 21

Ejemplo 21: para confirmar la inducción de células Treg por bacterias resistentes a cloroformo, se obtuvieron otras heces de la misma persona un día diferente, se trataron con cloroformo, y se inocularon en ratones GF IQL (7 ratones, enumerados desde #C1 hasta #C7). Después de 3-4 semanas, se sacrificaron los ratones desde #C1 hasta #C5, y se recogieron por separado linfocitos de la lámina propia del intestino delgado y del colon de cada ratón, y se examinaron para determinar la expresión de CD4 y Foxp3 mediante citometría de flujo. De acuerdo con los hallazgos en el ejemplo 19, la colonización con heces humanas tratadas con cloroformo indujo significativamente la acumulación de células Treg Foxp3⁺ CD4⁺ en la lámina propia del colon y del intestino delgado (figura 3). Estos resultados respaldan además la noción de que las bacterias formadoras de esporas resistentes a cloroformo pueden inducir diferenciación, proliferación y/o reclutamiento de células Treg en la lámina propia intestinal.

Ejemplo 22

Ejemplo 22: para someter a prueba si la inducción de células Treg por la fracción formadora de esporas resistente a cloroformo de bacterias intestinales humanas es transmisible horizontalmente, se coalojaron ratones GF IQI (6 ratones, enumerados desde #D1 hasta #D6) durante 4 semanas con ratones #C6 y #C7 en la misma jaula en un dispositivo de aislamiento de vinilo. Se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon y del intestino delgado y se examinaron para determinar CD4 y Foxp3. Los ratones coalojados mostraron un aumento significativo del porcentaje de células Foxp3⁺ entre las células CD4⁺ (figura 4). Por tanto, la inducción de células Treg por bacterias intestinales humanas es transmisible horizontalmente. Estos resultados permiten suponer un papel de componentes prominentes de la microbiota intestinal, en lugar de componentes minoritarios, para la inducción de células Treg.

Ejemplo 23

Ejemplo 23: se descongeló la reserva congelada de contenido cecal del ratón #C4, se suspendió en 10 veces su volumen (p/v) de PBS, y se hizo pasar a través de un filtro celular de 70 micrómetros. Luego se trató la suspensión con cloroformo al 3 %, se diluyó 2000 ó 20000 veces con PBS, y se inoculó por vía oral en ratones GF IQI ($2,5 \times 10^5$ ó $2,5 \times 10^4$ células bacterianas/250 microlitros/cabeza, respectivamente). Se inoculó por vía oral la muestra diluida 2000 veces en 4 ratones (designados como exGF+2000, enumerados desde #E1 hasta #E4), mientras que se inoculó la muestra diluida 20000 veces en 8 ratones (designados como exGF+20000, enumerados desde #F1 hasta #F8). Después de 3 semanas, se aislaron linfocitos de la lámina propia intestinal y se examinaron para determinar CD4, Foxp3 y Helios. Ambas muestras diluidas 2000 y 20000 veces indujeron de manera similar una notable acumulación de células Foxp3⁺ CD4⁺ en la lámina propia intestinal (figura 5). Por tanto, la dosis de bacterias para la inoculación oral puede minimizarse a menos de $2,5 \times 10^4$ células bacterianas.

Ejemplo 24

Ejemplo 24: se suspendió la reserva congelada de contenido cecal del ratón #F3, #F7 o #F8 en 10 veces su volumen (p/v) de PBS, se hizo pasar a través de un filtro celular de 70 micrómetros, y se trató con cloroformo al 3 %. Luego, se inoculó por vía oral la suspensión fecal del ratón #F3 en 5 ratones GF (enumerados desde #G1 hasta #G5), la del ratón #F7 en 4 ratones GF (enumerados desde #H1 hasta #H4), y la del ratón #F8 en 4 ratones GF (enumerados desde #I1 hasta #I4). Después de 4 semanas, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon y del intestino delgado y se examinaron para determinar la expresión de CD4, Foxp3 y Helios mediante citometría de flujo. Todos los ratones #F, #G y #H mostraron un aumento significativo del porcentaje de células Foxp3⁺ entre las células CD4⁺ en la lámina propia intestinal en comparación con los ratones GF sin tratar (figura 6). Por tanto, la inducción de células Treg por bacterias intestinales humanas que colonizan en ratones exGF+20000 también es transmisible. Además, tal como se muestra en los datos de metasecuenciación de ADNr 16S posteriores (figura 8), estos ratones habitualmente tenían bacterias que tienen similitudes de secuencia de ADNr 16S con similitudes de secuencia de ADNr 16S con 20 especies de bacterias conocidas (*C. aminophilum*, *H. saccharovorans*, *E. fissicatena*, *H. filiformis*, *C. clostridioforme*, *C. indolis*, *C. bolteae*, *Bacteroides* sp. MANG, *L. bacterium* DJF_VP30, *Ruminococcus* sp. ID8, *C. lavalense*, *C. symbiosum*, *E. contortum*, *C. saccharogumia*, *C. ramosum*, *F. plautii*, *C. scindens*, *Clostridium* sp. 2335, *Clostridium* sp. 14616 y cf *Clostridium* sp. MLG055).

Ejemplo 25

Ejemplo 25: se diluyó en serie una reserva congelada del contenido cecal del ratón #F8 con NaCl al 0,85 % en condiciones aerobias y se sembró en placa en agar BL. Después del cultivo a 37 °C durante 2 ó 4 días, se observaron 50 colonias individuales. De las 50 colonias, se recogieron 29, se cultivaron durante 2 ó 4 días adicionales a 37 °C en caldo ABCM, y se almacenaron en medio de reserva EG (DMSO al 10 %) a -80 °C. Se aisló el ADN genómico de cada colonia, y se analizó la secuencia génica codificante de ARNr 16S. La secuencia de ARNr 16S de cada colonia reveló que las 29 colonias observadas estaban representadas por tres cepas que tenían, cada una, una similitud del 100 % con *Clostridium ramosum*, del 99,75 % con *Clostridium saccharogumia*, del 100 % con *Flavonifractor plautii*, del 99,17 % con *Clostridium hathewayi*, del 99,23 % con *Clostridium scindens* o del 99,66 % con *Clostridium* sp. 2335. Dentro de las 29 colonias que se seleccionaron a partir de las 50 colonias originales, sólo estaban presentes *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* y *Flavonifractor plautii* (25, 3 y 1 colonias, respectivamente). Estas 3 cepas aisladas se propagaron, mezclaron e inocularon en ratones GF IQI (4 ratones, enumerados desde #J1 hasta #J4). Después de 3-4 semanas, se recogieron linfocitos de la lámina propia del colon, y se examinaron para determinar las expresiones de CD4, Foxp3 y Helios mediante citometría de flujo. Las células Foxp3⁺ o las células Helios⁺ no se indujeron o sólo se indujeron débilmente por la colonización de estas cepas de bacterias en el colon (figura 7). Estos resultados sugieren que la combinación de *Clostridium saccharogumia* y *Clostridium ramosum* (ambas dentro de la agrupación XVIII) era insuficiente para inducir las células Treg en el colon de ratones. Los efectos de *Flavonifractor plautii* no estaban claros, puesto que la cepa sólo estaba representada por 1 de las 29 colonias que se seleccionaron.

Ejemplo 26

Ejemplo 26: se suspendió la reserva en glicerol congelada de contenido cecal del ratón #G2 con PBS, se sembró en

una placa de agar BL, y se incubó durante 48 horas, de manera similar al procedimiento realizado en el ejemplo 19. A diferencia del ejemplo 19, se recogieron todas las bacterias de la placa mediante raspado con un raspador de placas, se suspendieron en caldo TS y se inocularon en ratones GF IQI (4 ratones, enumeración desde #K1 hasta #K4). Debe observarse que la suspensión bacteriana usada en este experimento incluía bacterias que no se propagaron pero sobrevivieron en la placa. Después de 4 semanas, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon y del intestino delgado de los ratones K1-K4 y se examinaron para determinar la expresión de CD4, Foxp3 y Helios. Los 4 ratones mostraron un aumento significativo de los porcentajes de células Foxp3⁺ entre las células CD4⁺ (figuras 9A, 9B) y células Helios⁺ entre las células Treg Foxp3⁺ (figuras 9A, 9C) en la lámina propia intestinal en comparación con ratones GF sin tratar. Teniendo en cuenta que la inoculación de ratones con 6 cepas de bacterias propagadas en la placa de agar BL no logró inducir las células Treg, las bacterias que no se propagaron pero sobrevivieron en la placa podrían ser responsables de la inducción de células Treg.

Ejemplo 27

Ejemplo 27: se extrajo ADN bacteriano a partir del contenido cecal de los ratones #A1, #C4, #F8, #G2, #H3, #I3, #J3 y #K3. Se amplificó la región variable 1-2 (V1-2) en el gen codificante de ARNr 16S bacteriano mediante PCR y se usó como molde para la metasecuenciación. Se clasificaron las secuencias resultantes (3400 lecturas para cada muestra) en unidades taxonómicas operativas (OTU) basándose en la similitud de secuencia (>97 % de identidad). Se compararon secuencias representativas de cada OTU con secuencias en bases de datos de ácidos nucleicos usando BLAST para determinar sus parientes más cercanos en las especies conocidas. Los números de lecturas detectadas y los parientes más cercanos para cada OTU se muestran en la tabla 1. Las abundancias relativas de OTU que tienen el mismo pariente más cercano en cada muestra cecal se muestran en la figura 8. En el ratón #A1, se identificaron 153 OTU (sus parientes más cercanos eran 93 especies) y la mitad de ellas estaban relacionadas con la especie *Bacteroides*. En cambio, en el ratón #C4, se identificaron 113 OTU y la mayoría de ellas estaban relacionadas con especies pertenecientes a la familia *Clostridiaceae*. En los ratones #F8, #G2, #H3, #I3, #J3 y #K3, se identificaron 97-68 OTU. En estos ratones, en los que se observó acumulación de células Treg en el intestino, la mayoría de las bacterias consistían en bacterias que tenían similitudes de secuencia de ADN 16S con *C. aminophilum*, *H. saccharovorans*, *E. fissicatena*, *H. filiformis*, *C. clostridioforme*, *C. indolis*, *C. bolteae*, *Bacteroides* sp. MANG, *L. bacterium* DJF_VP30, *Ruminococcus* sp. ID8, *C. lavalense*, *C. symbiosum*, *E. contortum*, *C. saccharogumia*, *C. ramosum*, *F. plautii*, *C. scindens*, *Clostridium* sp. 2335, *Clostridium* sp. 14616 y cf *Clostridium* sp. MLG055.

En el ratón #J3, en el que no se observó acumulación de Treg, se detectaron 3 OTU. Cada una tiene similitud de secuencia de ADN 16S con *C. saccharogumia*, *C. ramosum* o *F. plautii*. Estos resultados sugieren que la combinación de estas tres especies es insuficiente para inducir la acumulación de células Treg intestinales.

Ejemplo 28

Ejemplo 28: se aislaron cepas bacterianas del contenido cecal de los ratones #F8, #G2, #I1 y #K3 usando placas de agar BL o agar EG. El solicitante recogió 144 colonias de las placas de agar EG y 116 colonias de las placas de agar BL. La búsqueda en BLAST de la secuencia codificante de ARNr 16S de estos clones reveló que pertenecían a 17 especies, y cada una de ellas tenía similitudes del 93-100 % con *C. indolis*, *C. bolteae*, *Bacteroides* sp. MANG, *L. bacterium* DJF_VP30, *A. colihominis*, *Ruminococcus* sp. ID8, *C. lavalense*, *C. symbiosum*, *E. contortum*, *C. saccharogumia*, *C. ramosum*, *F. plautii*, *C. hathewayi*, *C. scindens*, *Clostridium* sp. 2335, *Clostridium* sp. 14616 y cf *Clostridium* sp. MLG055 (tabla 2). Todas ellas pertenecían a las agrupaciones IV, XIVa o XVIII de *Clostridium* (2 especies de la agrupación IV, 12 de la agrupación XIVa, 1 de la agrupación XVI y 2 de la agrupación XVIII).

Ejemplo 29

Ejemplo 29: de las colonias seleccionadas en el ejemplo 28, se recogieron y aislaron colonias adicionales y se cultivaron estas cepas usando medio EG y BL. La búsqueda en BLAST la secuencia codificante de ARNr 16S de estos clones reveló que pertenecía a un total de 31 especies (incluyendo las especies mencionadas en el ejemplo 28), y cada una de ellas tenía similitudes del 93-100 % con *Clostridium saccharogumia*, *Clostridium ramosum* JCM1298, *Clostridium ramosum*, *Flavonifractor plautii*, *Pseudoflavonifractor capillosus* ATCC 29799, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium saccharolyticum* WM1, *Bacteroides* sp. MANG, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium scindens*, *Lachnospiraceae bacterium* 5_1_57FAA, *Lachnospiraceae bacterium* 6_1_63FAA, *Clostridium* sp. 14616, *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613, cf. *Clostridium* sp. MLG055, *Erysipelotrichaceae bacterium* 2_2_44A, *Clostridium indolis*, *Anaerostipes caccae*, *Clostridium bolteae*, *Lachnospiraceae bacterium* DJF_VP30, *Lachnospiraceae bacterium* 3_1_57FAA_CT1, *Anaerotruncus colihominis*, *Anaerotruncus colihominis* DSM 17241, *Ruminococcus* sp. ID8, *Lachnospiraceae bacterium* 2_1_46FAA, *Clostridium lavalense*, *Clostridium asparagiforme* DSM 15981, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium symbiosum* WAL-14163, *Eubacterium contortum*, *Clostridium* sp. D5, *Oscillospiraceae bacterium* NML 061048, *Oscillibacter valericigenes*, *Lachnospiraceae bacterium* A4, *Clostridium* sp. 316002/08, *Clostridiales bacterium* 1_7_47FAA, *Blautia cocoides* y *Anaerostipes caccae* DSM 14662 (tabla 3). Se almacenaron las reservas de cepas bacterianas en reserva en glicerol al 10 % más el medio usado para hacer crecer los cultivos, y se almacenaron tubos en un congelador a -80 °C.

Ejemplo 30

Ejemplo 30: para investigar si las cepas en el ejemplo 29 tienen la capacidad de inducir Treg en ratones GF, se mezclaron 31 cepas de la tabla 3 en cantidades iguales de volumen de medio usando medio TS y se inocularon en ratones GF. Un análisis detallado de las secuencias de ARNr 16S reveló que 8 de las 31 cepas se solapaban con otras cepas (véase la tabla 3, indicado por un asterisco), dando como resultado 23 cepas bacterianas distintas. Tal como se muestra en la figura 10, cuando se administró por vía oral a ratones GF, la mezcla de las 23 cepas (23-mix) indujo niveles muy fuertes de Treg (35-40 % en la lámina propia del colon, >10 % en el intestino delgado; figura 10). Estas Treg observadas con colonización por 23-mix eran mayormente Helios⁺.

Ejemplo 31

Ejemplo 31: para investigar si los miembros abundantes de la microbiota intestinal en la fracción resistente a cloroformo de bacterias intestinales humanas, en lugar de los miembros minoritarios, impulsan la inducción de células Treg, a ratones GF adultos se les inocularon muestras cecales diluidas procedentes de ratones a los que se les había inoculado la fracción resistente a cloroformo de bacterias intestinales humanas (ratones +huCloro) tal como se describió en el ejemplo 19. Tal como se muestra en la figura 11, incluso cuando se diluyeron las muestras cecales de ratones huCloro (diluidas 2×10^4 y 2×10^5) para crear ratones $+2 \times 10^4$ y ratones 2×10^5 respectivamente, se indujeron Treg en estos ratones GF adultos.

Ejemplo 32

Ejemplo 32: para investigar si la mezcla de 23 cepas en el ejemplo 30 tiene la capacidad de inducir Treg en ratones GF IQI adultos más eficazmente que *Faecalibacterium prausnitzii*, una cepa de *Clostridia* humana bien conocida caracterizada por potenciar las funciones de células reguladoras, se mezclaron 23 cepas de la tabla 4 en cantidades iguales con medio para preparar un cóctel, que luego se administró a ratones GF IQI adultos. A modo de comparación, se administró *Faecalibacterium prausnitzii* a otro grupo de ratones GF IQI. Tal como se muestra en la figura 12, cuando se administra por vía oral a ratones GF IQI adultos, la mezcla de las 23 cepas (23-mix) indujo niveles de Treg mayores que *Faecalibacterium prausnitzii*. *Faecalibacterium prausnitzii* (+Faecali.) mostró niveles de inducción de Treg insignificantes.

Ejemplo 33

Ejemplo 33: para investigar si las comunidades de la microbiota en los ratones $+2 \times 10^4$, descritos en el ejemplo 31, eran estables, se realizó inoculación oral en serie de ratones GF adultos para crear ratones $+2 \times 10^4$ -re (inoculación secundaria) y $+2 \times 10^4$ -re-re (inoculación terciaria). Tal como se muestra en la figura 13, hubo una inducción significativa de Treg tanto en los ratones $+2 \times 10^4$ -re como en los ratones $+2 \times 10^4$ -re-re. Para eliminar adicionalmente los componentes no esenciales de la microbiota para la inducción de células Treg, se diluyó de nuevo 2×10^4 veces el contenido cecal de ratones $+2 \times 10^4$, descritos en el ejemplo 31, y se inoculó por vía oral en otro conjunto de ratones GF adultos (ratones $+(2 \times 10^4)^2$). Tal como se muestra en la figura 13, los ratones $+(2 \times 10^4)^2$ mostraron una notable acumulación de células Treg en el colon.

Ejemplo 34

Ejemplo 34: para evaluar la composición de la microbiota intestinal en +huUT (+hu), +huCloro, $+2 \times 10^4$, $+2 \times 10^4$ -re y $+(2 \times 10^4)^2$, descritos en el ejemplo 19, el ejemplo 31 y el ejemplo 33, se extrajo ADN bacteriano a partir del contenido cecal de estos ratones adultos. Se amplificó la región variable (V1-V2) del ADN ribosomal (ADNr) 16S bacteriano y se realizó metasecuenciación usando un secuenciador 454. Se clasificaron las secuencias resultantes (3400 lecturas para cada muestra) en unidades taxonómicas operativas (OTU) basándose en la similitud de secuencia (>96 % de identidad). Se compararon secuencias representativas de cada OTU con secuencias depositadas en bases de datos de genoma y 16S disponibles públicamente usando BLAST para determinar su especie más cercana. Tal como se muestra en la figura 14, en ratones +hu, las OTU pertenecientes a *Bacteroidetes* representaban aproximadamente el 50 % de la comunidad microbiana cecal. En cambio, la mayoría de las OTU en el ratón +huCloro estaban relacionadas con especies pertenecientes a *Clostridia*. En ratones $+2 \times 10^4$, $+2 \times 10^4$ -re y $+(2 \times 10^4)^2$, la mayoría de las bacterias consistían en bacterias que tenían similitudes de secuencia de ADNr 16S con aproximadamente 20 especies de *Clostridia* pertenecientes a la agrupación XIVA (también denominada grupo *C. leptum*), IV, XVI y XVIII, enumeradas en la figura 14.

Ejemplo 35

Ejemplo 35: un metaanálisis de ADNr 16S del contenido cecal de ratones a los que se les inocularon las 23 cepas aisladas en el ejemplo 30 (ratones +23-mix) confirmó la presencia de 17 de las 23 cepas enumeradas en la figura 14 y la tabla 4. Para determinar si estas 17 cepas podían inducir células Treg, se inoculó una mezcla de estas 17 cepas en ratones GF adultos (ratones +17-mix). Se cultivó cada cepa bacteriana en 2 ml de medio líquido EG y se hizo crecer hasta la confluencia, y luego se mezclaron estos cultivos iniciadores en un tubo de 50 ml ($2 \text{ ml} \times 17 \text{ cepas} = 34 \text{ ml}$). Se centrifugaron las bacterias para dar un sedimento y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Se usó una

alícuota de 200 μ l, que contenía $\sim 1 \times 10^6$ - 1×10^7 de cada cepa, para inocular los ratones GF adultos. Tal como se muestra en la figura 15, cuando se administró por vía oral a ratones IQI, BALB y B6 adultos, la mezcla de 17 cepas fue capaz de inducir Treg en estos tres modelos de ratón.

5 Ejemplo 36

Ejemplo 36: para investigar si cada de una las 17 cepas definidas en el ejemplo 35 podía inducir individualmente Treg, se monocolonizaron ratones GF adultos con una de cada una de las 17 cepas. Tal como se muestra en la figura 16, los ratones GF adultos monocolonizados con una única cepa mostraron niveles de Treg de bajos a intermedios. De manera importante, ninguna cepa individual indujo Treg en la misma medida que la mezcla de 17 cepas.

Ejemplo 37

15 Ejemplo 37: para investigar si subconjuntos de las 17 cepas descritas en el ejemplo 35 podían inducir Treg, se realizaron combinaciones de 3-5 cepas seleccionadas aleatoriamente: 3-mix, 5-mix-A, 5-mix-B y 5-mix-C, tal como se muestra en la tabla 4, y se usaron para inocular ratones GF adultos. Tal como se muestra en la figura 17, sólo las mezclas de 5 especies indujeron aumentos significativos de la frecuencia de células Treg, cuya magnitud era intermedia en comparación con la observada en ratones +17-mix.

20 Ejemplo 38

Ejemplo 38: para investigar los beneficios de la administración de la mezcla de las 17 cepas descritas en el ejemplo 35 (17-mix), a ratones SPF adultos se les inoculó por vía oral o bien 17-mix o bien medio de control, y se evaluaron para determinar la inducción de células Treg Foxp3⁺ tres semanas más tarde. Tal como se muestra en la figura 18, hubo un aumento significativo de la frecuencia de células Treg Foxp3⁺ (CD4) colónicas después de tres semanas de tratamiento.

Ejemplo 39

30 Ejemplo 39: para evaluar el beneficio de la administración de 17-mix en un modelo animal de diarrea alérgica, a ratones SPF adultos se les inoculó por vía oral 17-mix o medio de control mientras se trataban con ovoalbúmina (OVA), un inductor de diarrea alérgica. Tal como se muestra en la figura 19, la aparición y gravedad de la diarrea (puntuación de diarrea) se redujo significativamente en ratones alimentados con 17-mix en relación con los ratones de control.

Ejemplo 40

40 Ejemplo 40: para evaluar el beneficio de la administración de 17-mix en un modelo animal de colitis, a ratones SPF adultos se les inoculó por vía oral o bien 17-mix o bien medio de control mientras se trataban con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), un inductor experimental de colitis usado con frecuencia. Tal como se muestra en la figura 20, los ratones SPF 17-mix demostraron una mortalidad más baja que los ratones de control con la exposición a TNBS.

45 Ejemplo 41

Ejemplo 41: para evaluar la utilidad de las cepas representadas en 17-mix como herramienta de diagnóstico y monitorización para la colitis ulcerosa, se examinó la abundancia relativa de las 17 cepas en sujetos humanos sanos y con colitis ulcerosa (CU) usando secuencias genómicas preliminares de las 17 cepas y genomas de microbioma fecal humano disponibles públicamente a través del proyecto europeo MetaHIT. Los sujetos con CU (N=20) mostraron una reducción de las 17 cepas en comparación con los sujetos sanos (N=15), tal como se muestra en la figura 21.

55 SEQ ID NO.: OTU136; OTU46; OTU221; OTU9; OTU296; OTU21; OTU166; OTU73; OTU174; OTU14; OTU55; OTU337; OTU314; OTU195; OTU306; OTU87; OTU86; OTU152; OTU253; OTU259; OTU281; OTU288; OTU334; OTU359; OTU362; u OTU367 son las SEQ ID NO.: 19-44, respectivamente.

Aplicabilidad industrial

60 Tal como se ha descrito anteriormente, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento hacen posible proporcionar una composición excelente y bien caracterizada para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras (células Treg) utilizando determinadas bacterias derivadas de humano pertenecientes a la clase *Clostridia* o una sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias. Puesto que la composición bacteriana tiene efectos inmunosupresores, la composición bacteriana puede usarse, por ejemplo, para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades alérgicas, así como para suprimir el rechazo inmunológico en el trasplante de órganos, o similares. Además, los individuos sanos pueden ingerir de manera fácil y

rutinaria la composición bacteriana, tal como en un alimento o una bebida (por ejemplo, un alimento saludable), para mejorar sus funciones inmunitarias.

[Tabla 1A-1]

Tabla 1A

Número de DNU	Denominación	Número de patógeno más cercano en especies coliformes									
		104	109	302	411	412	413	414	415	416	417
214	Lactobacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
216	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
217	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
218	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
220	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
225	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
226	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
227	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
231	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
232	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
233	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
243	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
244	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
246	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
247	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
249	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
252	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
253	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
254	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
255	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
257	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
258	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
259	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
260	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
261	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
262	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
263	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
264	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
265	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
266	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
267	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
268	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
269	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
271	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
272	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
274	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
276	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
277	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
278	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
279	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
282	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
284	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
285	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
286	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
287	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
289	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
291	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
292	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
293	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
294	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
296	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
298	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
299	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	Bacteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[Tabla 1B-1]

Tabla 1B

Número de OTU	Parente más cercano en especies conocidas	Similitud (%)	Número de OTU						
			8A1	8C4	8F8	8S2	8F9	8I3	8J3
3	<i>Clostridium</i> sp. 2335	98.40	1	0	13	18	10	13	6
9	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	98.15	14	0	324	16	153	172	159
14	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	99.07	4	34	46	401	28	27	14
15	<i>Clostridium</i> sp. 2335	96.9	0	0	6	2	0	2	1
21	<i>Clostridium</i> sp. 2335	98.69	18	53	325	322	376	410	358
23	<i>Clostridium</i> <i>indolis</i>	97.26	0	0	0	0	3	1	2
33	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	98.34	0	0	6	0	1	1	4
46	<i>Clostridium</i> <i>carnosum</i>	98.67	47	28	70	67	85	101	188
50	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i>	95.88	1	0	7	0	17	28	8
55	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> DAF VP30	98.53	12	45	120	269	70	35	105
57	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	98.27	3	0	95	0	27	38	29
86	<i>Clostridium</i> <i>indolis</i>	98.78	1	0	22	0	43	43	0
67	<i>Subdoligranulum</i> <i>fixatum</i>	99.60	1	49	11	39	4	8	0
83	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> DAF VP30	98.18	1	0	4	0	0	2	0
90	<i>Clostridium</i> <i>thermophilum</i>	92.23	0	2	0	1	0	1	0
101	<i>Clostridium</i> <i>clostridioforme</i>	98.26	1	9	6	3	12	5	12
111	<i>Clostridium</i> <i>thermophilum</i>	98.04	0	1	0	0	0	1	1
114	<i>Ruminococcus</i> sp. 129	95.88	0	4	3	40	0	1	19
119	<i>Clostridium</i> <i>clostridioforme</i>	96.77	0	1	1	9	9	1	2
125	<i>Ruminococcus</i> sp. 129	97.25	0	0	11	12	13	15	43
131	<i>Clostridium</i> <i>clostridioforme</i>	97.23	1	0	1	3	2	1	9
136	<i>Clostridium</i> <i>saccharogutta</i>	97.02	10	1	23	16	38	43	12
137	<i>Clostridium</i> <i>clostridioforme</i>	98.15	1	0	12	10	23	51	47
144	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	97.81	1	0	2	30	1	2	0
152	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> DAF VP30	98.55	10	0	129	27	58	135	137
161	<i>Clostridium</i> <i>laxi</i>	96.3	0	0	1	0	0	4	0
163	<i>Clostridium</i> <i>thermophilum</i>	90.74	0	0	2	0	1	2	0
165	<i>Clostridium</i> <i>thermophilum</i>	98.15	0	0	0	7	0	1	1
166	<i>Clostridium</i> sp. 14616	98.45	2	33	14	44	28	32	26
173	<i>Clostridium</i> sp. 2335	98.32	0	0	0	0	0	1	0
174	<i>Clostridium</i> <i>indolis</i>	100	0	13	68	103	205	152	465
181	<i>Clostridium</i> <i>boltonae</i>	97.96	0	0	6	0	12	2	0
187	<i>Clostridium</i> <i>gallinarum</i>	94.97	0	0	0	0	1	1	1
188	<i>Clostridium</i> <i>laxi</i>	94.12	0	0	0	0	0	1	0
193	<i>Clostridium</i> <i>laxi</i>	98.47	0	0	47	0	33	31	0
196	<i>Clostridium</i> <i>thermophilum</i>	91.64	1	1	2	0	0	1	1
199	<i>Clostridium</i> <i>carnosum</i>	98.05	0	0	0	0	4	9	0
202	<i>Clostridium</i> <i>syntrophicum</i>	97.62	0	0	0	0	0	1	0

[Tabla 1B-2]

203	<i>Eubacterium fecalicola</i>	98.22	0	14	4	38	2	15	15
211	<i>Clostridium indolis</i>	94.15	0	0	0	0	1	1	0
214	<i>Clostridium clostridioforme</i>	95.00	0	1	0	0	0	4	0
221	<i>Flavobacterium paulii</i>	99.69	8	11	17	34	25	36	29
224	<i>Roseburia hominis</i>	85.54	8	2	0	6	0	1	0
225	<i>Clostridium aminophilum</i>	90.8	0	13	10	5	3	2	1
237	<i>Clostridium</i> sp. 14616	99.97	7	0	42	88	100	105	70
246	<i>Clostridium rodentis</i>	95.14	0	0	1	0	0	0	0
252	<i>Oscillospira valenzuelae</i>	92.31	0	0	12	0	0	0	2
259	<i>Eubacterium fecalicola</i>	98.78	1	0	13	17	11	19	13
262	<i>Clostridium favaleense</i>	96.77	0	19	20	215	25	45	117
268	<i>Ruminococcus</i> sp. IDS	97.82	0	0	36	0	4	100	41
268	<i>Clostridium favaleense</i>	97.27	0	0	1	0	2	2	0
277	<i>Clostridium</i> sp. 2335	98.16	15	0	146	62	127	125	263
279	<i>Lachnospiraceae bacterium DUF_VB50</i>	95.55	1	0	11	0	0	10	0
280	<i>Holdemania hofmanni</i>	93.5	14	13	65	31	15	0	33
281	<i>Clostridium scindens</i>	99.69	0	11	6	22	15	11	10
286	<i>Clostridium</i> sp. 2335	97.49	0	0	8	0	3	6	3
287	<i>Eubacterium limosum</i>	87.3	0	0	0	0	0	0	0
288	<i>Clostridium aminophilum</i>	91.33	10	17	394	421	263	249	361
298	<i>Clostridium scindens</i>	99.69	0	7	9	7	10	3	7
297	<i>Clostridium</i> sp. 14616	94.92	8	21	0	82	2	55	24
303	<i>Clostridium favaleense</i>	98.73	2	0	38	0	45	104	54
304	<i>Escherichia coli</i>	100	0	0	0	0	0	1	0
306	<i>Clostridium symbiosum</i>	99.38	0	28	80	22	1	17	8
307	<i>Clostridium</i> sp. 14616	94.39	1	32	61	83	124	60	23
312	<i>Clostridium aminophilum</i>	91.24	0	0	0	0	0	0	0
313	<i>Clostridium saccharogumia</i>	98.01	5	234	538	124	127	351	294
314	<i>Ruminococcus</i> sp. IDS	97.53	0	24	12	88	6	11	39
319	<i>Clostridium</i> sp. 14616	93.18	8	0	7	6	0	5	0
326	<i>Clostridium aminophilum</i>	91.87	0	0	0	0	0	0	0
328	<i>Bacteroides caudatus</i>	92.9	1	3	4	5	1	2	0
332	<i>Bacteroides caudatus</i>	93.83	0	0	2	0	0	1	0
339	<i>Clostridium scindens</i>	95.37	0	39	60	62	62	111	25
337	<i>Anaerobaculum coliformis</i>	99.36	2	1	5	3	3	0	2
336	<i>Clostridium botulinum</i>	96.53	0	0	0	0	1	2	0
340	<i>Hydrogastromonas bacterium saccharovora</i>	87	37	141	305	120	123	173	139
358	<i>Clostridium</i> sp. 2335	96.13	2	3	28	83	63	80	51
359	<i>Clostridium aminophilum</i>	90.86	1	7	13	16	0	0	0
362	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	98.14	3	0	100	78	55	64	23
367	<i>Clostridium aminophilum</i>	90.13	2	0	18	3	17	111	25

[Tabla 2]

Tabla 2

Cepa	OTU correspondiente	Parente cercano	Similitud máx (%)	Agrupación de Clostridiaceae	Origen de muestra de ratón	Medio cultivado
cepa 1	OTU136	<i>Clostridium saccharogumia</i>	99	XVIII	#F8	BL
cepa 2	OTU46	<i>Clostridium ramosum</i>	100	XVIII	#F8, #G2, #J3	BL, EG
cepa 3	OTU221	<i>Flavonifractor plautii</i>	100	IV	#F8, #G2	BL
cepa 4	OTU9	<i>Clostridium halliwayi</i>	99	XIVa	#F8, #G2	BL
cepa 5	OTU296	<i>Clostridium scindens</i>	99	XIVa	#F8	BL
cepa 6	OTU21	<i>Clostridium</i> sp. 2335	99	XIVa	#F8, #G2	BL
cepa 7	OTU166	<i>Clostridium</i> sp. 14616	99	XIVa	#G2	BL
	OTU237					
cepa 8	OTU73	cf. <i>Clostridium</i> sp. MLG055	99	XVI	#G2	BL
cepa 9	OTU174	<i>Clostridium indolis</i>	99	XIVa	#G2, #J3	EG
cepa 10	OTU166	<i>Clostridium</i> sp. 14616	97	XIVa	#I1	EG
	OTU181	<i>Clostridium bolleeae</i>	98			
cepa 11	OTU14	<i>Bacteroides</i> sp. MANG	99	XIVa	#I1	EG
cepa 12	OTU55	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium DJF_VP30	96	XIVa	#I1	EG
cepa 13	OTU337	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	99	IV	#I1	EG
cepa 14	OTU314	<i>Ruminococcus</i> sp. ID8	99	XIVa	#I1	EG
cepa 15	OTU195	<i>Clostridium lavalense</i>	99	XIVa	#I1	EG
cepa 16	OTU306	<i>Clostridium symbiosum</i>	99	XIVa	#I1	EG
cepa 17	OTU87	<i>Eubacterium contortum</i>	99	XIVa	#I1	EG

[Tabla 3-1]

Tabla 3

Cepa	OTU	Longitud secuenciada (pb)	Cepas más cercanas	Similitud	BLAST	Similitud con otra cepa
Cepa 3	136	1179	<i>Clostridium saccharogenum</i>	98.79	KDP100	
			<i>Clostridium sartanum</i> JCM1123	98.79	genomeB	
Cepa 2	46	1184	<i>Clostridium sartanum</i>	100	KDP100	
			<i>Clostridium sartanum</i> JCM1123	100	genomeB	
Cepa 18	46	402	<i>Clostridium sartanum</i>	100	KDP100	Cepa 2
			<i>Clostridium sartanum</i>	100	genomeB	(100%)
Cepa 3	121	1183	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	99.98	KDP100	
			<i>Parabacteroides johnsonii</i> ATCC 35779	99.98	genomeB	
Cepa 4	8	1174	<i>Clostridium histolyticum</i>	99.91	KDP100	
			<i>Clostridium histolyticum</i> W81	99.91	genomeB	
Cepa 11	14	467	<i>Bacteroides</i> sp. M100	99.93	KDP100	Cepa 4
			<i>Clostridium machanaphyllum</i> JCM	99.93	genomeB	(100%)
Cepa 19	8	474	<i>Bacteroides</i> sp. M100	99	KDP100	Cepa 4
			<i>Clostridium machanaphyllum</i>	99.96	genomeB	(100%)
Cepa 20	14	479	<i>Bacteroides</i> sp. M100	99	KDP100	Cepa 4
			<i>Clostridium machanaphyllum</i>	99.97	genomeB	(100%)
Cepa 20	100	479	<i>Bacteroides</i> sp. M100	99	KDP100	Cepa 4
			<i>Clostridium machanaphyllum</i>	99.96	genomeB	(100%)
Cepa 5	196	1183	<i>Clostridium acetabulum</i>	99.93	KDP100	
			<i>Lachnospiraceae bacterium</i> f_1_51PAA	99.98	genomeB	
Cepa 6	33	1208	<i>Bifidobacterium</i>	99.93	KDP100	
			<i>Lachnospiraceae bacterium</i> f_1_43EAA	99.93	genomeB	
Cepa 7	188	1149	<i>Clostridium</i> sp. L1616	99.98	KDP100	
			<i>Clostridium boltonii</i> ATCC 25462	99.98	genomeB	
Cepa 8	73	1199	<i>Clostridium</i> sp. M100	99.93	KDP100	
			<i>Exiguobacterium</i> sp. M100	99.93	genomeB	
Cepa 9	174	1189	<i>Clostridium indolis</i>	99.94	KDP100	
			<i>Anaerostipes</i> sp. M100	99.93	genomeB	
Cepa 22	86	478	<i>Clostridium indolis</i>	100	KDP100	Cepa 2
			<i>Anaerostipes</i> sp. M100	99.96	genomeB	(100%)

[Tabla 3-2]

Cepa 10	188	483	<i>Clavibacterium bethense</i>	98.83	EDP110	
			<i>Clavibacterium bethense</i> ATCC BAA-613	97.38	genomeB	
Cepa 11	88	487	<i>Lachnospiraceae bacterium DSE_V220</i>	98.98	EDP110	
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_57FAA_CN</i>	98.13	genomeB	
Cepa 13	337	490	<i>Asaeroa galeae colibaculata</i>	100	EDP110	
			<i>Asaeroa galeae colibaculata</i> DSM 17341	100	genomeB	
Cepa 14	314	487	<i>Ruminococcus</i> sp. D88	99.64	EDP110	
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_56FAA</i>	96.8	genomeB	
Cepa 16	308	486	<i>Clavibacterium laevigatum</i>	99.86	EDP110	
			<i>Clavibacterium asparagiforme</i> DSM 18931	100	genomeB	
Cepa 16	308	478	<i>Clavibacterium symbiosum</i>	99.79	EDP110	
			<i>Clavibacterium symbiosum</i> WAL-14163	99.88	genomeB	
Cepa 17	87	474	<i>Exiguobacterium carotearum</i>	99.84	EDP110	
			<i>Clavibacterium</i> sp. D8	99.42	genomeB	
Cepa 22	87	499	<i>Exiguobacterium carotearum</i>	99	DSB3	Cepa 17
			<i>Clavibacterium</i> sp. D8	99.43	genomeB	(100%)
Cepa 22	182	491	<i>Lachnospiraceae bacterium DSE_V220</i>	98	DSB3	
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_57FAA_CN</i>	96.98	genomeB	
Cepa 24	283	478	<i>Oribacterium bacterium DSE_V61818</i>	93	DSB3	
			<i>Oribacterium valerioligense</i>	98.24	genomeB	
Cepa 25	329	491	<i>Exiguobacterium carotearum</i>	99	DSB3	
			<i>Clavibacterium</i> sp. D8	99.78	genomeB	
Cepa 28	283	488	<i>Clavibacterium laevigatum</i>	97	DSB3	
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_57FAA</i>	98.83	genomeB	
Cepa 27	288	488	<i>Lachnospiraceae bacterium D8</i>	98	DSB3	
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_57FAA_CN</i>	97.41	genomeB	
Cepa 28	334	490	<i>Clavibacterium</i> sp. D1606788	98	DSB3	
			<i>Clavibacterium bacterium J_1_57FAA</i>	99.66	genomeB	
Cepa 29	308	488	<i>Lachnospiraceae bacterium D8</i>	98	DSB3	
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_57FAA_CN</i>	97.8	genomeB	
Cepa 31	347	489	<i>Lachnospiraceae bacterium D8</i>	98	DSB3	Cepa 28
			<i>Lachnospiraceae bacterium J_1_57FAA_CN</i>	97.8	genomeB	(100%)

[Tabla 4]

Tabla 4

Cepa	OTU correspondiente	Longitud secuenciada de ADN 16S (pb)	Especie más cercana	Agrupación de Clostridia	Similitud con la especie más cercana (%)	Base de datos usada para BLAST	Similitud con otra cepa	Mezcla					
								23-mix	17-mix	5-mix-A	5-mix-B	5-mix-C	3-mix
cepa1	OTU136	1418	Clostridium saccharogumia	XVIII	99.75	RDPiso							
			Clostridium ramosum JCM1298		96.78	genomeDB							
cepa2	OTU46	1184	Clostridium ramosum	XVIII	100	RDPiso	cepa 18						
			Clostridium ramosum JCM1298		100	genomeDB	>99%						
cepa3	OTU221	1427	Flavonifractor plautii	IV	100	RDPiso							
			Pseudoflavonifractor capillosus ATCC 29799		97.22	genomeDB							
cepa4	OTU9	1430	Clostridium hathewayi	XIVa	99.31	RDPiso							
			Clostridium saccharolyticum WM1		95.06	genomeDB							
cepa5	OTU296	1433	Clostridium scindens	XIVa	99.23	RDPiso							
			Lachnospiraceae bacterium 5_1_57FAA		99.05	genomeDB							
cepa6	OTU21	1426	Blautia coccooides	XIVa	99.92	RDPiso							
			Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA		96.43	genomeDB							

cepa7	OTU166	1432	Clostridium sp. Clostridium botteae ATCC BAA-613	XIVa	99.56 99.56	RDPiso genomeDB					
cepa8	OTU73	1433	cf. Clostridium sp. MLG055 Erysipelotrichaceae bacterium 2_2_44A	XVI	99.42 92.71	RDPiso genomeDB					
cepa9	OTU174	1434	Clostridium indolis Anaerostipes cacciae DSM 14662	XIVa	99.24 97.73	RDPiso genomeDB					
cepa10	OTU166	1431	Clostridium botteae Clostridium botteae ATCC BAA-613	XIVa	96.03 97.15	RDPiso genomeDB					
cepa11	OTU14	1430	Bacteroides sp. MANG Clostridium saccharolyticum WM1	XIVa	99.33 94.9	RDPiso genomeDB	cepa 4 >98%				
cepa12	OTU55	1431	Lachnospiraceae bacterium DJF_VP30 Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1	XIVa	96.08 99.12	RDPiso genomeDB					
cepa13	OTU337	1418	Anaerotruncus colihominis Anaerotruncus colihominis DSM 17241	IV	100 100	RDPiso genomeDB					
cepa14	OTU314	1429	Ruminococcus sp. ID8 Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA	XIVa	99.54 96.5	RDPiso genomeDB					

cepa15	OTU195	1430	Clostridium lavalense Clostridium asparagiforme DSM 15981	XIVa	99.56 100	RDPiso genomeDB				
cepa16	OTU306	1430	Clostridium symbiosum Clostridium symbiosum WAL-14163	XIVa	99.78 99.56	RDPiso genomeDB				
cepa17	OTU87	474	Eubacterium contortum Clostridium sp. D5	XIVa	99.34 99.12	RDPiso genomeDB	cepa 22 >99%			
cepa18	OTU46	1422	Clostridium ramosum Clostridium ramosum	XVIII	100 100	DDBJ genomeDB				
cepa19	OTU9	474	Bacteroides sp. MANG Clostridium saccharolyticum	XIVa	99 94.96	DDBJ genomeDB	cepa 4 >99%			
cepa20	OTU14	1430	Bacteroides sp. MANG Clostridium saccharolyticum	XIVa	99 95.81	DDBJ genomeDB	cepa 4 >99%			
cepa21	OTU87	490	Eubacterium contortum Clostridium sp. D5	XIVa	99 99.13	DDBJ genomeDB				
cepa22	OTU86	1424	Clostridium indolis Anaerostipes caccae	XIVa	100 96.96	DDBJ genomeDB	cepa 9 >99%			
cepa23	OTU152	1430	Lachnospiraceae bacterium DJF_VP30 Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1	XIVa	95 98.48	DDBJ genomeDB				

[illegible]

OTU3 (SEQ ID NO.: 70)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACTA
AGACGGATTTC
TTCGGATTGAAGTCTTTGTGACTGAGCGGCGGACGGTGAGTAACGCGTGG
GTAACCTGCC
TCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGGACCGC
ATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTG
GAGGGTAACGGCCACCGAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TGAACGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCAG

5

OTU9 (SEQ ID NO.: 22)

GATGAACGCTGGCGGCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTT
TCGAGTGAAG
TTTTGGATGGAATTGAAATTGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGTAACCTG
CCTTACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGGGCC
GCATGGTCTGGTGCAGAAAACTCCGGTGGTGTAAAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGGTAGT
TGGTGGGGTAACGGCCACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGACCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

10

OTU14 (SEQ ID NO.: 28)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTT
TCAATGAAGTT
TTCGGATGGAATTGAAATTGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTGC
CTTACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGGGCCG
CATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTAAAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGGTAGTT
GGTGGGGTAACGGCCACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGACCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

15

OTU15 (SEQ ID NO.: 71)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCATT
 AGACAGATTTC
 TTCGGATTGAAGTCTTTGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTGC
 CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGGGCCG
 CATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTAAAGATGGACCCGCGTCTGA
 TTAGGTAGTT
 GGTGGGGTAACGGCCACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTGACCGGCCA
 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU21 (SEQ ID NO.: 24)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTA
 AGACAGATTTC
 TTCGGATTGAAGTCTTTGTGGCTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTGC
 CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGGACCG
 CATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
 TTAGCTAGTT
 GGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
 CTGAACGGCCA
 5 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU23 (SEQ ID NO.: 72)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTTT
 GGAAGGAAGT
 TTTCGGATGGAATTCCTTAATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCG
 TGGGGAACCT
 CCCTACTACAGGGGAGTAACAGCTGGAACGGACTGCTAATACCGCATAA
 GCGCACAGAAT
 CGCATGATTCCGGTGTGAAAGCTCCGGCAGTATAGGATGGTCCCGCGTCTG
 ATTAGCTGGT
 TGGCGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGA
 GTGGACGGCCA
 10 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU38 (SEQ ID NO.: 73)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTT
TCAATGAAGTT
TTCGGATGGAATTGAAATTGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTGC
CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGGACCG
CATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGCTAGTT
GGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAG

OTU46 (SEQ ID NO.: 20)

5 GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCGAGCACT
TGTGCTCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTAGACAGGGGGATAA
CTATTGGAAA
CGATAGCTAAGACCGCATAGGTACGGACACTGCATGGTGACCGTATTAAA
GTGCCCTCAA
GCACTGGTAGAGGATGGACTTATGGCGCATTAGCTGGTTGGCGGGGTAAC
GGCCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCC
CAG

OTU49 (SEQ ID NO.: 74)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACACGCAAGACGAACGAAGCAATT
AAAATGAAGTT
TTCGGATGGATTTTGTATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GATAACCTGC
CTCACACTGGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAG
CGCACAGTACC
GCATGGTACGTGTGAAAACTACCGGTGGTGTGAGATGGAGTCCCGCGTCT
GATTAGCCAG
TTGGCGGGGTAACGGCCACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGACCGGC

10 CACATTGGGGACTGAGACACGGGCCCAA

OTU55 (SEQ ID NO.: 29)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTACA
CGGAGGAAGTT

TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGCC

CTGTACCGGGGATAAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACGGAACCGC

ATGGTTCCGTGTGAAAACTACCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTT

GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCA

CATTGGGACTGAGACACAGCCCA

OTU57 (SEQ ID NO.: 75)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTT
TCGATGAAGTT

5 TTCGGATGGATTTGAAATCGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTGC
CTTACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGC
ACAGGGCCG
CATGGTCTGGTGCGAAAACTCCGGTGGTGTAAGATGGACCCGCGTCTGAT
TAGCCAGTT
GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TGAACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU73 (SEQ ID NO.: 26)

GATGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAAGTGAAGA
TAGCTTGCTA
TCGGAGCTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAACCTGCCTGTAT
GACCGGGAT
AACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATAGGCAGAGAGGAGGCATCTC
TTCTCTGTTA
AAGTTGGGATACAACGCAAACAGATGGATCTGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAC
GGCCCACCAAGGCGATGATGCATAGCCGGCCTGAGAGGGCGAACGGCCAC
ATTGGGACTG

10 AGACACGGCCCAA

OTU86 (SEQ ID NO.: 35)

ES 2 993 669 T3

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTN
TTGGAAGGAAG
TTTCGGATGGAATTCCTTAATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCG
TGGGGAACCT
ACCCTATACAGGGGGATAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAA
GCGCACAGAAT
CGCATGATTCCGTGTGAAAAGCTCCGGCAGTATAGGATGGTCCCCGCTCT
GATTAGCTGG
TTGGCGGGTAACGGCCCAACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAG
AGTGGACGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU87 (SEQ ID NO.: 34)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTT
TACTTAGATTT
CTTCGGATTGAAAGTTTTGCGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTG
5 CCTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAG
ACCACAGTACC
GCATGGTACAGTGGGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTG
ATTAGCTAGT
TGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGACCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU89 (SEQ ID NO.: 76)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTTT
GGAAGGAAGT
TTTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGC
CCTGTACCGGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAACACCGCATAAGC
GCACGGAACCG
CATGGTTCTGTGTGAAAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCCGCGTCTG
ATTAGCCAGT
TGGCGAGGGTAACGGCCTACCAAAGACGACGATCAGTAGCCGGCCTGAG
AGGGTGAACGG

10 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU92 (SEQ ID NO.: 77)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTATG
CAGAGGAAGTT

TTCGGATGGAATCGGCGTAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGCC

CTGTACCGGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGCTTCAC

ATGAGGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTAAAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGGTAGTTG

GTGGGGTAACGGCCACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGACCGGCCAC

ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU101 (SEQ ID NO.: 78)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
AAGATGAAGTT

TTCGGATGGAATCTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GATAACCTGC

CTCACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGTGCCG

5 CATGGCAGTGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTT

GGCGGGGTAAACGGCCACCGAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGACCGGCCA

CACTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU111 (SEQ ID NO.: 79)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTACA
CAGAGGAAGTT

TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGCC

CTGTACCGGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGCTTCAC

ATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGA
TTAGCTGGTTG

GCGGGGTAAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGAG
TGGACGGCCAC

10 ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU114 (SEQ ID NO.: 80)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTG
 TTTTCAGAATC
 TTCGGAGGAAGAGGACAGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGGCAACCTGC
 CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGGACCG
 CATGGTGTAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
 TTAGCCAGTT
 GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGAACGGCCA
 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU119 (SEQ ID NO.: 81)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
 AAGATGAAAGTT
 TTCGGATGGAATCTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GATAACCTGC
 CTCACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGTGCCG
 CATGGCAGTGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGA
 TTAGCCAGTT
 5 GCGGGGTAAACGGCCCCGACCAAAGCGACGGATCAGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTNACCGGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU125 (SEQ ID NO.: 82)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTG
 TTTTCAGAATC
 TTCGGAGGAAGAGGACAGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGGCAACCTGC
 CTCATACAGCGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGGACCG
 CATGGTGTAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
 TTAGGTAGTT
 GGTGGGTAAAGGCTACCGAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGACGAGG
 GTGACCGGCCA
 10 CGATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU131 (SEQ ID NO.: 83)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
AAGATGAAGTT
TTCGGATGGAATCTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GATAACCTGC
CTCACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGTGCCG
CATGGCAGTGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTT
GCGGGTAACGGCCACCGAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGACGAGGG
TNACCGGCACA
TTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU136 (SEQ ID NO.: 19)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGAGCACT
TGTGCTCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTTTACAGGGGGATA
ACTATTGGAAA
CGATAGCTAAGACCGCATAGGTAAAGATACCGCATGGTAAGTTTATTAA
AAGTGCCAAGG
CACTGGTAGAGGATGGACTTATGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCC
5 AG

OTU137 (SEQ ID NO.: 84)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
AAGATGAAGTT
TTCGGATGGAATCTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GATAACCTGC
CTCACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAG
CGCACAGTGCC
GCATGGCAGTGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTG
ATTAGGTAGT
TGGTGGGGTAACGGCCCAACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGACCGGCC
10 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU144 (SEQ ID NO.: 85)

ES 2 993 669 T3

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTT
TCGATGAAGTT
TTTGGATGGAATTGAAATTGACTTAGCGGCCGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACTGC
CTTACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGGGCCG
CATGGTCTGGTGCGAAAACTCCGGTGGTGTAAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGGTAGTT
GGTGGGGTAACGGGCCACCGAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGACCGGCA
CATTGGGACCTGAGACACGGGCCCA

OTU152 (SEQ ID NO.: 36)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTAGA
CAGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGCC
CTGTACCGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACGGAACCGC
ATGGGTTCTGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGAT
TAGCCAGTTG
GCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TGAACGGCCAC
5 ATTGGGACTGAGACACGGGCCAA

OTU161 (SEQ ID NO.: 86)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTT
TAGATGAAGTT
TTCGGATGGATTCTGAGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GATAACCTGC
CTCACACTGGGGGACAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGTACCG
CATGGTACGGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGAT
TAGCCAGTT
GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TGAACGGCCA
10 CATTGGGACTGAGACACGGGCCAA

OTU163 (SEQ ID NO.: 87)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTACAC
GGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAAACCTGCC
CTGTACCGGGGGGATAAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCGC
ACGGAACCGC
ATGGTTCCGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGATT
AGGTAGTTG
GTGGGGTAACGGGCCACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GACCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU165 (SEQ ID NO.: 88)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCACCTT
TGA CTGAGGT
TTCGGCCAAATGATAGGAATGCTTAGTGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTG
AGGAACCTAC
CTTCCAGAGGGGACGAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATGACGCA
TGACCGGGGC
GATCCCGGGCCGATGTCAAAGATTTTATTCGCTGGAAGATGGCCTCGCGTC
TGATTAGCT
AGATGGTGGGGTAACGGGCCACCATGGCGACGATCAGTAGCCGGACTGAG
AGGTTGACCG
GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCA

5

OTU166 (SEQ ID NO.: 25)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATTA
AAATGAAGTT
TCGGATGGATTTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGAT
AACCTGCCT
CACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGCA
CAGTACCGCA
TGGTACGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGATTA
GCCAGTTGG
CGGGGTAACGGGCCACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACG
ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

10

OTU173 (SEQ ID NO.: 123)

GACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTGTG
 TTGAAAGCTTG
 CTGGATATACAACCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACT
 GCCTCATACAG
 GGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGGAT
 CGCATGGTCTG
 GTGTGAAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAAGTAGT
 TGGAGGGGTA
 ACGGCCCCACCAAGGCGACGAGTCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGG
 CCACGATTGGG
 ACTGAGACACGGCCCCAG

OTU174 (SEQ ID NO.: 27)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTTT
 GGAAGGAAGT
 TTTCGGATGGAATTCCTTAATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCG
 TGGGGAACCT
 GCCCTATACAGGGGGATAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAA
 GCGCACAGAAT
 CGCATGATTCCGTGTGAAAAGCTCCGGCAGTATAGGATGGTCCCGCGTCT
 GATTAGCTGG
 TTGGCGGGGTAACGGCCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGA
 GAGTGGACGGC
 5 CACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU181 (SEQ ID NO.: 89)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
 TAAAATGAAGT
 TTTCGGATGGATTTTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGATAACCTG
 CCTCACGACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAA
 GCGCACAGTAC
 CGCATGGTACGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTG
 ATTAGCCAG
 TTGCGGGGTAAACGGCCCCACCGAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTGACCGGC
 10 CACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU182 (SEQ ID NO.: 90)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGGGCAGCA
 ATGCCCCGAGT
 GGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTTTACAGGGGGATAA
 CTATTGGAAA
 CGATAGCTAAGACCGCATAGGTAAAGATACCGCATGGTAAGTTTATTAAA
 AGTGCCAAAGG
 CACTACGAGGGAGTAGTGATATGCGCATAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGC
 GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAG

OTU189 (SEQ ID NO.: 91)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTTT
 AGATGAAGTT
 TTCGGATGGATTCTGAGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
 GATAACCTGC
 CTCACACTGGGGGACACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGC
 ACAGCTTCAC
 ATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGATT
 AGCCAGTTG
 GCAGGGTAACGGCCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GAACGGCCAC

5 ATTGGGACTGAGACACGGCCCAG

OTU195 (SEQ ID NO.: 32)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTT
 TAGATGAAGTT
 TTCGGATGGATTCTGAGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 GGATAACCTGC
 CTCACACTGGGGGACGAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAG
 CGCACAGTACC
 GCATGGTACGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTG
 ATTAGCCAGT
 TGGCGGGTAACGGGCCACCGAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTGACCGGCC

10 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAA

OTU196 (SEQ ID NO.: 92)

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCACCCC
TGAATGAGGT
TTCGGCCAAAGGAAGGGAATGCTTAGTGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTG
AGGAACCTGC
CTTTCAGAGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATGACACA
TGAATGGGGC
ATCCCATTGATGTCAAAGATTTATCGCTGAAAGATGGCCTCGCGTCCCATT
AGCTAGTAG
GCGGGGTAACGGGCCACCTAGGCGACGATGGGTAGCCGGACTGAGAGGTT
GACCGGCCAC
ATTGGGACTGAGATACGGCCCA

OTU199 (SEQ ID NO.: 93)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCACTT
GTGCTCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTAGACAGGGGGAGTA
ACTATTGGAA
CGATAGCTAAGACCGCATAGGTACGGACACTGCGTGGTGACCGTATTAAA
AGTAGCCTCA
AAGACACTGGTAGAGGATGGACTTATGGCGCATTAGCTGGTTGGCGGGGT
AACGGGCCAC
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGG
ACTGAGACAC
5 GGCCAG

OTU202 (SEQ ID NO.: 94)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
TAACGGAAGTT
TTCGGATGGAAGTTGAATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTGC
CTTGTACTGGGGGACAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGTATCG
CATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAAGATGGACCCGCGTCTG
ATTAGCTAGTT
GGAGGGGTAACGGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCA

10 CATTGGGACTGAGACACGGCCAG

OTU204 (SEQ ID NO.: 95)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACTAA
 GACGGATTTC
 TTCGGATTGAAGTCTTTGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
 GTAACCTGC
 CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGAC
 CACAGTACCG
 CATGGTACAGTGGGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
 TTAGCTAGTT
 GGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
 TGACCGGCCA
 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU211 (SEQ ID NO.: 96)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTTT
 CGATGAAGTT
 TTCGGATGGATTTGAAATCGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTGC
 CTTACACTGGGGGATAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCG
 CACAGAATCG
 CATGATTCGGTGCGAAAAGCTCCGGCAGTATAGGATGGTCCCGCGTCTGAT
 TAGCTGGTT
 GCGCGGGTAACGGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGAG
 TGGACGGCCA
 5 CATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU214 (SEQ ID NO.: 97)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
 AAGATGAAGTT
 TTCGGATGGAATCTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTGC
 CTCATACAGGGGGAGTAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAG
 CGCACAGGGCT
 GCATGGCCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTG
 ATTAGCTAGT
 TGGAGGGGTAACGGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAG
 GGTGAACGGCC
 10 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU221 (SEQ ID NO.: 21)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGTGCTCA
 TGACGGAGGA
 TTCGTCCAACGGATTGAGTTACCCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
 GGAACCTGC
 CTTGGAGAGGGGAATAACACTCCGAAAGGAGTGCTAATACCGCATGATGC
 AGTTGGGTCTG
 CATGGCTCTGACTGCCAAAGATTTATCGCTCTGAGATGGCCTCGCGTCTGA
 TTAGCTAGT
 AGGCGGGGTAACGGCCACCTAGGCGACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGG
 TTGACCGGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU224 (SEQ ID NO.: 98)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACCTT
 GGCGGATTTC
 TTCGGATTGAAGCCTTGGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTGC
 CCTGTACCGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
 CACAGCTTCA
 CATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGCGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGA
 TTAGCCAGTT
 GACAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
 TGAACGGCCA

5 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU225 (SEQ ID NO.: 99)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAAGTTATG
 CAGAGGAAGT
 TTTCGGTATGGAATCGGCGTAACCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGAAACCTG
 CCCTGTACCGGGGGAGTAACACTTAGAATAGGTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGCTTC
 ACATGAGGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTG
 ATTAGCCAGT
 TGGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGAACGGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

10

OTU237 (SEQ ID NO.: 100)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
 GAAGGAAGTTT

TCGGATGGAATTCGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGA
TAACCTGCCT
CACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGCA
CAGTGCCGCA
TGGTACGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGATTA
GCCAGTTGG
CGGGGTAAACGGCCACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACA
TTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU246 (SEQ ID NO.: 101)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTATGC
AGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCGGCGTAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAAACCTGCC
CTATACAGGGGGATAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGC
ACAGAATCGC
ATGATTCCGGTGTGAAAAGCTCCGGCAGTATAGGATGGTCCCGCGTCTGATT
AGCTGGTTG
GCGGGGTAAACGGCCACCAAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGAGT
GGACGGCCAC
5 ATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU253 (SEQ ID NO.: 37)

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAATCGAACGGAGCACCTT
TGACTGAGGT
TTCGGCCAAATGATAGGAATGCTTAGTGGCGGACTGGTGAGTAACGCGTG
AGGAACCTGC
CTTCCAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATGACGC
ATGACCGGGG
CATCCCGGGCATGTCAAAGATTTTATCGCTGGAAGATGGCCTCGCGTCTGA
TTAGCTAGA
TGGTGGGGTAAACGGCCACCATGGCGACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGG
TTGACCGGCC
10 ACATTGGGACTGAGATACGGGCCAG

OTU259 (SEQ ID NO.: 38)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTT
ACTTAGATTT
CTTCGGATTGAAAAGTTTTGCGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACT
GCCTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAG
ACCACGGTAC
CGCATGGTACAGTGGGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCT
GATTAGCTAG
TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGACCGGC
ACATTGGGACCTGAGACACGGCCCAA

OTU262 (SEQ ID NO.: 102)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTT
TAGATGAAGTT
TTCGGATGGATTCTGAGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGATAACCTGC
CTCACACTGGGGGACAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGTACCG
CATGGTACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTT
GGCGGGGTAACGGCCACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGACCGGCCA
CATTGGGGACCTGAGACACGGCCCA

5

OTU268 (SEQ ID NO.: 103)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTG
TTTTCAGAATC
TTCGGAGGAAGAGGACAGTGAAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGCAACCTGC
CTCATACAGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGGACCG
CATGGTGTAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGGTAGTT
GGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGACG
GGTGACCGGCA
CATTGGGGACTGAGACACGGGCCCA

10

OTU269 (SEQ ID NO.: 104)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTT
TAGATGAAGTT
TTCGGATGGATTCTGAGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGATAACCTGC
CTCACACTGGGGGACGAACAGTTAGAAATAGACTGCTAATACCGCATAA
GCGCACAGTAC
CGCATGGTACAGTGTGAAAACTACCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGCT
GATTAGTCCA
GTTGGCGGGGTAACGGCCGACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGACCGG
CCGACAGTTGGGACTGAGACACGGGCCCA

15

OTU277 (SEQ ID NO.: 105)

ES 2 993 669 T3

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACTA
AGACGGATTTC
TTTGGATTGAAGTCTTTGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGTAACCTGC
CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGGATCG
CATGGTCTGGTGTGGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTG
ATTAGCTAGT
TGGAGGGGTAAACGGCCCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAG
GGTGAACGGCC
ACGATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU279 (SEQ ID NO.: 106)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTAGA
CAGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAACCTGCCC
TGTACCGGGGGAGTAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACGGAACCGC
ATGGTTCTGTGTGAAAACTACCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTT
GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCA
5 CATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU280 (SEQ ID NO.: 107)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTAAA
GGAGCTTGCT
TCTTTACGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGCAATCTGCCC
ATCGGCCTGGG
ATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATAGGTTAGTTTCTGGCATC
AGGGACTAAT
TAAAGTTGGGATACAACACGGATGGATGAGCTTATGGCGTATTAGCTAGT
AGGTGAGGTA
ACGGCCCACTAGGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCC
ACATTGGGAC
10 TGAGACACGGCCCAA

OTU281 (SEQ ID NO.: 39)

ES 2 993 669 T3

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCGCTTC
CGCCTGATTT
TCTTCGGAGATGAAGGCGGCTGCGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACG
CGTGGGCAAC
CTGCCCTTGCACTGGGGGATAACAGCCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAA
GACCGAAGC
GCCGCATGGCGCTGCGGCCAAAGCCCCGGCGGTGCAAGATGGGCCCCGCT
CTGATTAGGT
AGTTGGCGGGGTAAACGGCCACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGACCG
GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU286 (SEQ ID NO.: 108)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACTA
AGACGGATTTC
TTCGATTGAAGTCTTTGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGTAACCTGC
CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGGATCG
CATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTT
GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCA
5 CATTGGGACTGAGACACGGGCCCAA

OTU287 (SEQ ID NO.: 109)

GACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACACATC
CGACGGAATAG
CTTGCTAGGAAGATGGATGTTGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GAGCAACCTGC
CTCGGAGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGG
TGGTCGGGGGA
CATCCCCTGGCCAAGAAAGGATTATATCCGCTCTGAGATGGGCTCGCGTC
TGATTAGCTA
GTTGGCGGGTAATGGCCCGACCGAAGGCAACGATCAGTAGCCGGACTGA
GAGGTTGAACG

10 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAG

OTU288 (SEQ ID NO.: 40)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTATGC
 AGAGGAAGTT
 TTCGGATGGAATCGGCGTAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
 GAAACCTGCC
 CTGTACCGGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCGC
 ACAGCTTCAC
 ATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGATT
 AGCCAGTTG
 GCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GAACGGCCAC
 ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU296 (SEQ ID NO.: 23)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCGCCTG
 GCGCCGACTT
 CTTCGGAACGAGGAGCCTTGCCTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCG
 TGGGCAACCT
 GCCTTGCACTGGGGGATAACAGCCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAG
 ACCGAAGCGC
 CGCATGGCGCAGCGGCCAAAGCCCCGGCGGTGCAAGATGGGCCCCGCGTCT
 GATTAGGTAG
 TTGGCGGGGTAAACGGCCCAACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTGACCGGC
 5 CACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU297 (SEQ ID NO.: 110)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATCT
 TATAGGAAGTT
 TTCGGATGGAATATGGGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGATAACCTGC
 CTCACACTGGGGGAGTAACAGTTAGAAATGGCTGCTAATACCCCACTAA
 GCGCACGGTAC
 CGCATGGTACGGTGTGAAAAACCCAGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTC
 TGATTAGCCAG
 TTGGCGGGGTAAACGGCCCGACCAAACGCGACGATCAGTAGCCGACCTGA
 GAGGGTGACCG
 10 GCCGACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU303 (SEQ ID NO.: 111)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATTTT
 AGATGAAGTT
 TTCGGATGGATTCTGAGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
 GATAACCTGC
 CTCACACTGGGGGACAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCG
 CACAGTACCG
 CATGGTACAGCGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGAT
 TAGCCAGTT
 GGCGGGGTAAACGGGCCACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
 TGACCGGCAC
 ATTGGGGACTGAGACCACGGGCCCAA

OTU304 (SEQ ID NO.: 112)

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGA
 AGCAGCTTGC
 TGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCCG
 ATGGAGGGG
 GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAA
 GAGGGGGACC
 TTAGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGG
 GGTAAAGGC
 TCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
 GAACTGAGA
 5 CACGGTCCAG

OTU306 (SEQ ID NO.: 33)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCGACTT
 AACGGAAGTT
 TTCGGATGGAAGTTGAATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GGTAACCTGC
 CTTGTACTGGGGGACGAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGTATC
 GCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAAGATGGACCCGCGTCTG
 ATTAGCTAGT
 TGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTGACCGGCC
 10 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU307 (SEQ ID NO.: 113)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATCT
 TATAGGAAGTT

TTCGGATGGAATATGGGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GAGTAACCTG
CCTCACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGGCTGCTAATACCCCATAGCG
CACAGTACC
GCATGGTACGGTGTGAAAAACCCAGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTG
ATTAGCCAGT
TGGCGGGTAACGGCCGACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGACCGGCAC
GATTGGGACCTGAGACACGGGCCCA

OTU312 (SEQ ID NO.: 114)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTATAT
CGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCAGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAAACCTGCC
CTGTACCGGGGGGATAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCGC
ACAGCTTCAC
ATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATT
AGCTAGTTG
GAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
GAACGGCCAC
5 ATTGGGACTGAGACACGGCCCAG

OTU313 (SEQ ID NO.: 115)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGGGCAGCA
ATGCCCCAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTTTACAGGGGGATAA
CTATTGAAA
CGATAGCTAAGACCGCATAGGTAAAGATACCGCATGGTAAGTTTATTAAA
GTGCCAAGGC
ACTGGTAGAGGATGGACTTATGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGC
TCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCA
A

10

OTU314 (SEQ ID NO.: 31)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTGT
TTTCAGAATC
TTCGGAGGAAGAGGACAGTACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGCAACCTGC
CTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGGACCG
CATGGTGTAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGAT
TAGGTAGTT
GGTGGGGTAAGGCCGTACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGACCGGCCA
CATTGGGGACTGAGACACGGGCCA

OTU319 (SEQ ID NO.: 116)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTAGA
CAGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGCC
CTGTACCGGGGATAAACACTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGTACCGC
ATGGTACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGAT
TAGCCAGTTG
GCGGGGTAAACGGCCCAACAAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGACCGGCACA
TTGGGACTGAGACACGGCCCAA

5

OTU326 (SEQ ID NO.: 117)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATT
AAAATGAAGTT
TTCGGATGGATTTTTGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GATAACCTGC
CTCACACTGGCGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
GCACAGCTTCA
CATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTG
ATTAGCCAGTT
GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGAACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

10

OTU328 (SEQ ID NO.: 118)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTGCCT
TAGAAAGAGGA
TTCGTCCAATTGATAAGGTTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
AGGAACCTGC
CTCGGAGTGGGGAATAACAGACCGAAAGGTCTGCTAATACCGCATGATG
CAGTTGGACCG
CATGGTCCTGACTGCCAAAGATTTATCGCTCTGAGATGGCCTCGCGTCTGA
TTAGCTTGT
TGGCGGGGTAAATGGCCCAACAAAGGCGACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGG
TTGGCCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

15

OTU333 (SEQ ID NO.: 119)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTGCTCA
 TGACAGAGGA
 TTCGTCCAATGGAGTGAGTTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
 GTAACCTGC
 CTTGGAGTGGGGAATAACAGGTGGAAACATCTGCTAATACCGCATGATGC
 AGTTGGGTCG
 CATGGCTCTGACTGCCAAAAGATTTATCGCTCTGAGATGGACTCGCGTCTGA
 TTAGCTGGT
 TGGCGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGGTT
 GGCCGGCCAC
 ATTGGGACTGAGACACGGCCAG

OTU334 (SEQ ID NO.: 41)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCATCCC
 ATAGGAAGTT
 TTCGGATGGAATATGGGATGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
 GATAACCTGC
 CTCACACTGGGGGATAACAGTTAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCG
 CACAGTACCG
 CATGGTACGGTGTGAAAAACCCAGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGAT
 TAGCCAGTT
 GGCGGGGTAAACGGCCACCAAGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGG
 TGACCGGCCA
 5 CATTGGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU337 (SEQ ID NO.: 30)

GACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCTTAC
 GTTTTGAAGTT
 TTCGGATGGATGAATGTAAGCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
 AGCAACCTGCC
 TTTCAGAGGGGGATAACAGCCGGAACGGCTGCTAATACCGCATGATGT
 TGCGGGGGCAC
 ATGCCCCTGCAACCAAAGGAGCAATCCGCTGAAAGATGGGCTCGCGTCC
 GATTAGCCAGT
 TGGCGGGGTAAACGGCCACCAAGCGACGATCGGTAGCCGGACTGAGAGG
 TTGAACGGCC
 10 ACATTGGGACTGAGACACGGCCAG

OTU339 (SEQ ID NO.: 120)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATTA
 AAATGAAATT
 TTCGGATGGATTTTGGATTGACTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
 ATAACCTGC
 CTCACACTGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGC
 ACAGTACCGC
 ATGGTACGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGATCCGCGTCTGATT
 AGCCAGTTG
 CGGGGTAAACGGCCCCGACCAAGCGACGATCAGTAGCCGACCGTGAGAGGTG
 ACCGGCCAC
 ATTGGGACTGAGACACGGCCCA

OTU340 (SEQ ID NO.: 121)

GACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTGTGT
 TGAAAGCTTG
 CTGGATATACAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTG
 CCTCTCAGAG
 TGAATAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCATAACGTGAGAAGAGG
 GCATCCTCTT
 TTTACCAAAGATTTATCGCTGAGAGATGGGCTCGCGGCCGATTAGGTAGTT
 GGTGAGATA
 ACAGCCCACCAAGCCGACGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGATCGGCC
 ACATTGGGAC
 5 TGAGACACGGCCAG

OTU353 (SEQ ID NO.: 122)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACCTT
 GACGGATTCT
 TCGGATTGAAGCCTTGGTGAAGTGAAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGG
 GTAACCTGCC
 TCATACAGGGGGGATAAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGC
 GCACAGGACC
 GCATGGTCTGGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGA
 TTAGCTAGT
 TGGAGGGGTAAACGGCCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGAACGGCC

10 ACATTGGGACTGAGGACACGGCCCA

OTU359 (SEQ ID NO.: 42)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTATA
TCGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCAGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCTGCC
CTGTACCGGGGATAAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGCTTCAC
ATGAAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTG
ATTAGCCAGTT
GGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGGAGAG
GGTGAACGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCCG

OTU362 (SEQ ID NO.: 43)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGGTT
TCGATGAAGTT
TTCGGATGGATTTGAAATCGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGTAACCTGC
CTTACACTGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGCATAAGCGC
ACAGGGCCGC
ATGGTCCGGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTAAAGATGGACCCGCGTCTGATT
AGGTAGTTGG
TGGGTAACGGCCCAACCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACAT
5 TGGGACTGAGACACGGCCCAA

OTU367 (SEQ ID NO.: 44)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTTACA
CAGAGGAAGTT
TTCGGATGGAATCGGTATAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG
GGAAACCCGCC
CTGTACCGGGGATAAACACTTAGAAATAGGTGCTAATACCGCATAAGCG
CACAGCTTCAC
ATGAAGCAGTGTGAAAACTCCGGTAGGTACAGGATGGTCCCGCGTCTGA
TTAGCCAGTTG
GCAGGGTAACGGCCTACCAAAGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TCAACGGCCAC
10 ATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

REIVINDICACIONES

1. Composición que induce proliferación y/o acumulación de células T reguladoras, consistiendo la composición en una combinación de 5-17 cepas bacterianas pertenecientes a 5-17 de las siguientes unidades taxonómicas operativas (OTU):

5

OTU	SEQ ID NO	ESPECIE MÁS CERCANA
136	19	<i>Clostridium saccharogumia</i> <i>Clostridium ramosum</i> JCM1298
46	20	<i>Clostridium ramosum</i>
221	21	<i>Flavonifractor plautii</i> <i>Pseudoflavonifractor capillosus</i> ATCC 29799
9	22	<i>Clostridium hathewayi</i> <i>Clostridium saccharolyticum</i> WM1
21	24	<i>Blautia coccoides</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA</i>
166	25	<i>Clostridium sp.</i> <i>Clostridium boltea</i> ATCC BAA-613
73	26	<i>Clostridium sp.</i> MLG055 <i>Erysipelotrichaceae bacterium 2_2_44A</i>
174	27	<i>Clostridium indolis</i> <i>Anaerostipes caccae</i> DSM 14662
337	30	<i>Anaerotruncus colihominis</i> <i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
314	31	<i>Ruminococcus sp.</i> ID8 <i>Lachnospiraceae bacterium 2_1_46FAA</i>
195	32	<i>Clostridium lavalense</i> <i>Clostridium asparagiforme</i> DSM 15981
306	33	<i>Clostridium symbiosum</i> <i>Clostridium symbiosum</i> WAL-14163
87	34	<i>Eubacterium contortum</i> <i>Clostridium sp.</i> D5
281	39	<i>Clostridium scindens</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 5_1_57FAA</i>
288	40	<i>Lachnospiraceae bacterium A4</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1</i>
334	41	<i>Clostridium sp.</i> 316002/08 <i>Clostridiales bacterium 1_7_47FAA</i>
359	42	<i>Lachnospiraceae bacterium A4</i> <i>Lachnospiraceae bacterium 3_1_57FAA_CT1.</i>

2. Composición según la reivindicación 1, en la que: (a) las células T reguladoras son células T reguladoras positivas para factor de transcripción Foxp3, células T reguladoras productoras de IL-10, o células T reguladoras negativas para Helios y positivas para Foxp3; y/o (b) la composición tiene un efecto inmunosupresor.

10

3. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una sustancia seleccionada del grupo que consiste en cáscara de almendra, inulina, oligofructosa, rafinosa, lactulosa, pectina, hemicelulosa, amilopectina, acetil-CoA, biotina, melaza de remolacha, extractos de levadura, almidón resistente, corticoesteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistamínicos, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromoglicato disódico, antileucotrienos, fármacos

15

anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas, inhibidores anti-TNF, y combinaciones de los mismos.

- 5 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición consiste en una combinación de 10-17 cepas bacterianas.
- 5 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición consiste en una combinación de 15-17 cepas bacterianas.
- 10 6. Composición farmacéutica que comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un portador farmacológicamente aceptable.
- 15 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el portador farmacológicamente aceptable se selecciona de uno o más de los siguientes: agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, disolvente, un material de base, un emulsionante, un agente de suspensión, un tensioactivo, un estabilizador, un agente aromatizante, un compuesto aromático, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, un diluyente, un agente de ajuste de la tonicidad, un agente calmante, un agente de relleno, un agente disgregante, un agente tampón, un agente de recubrimiento, un lubricante, un colorante, un edulcorante, un agente espesante, un corrector de aroma y un solubilizador.
- 20 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en terapia o profilaxis.
- 25 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en un método de inducción de proliferación, acumulación, o tanto proliferación como acumulación de células T reguladoras en un individuo que lo necesita.
- 30 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en un método de tratamiento, apoyo en el tratamiento, reducción de la gravedad, o prevención de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo que lo necesita.
- 35 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en un método de tratamiento, apoyo en el tratamiento, reducción de la gravedad, o prevención de una enfermedad inflamatoria en un individuo que lo necesita.
- 40 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en un método de tratamiento, apoyo en el tratamiento, reducción de la gravedad, o prevención de una enfermedad alérgica en un individuo que lo necesita.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en un método de tratamiento, apoyo en el tratamiento, reducción de la gravedad, o prevención de una enfermedad infecciosa en un individuo que lo necesita.

[Fig. 1A·B]

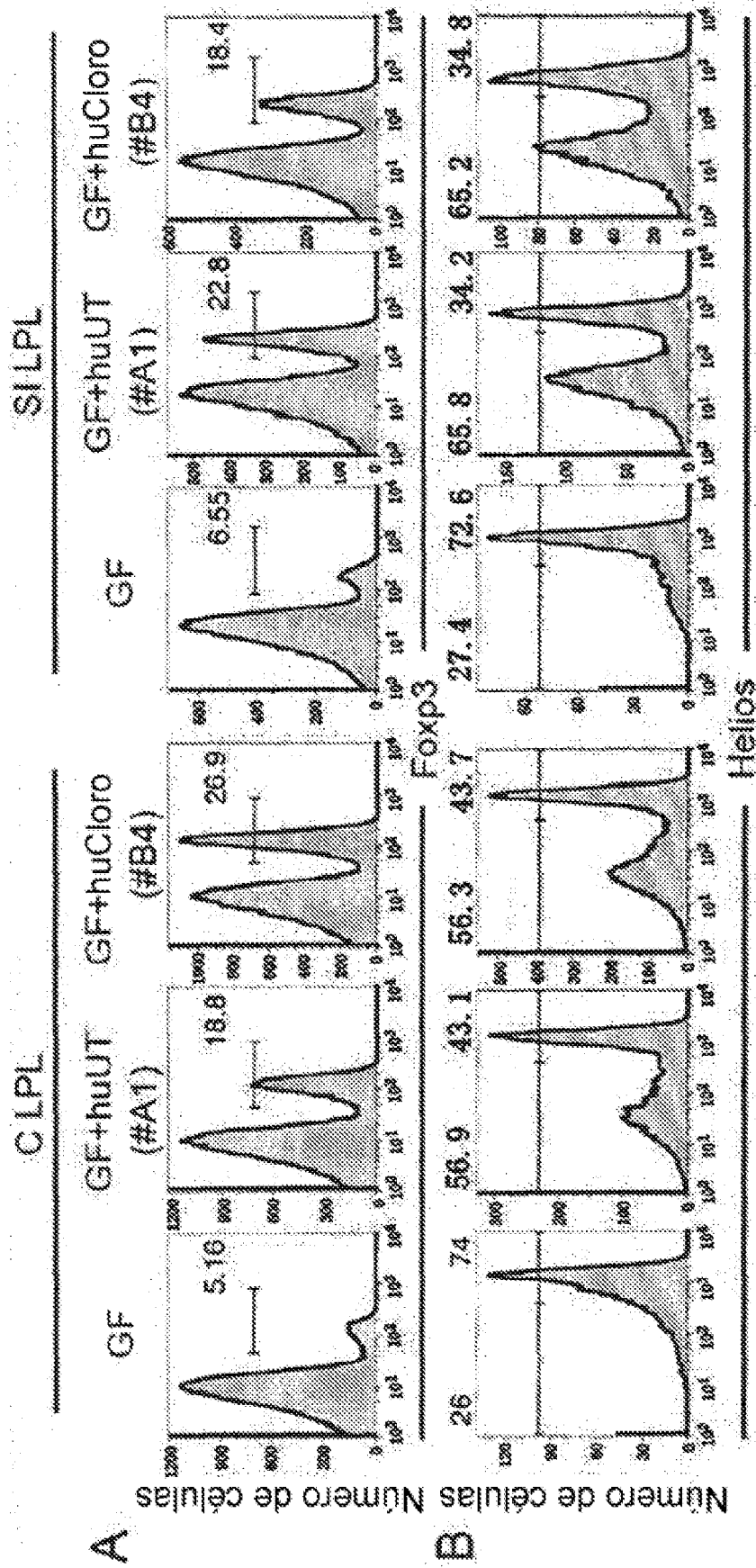


Figura 1 A B

[Fig. 1C-D]

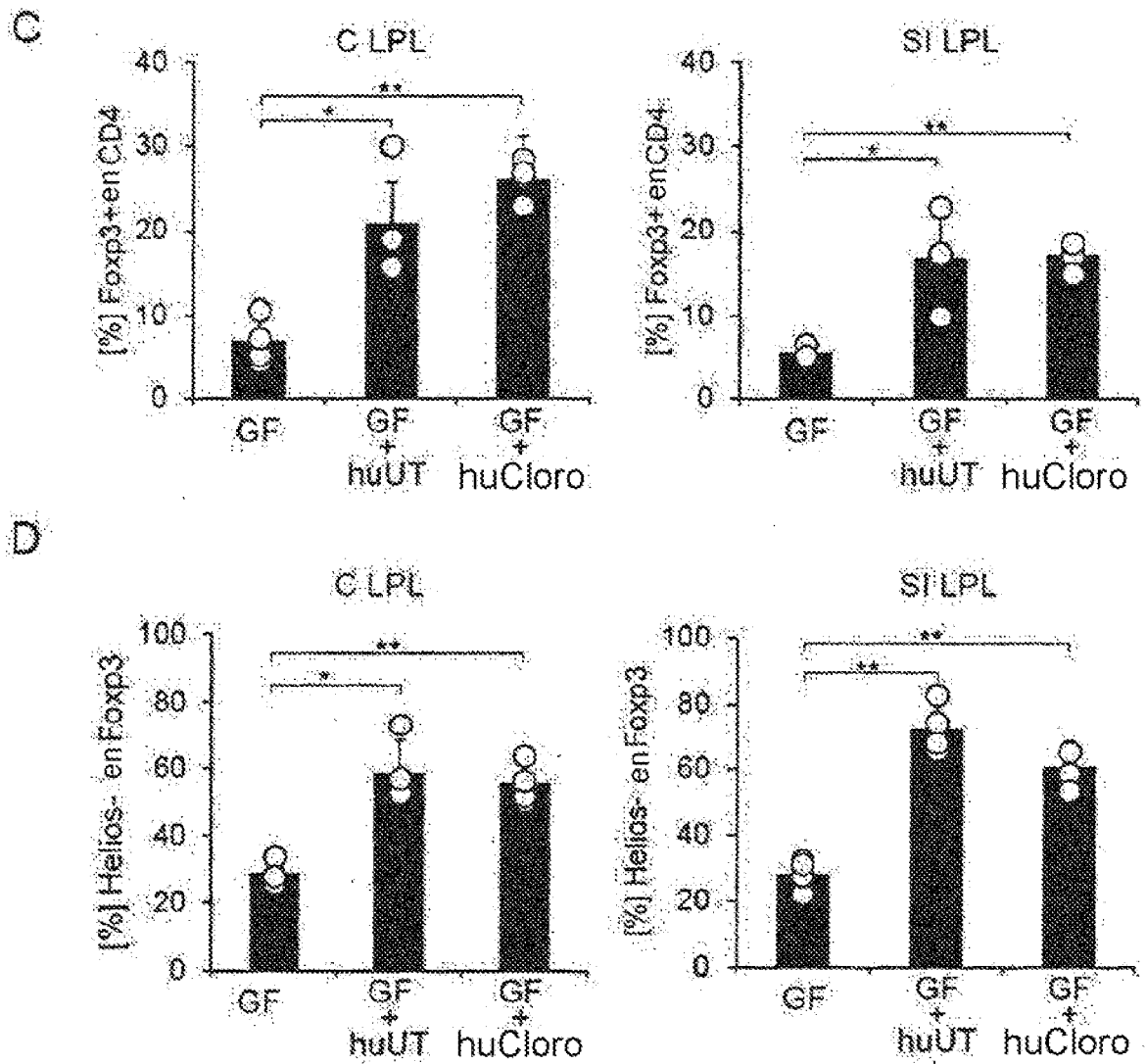


Figura 1 C D

[Fig. 1E]

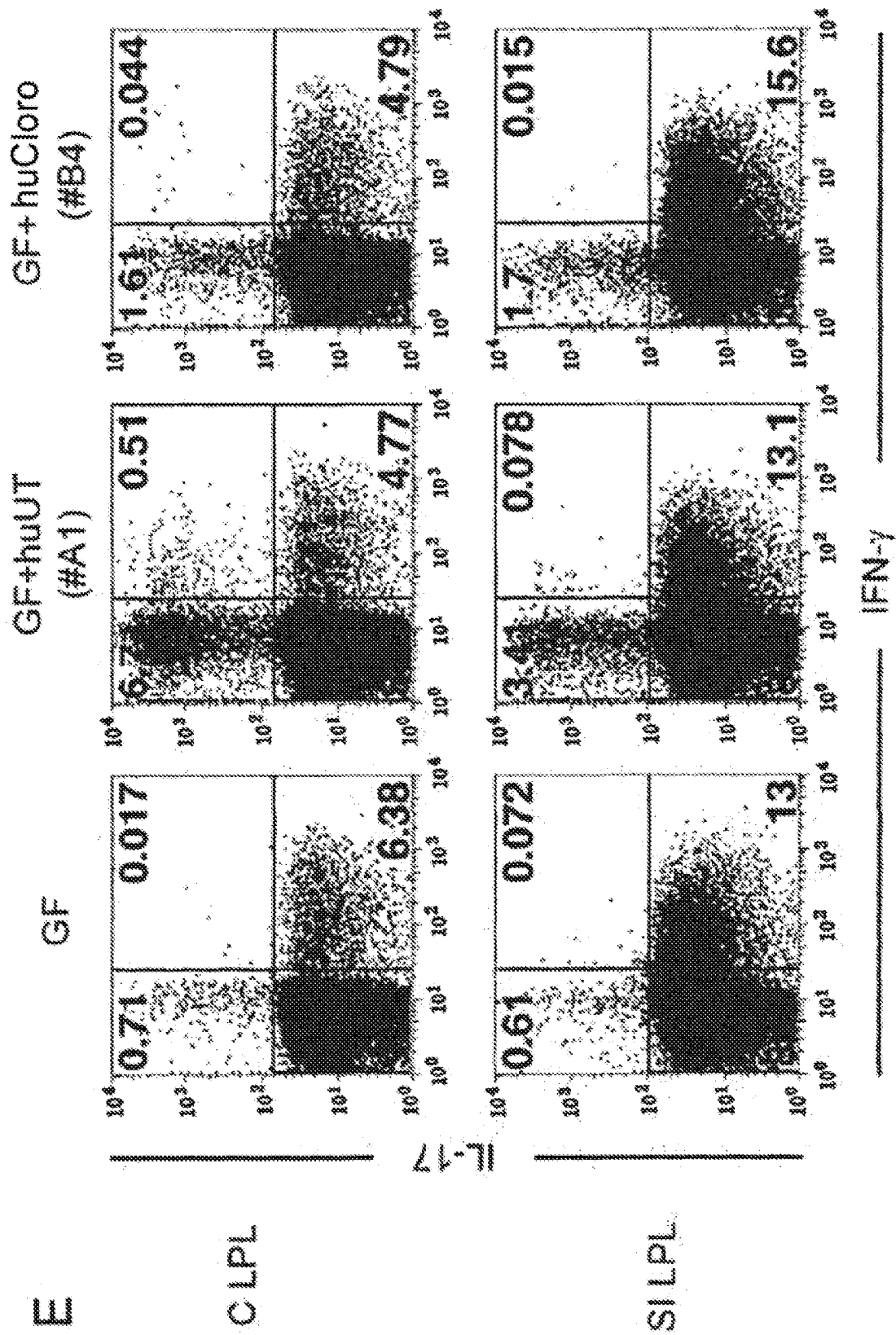


Figura 1 E

[Fig. 1F-G]

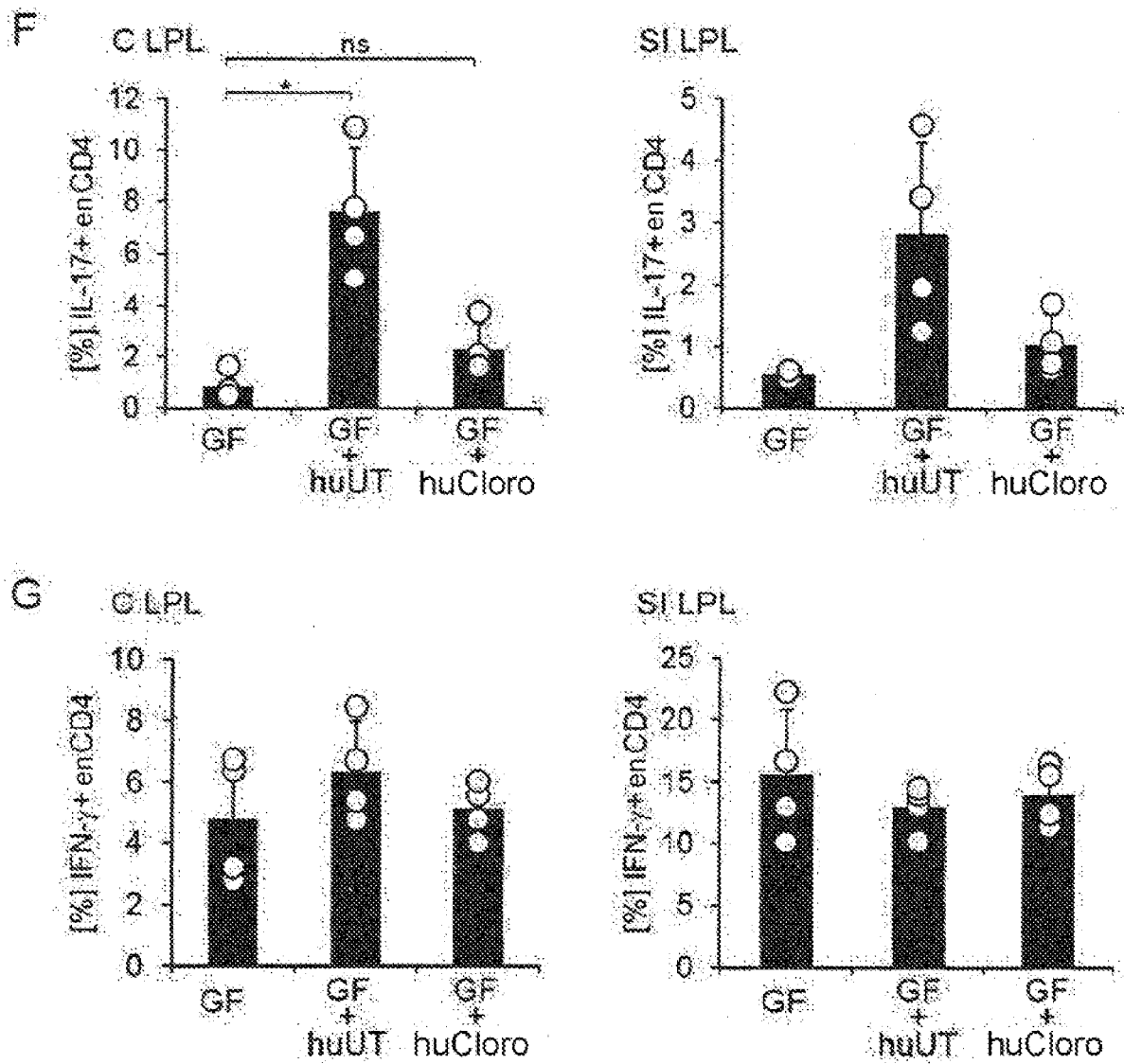
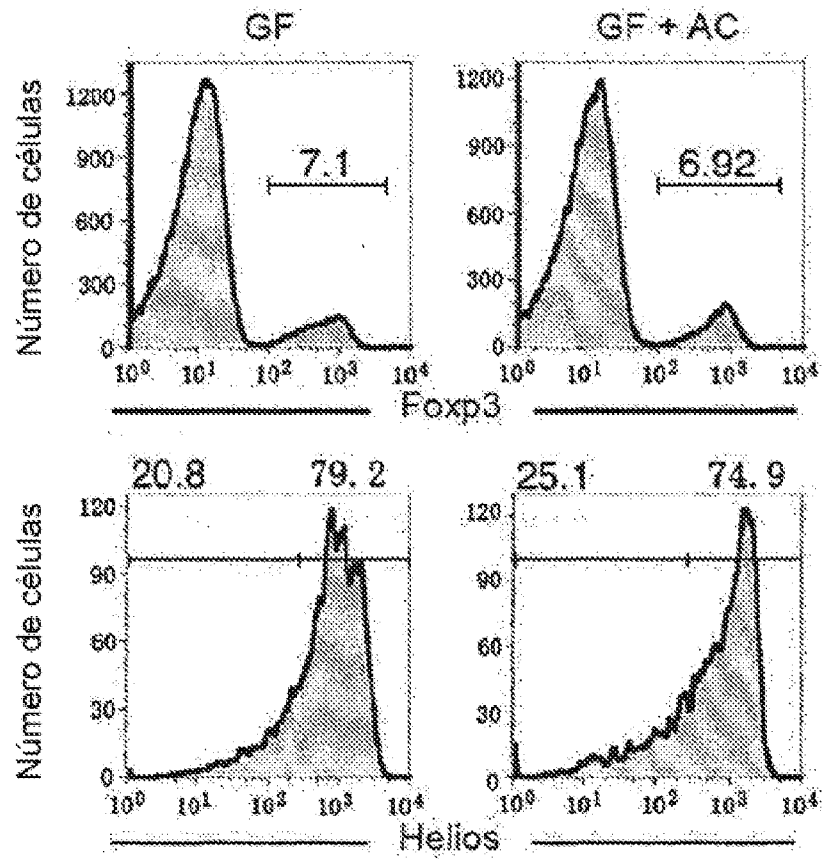


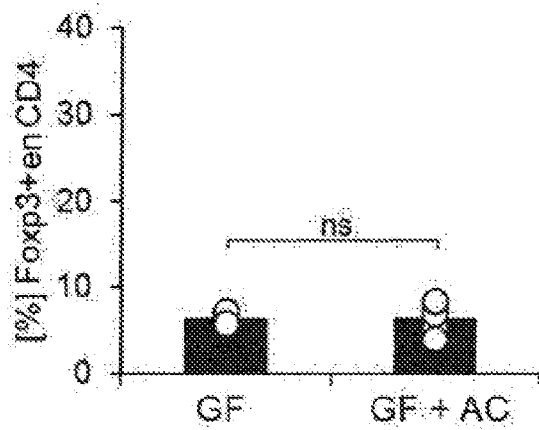
Figura 1 F G

[Fig. 2]

A



B



C

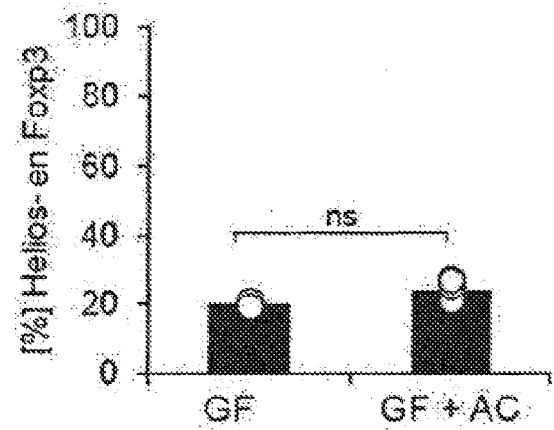
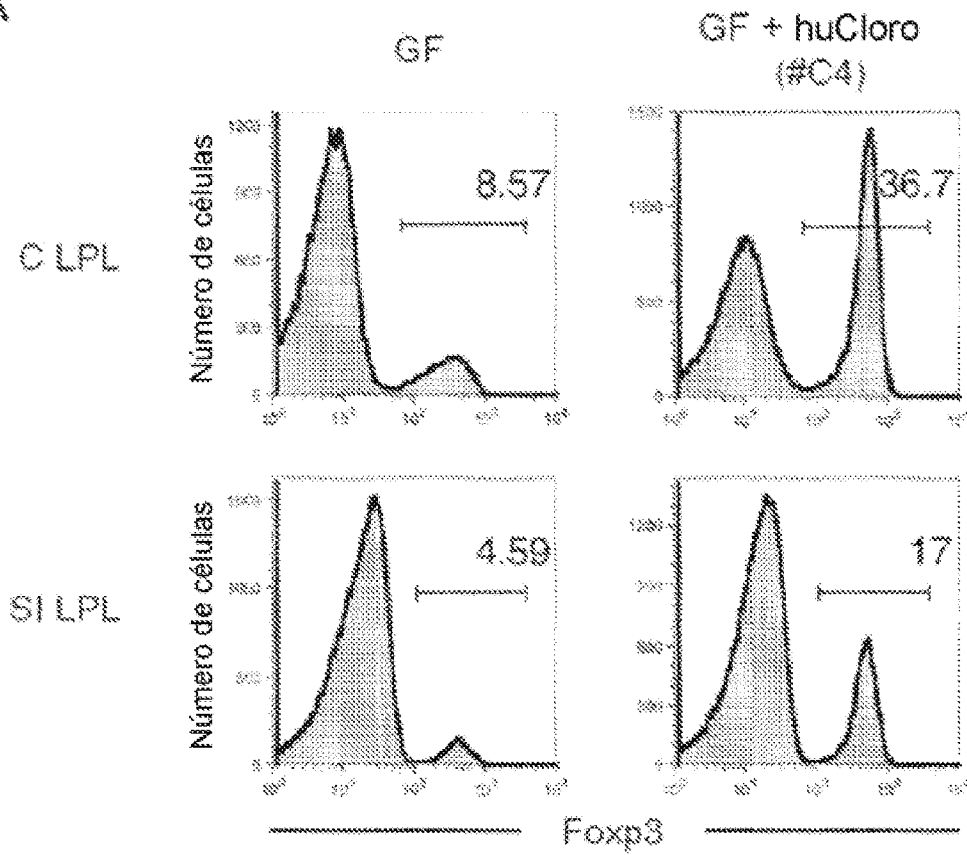


Figura 2

[Fig. 3]

A



B

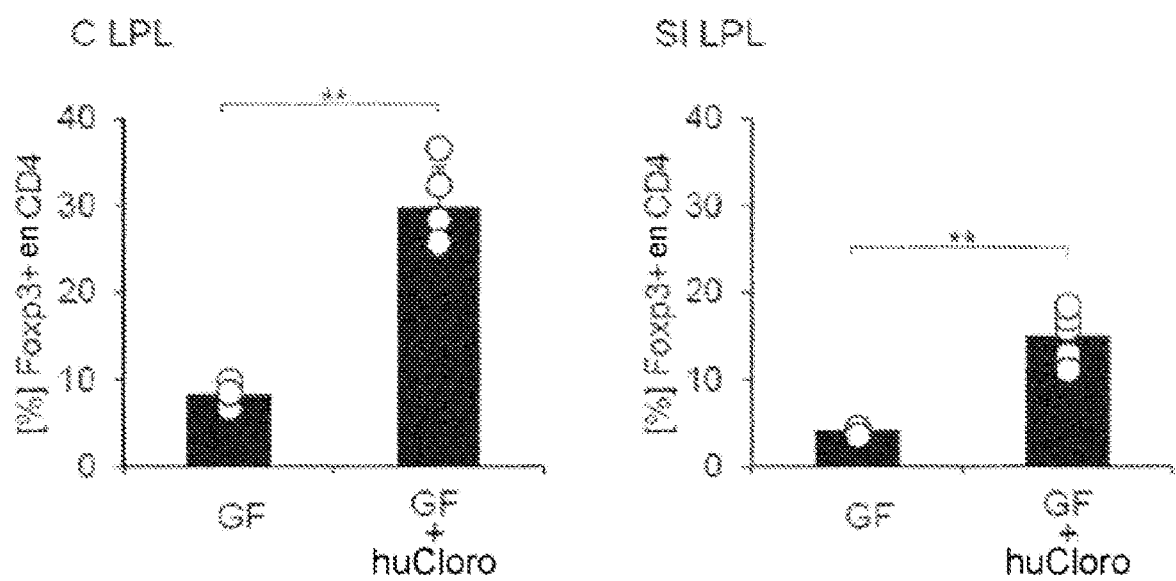


Figura 3

[Fig. 4]

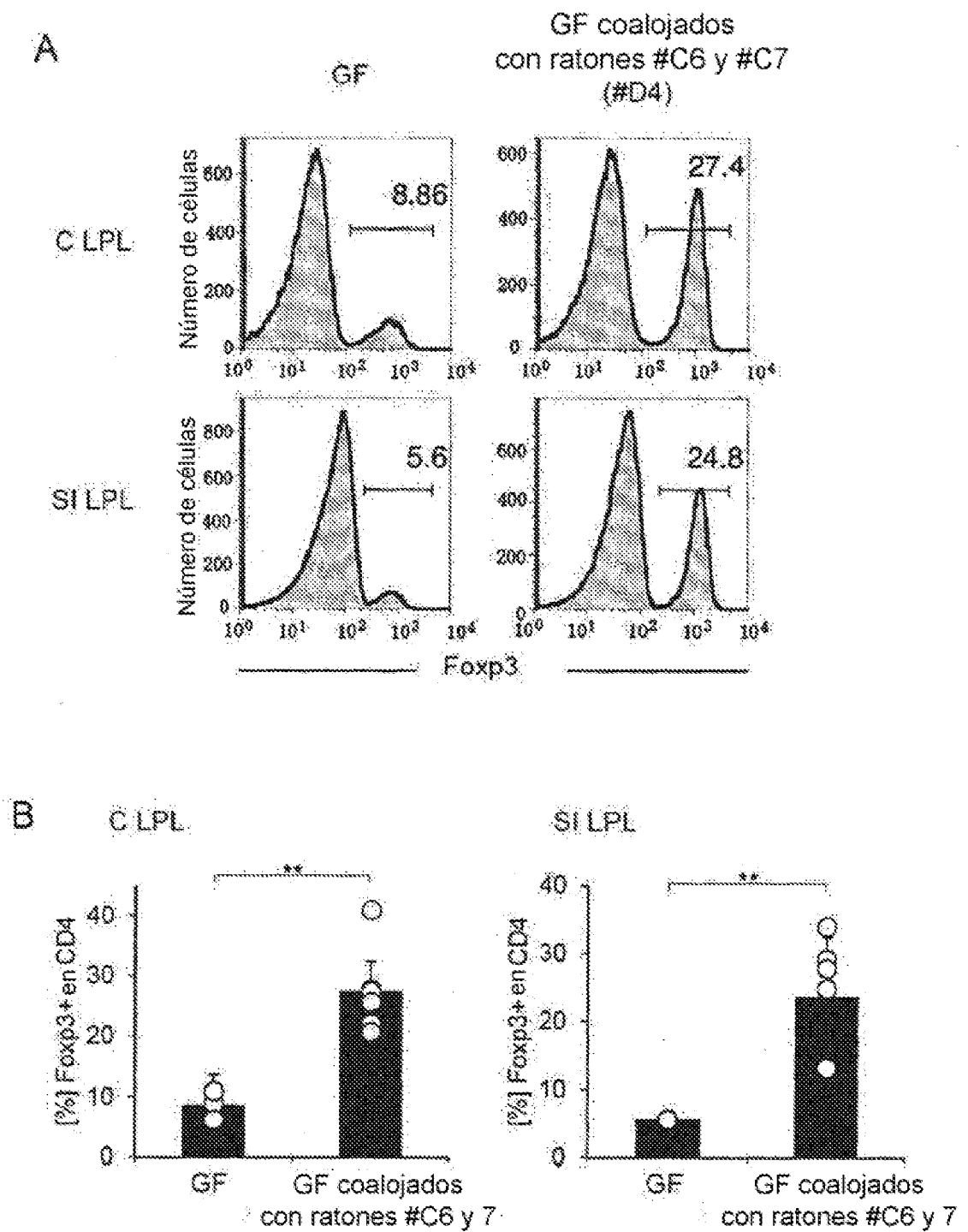
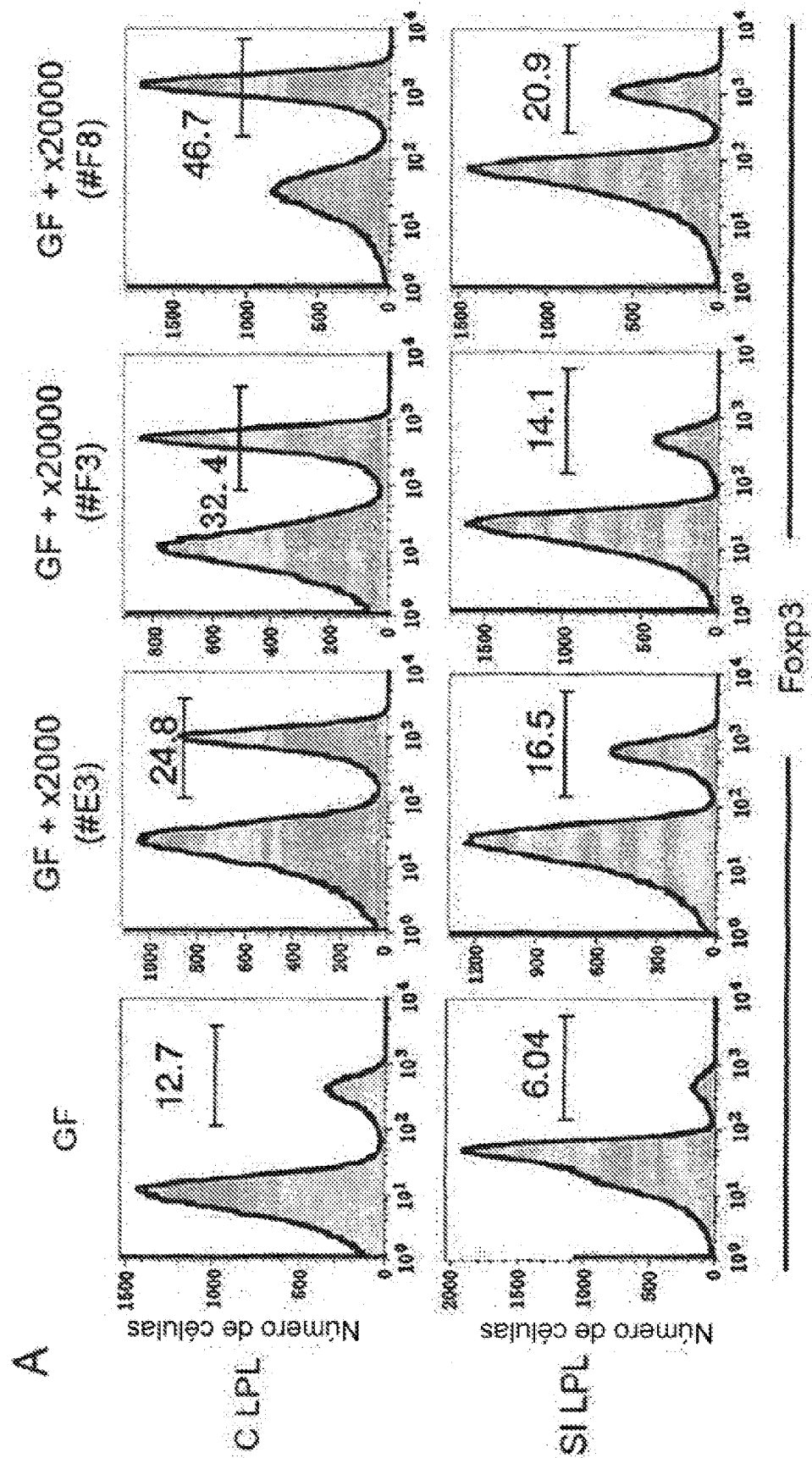


Figura 4

[Fig. 5]



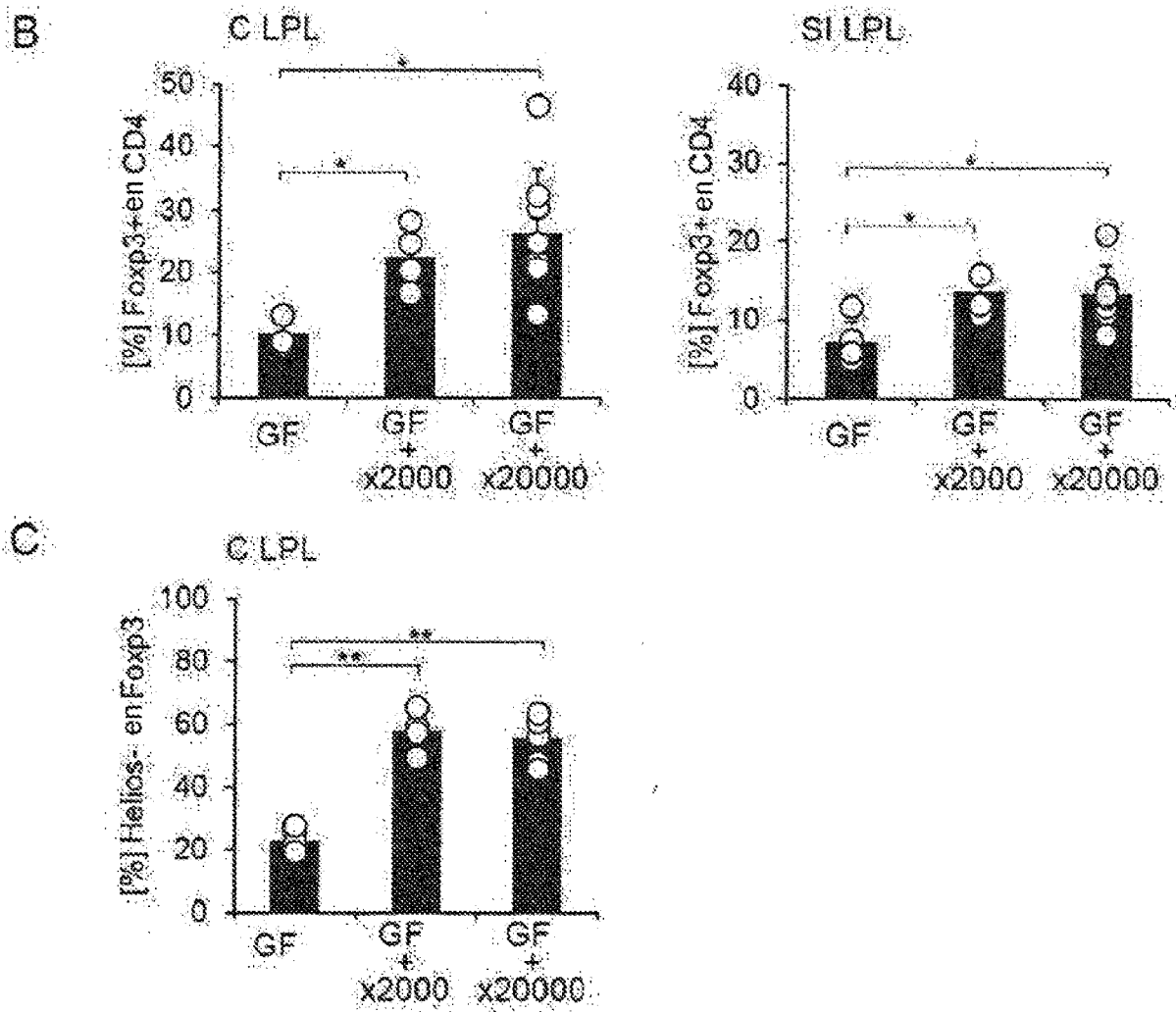
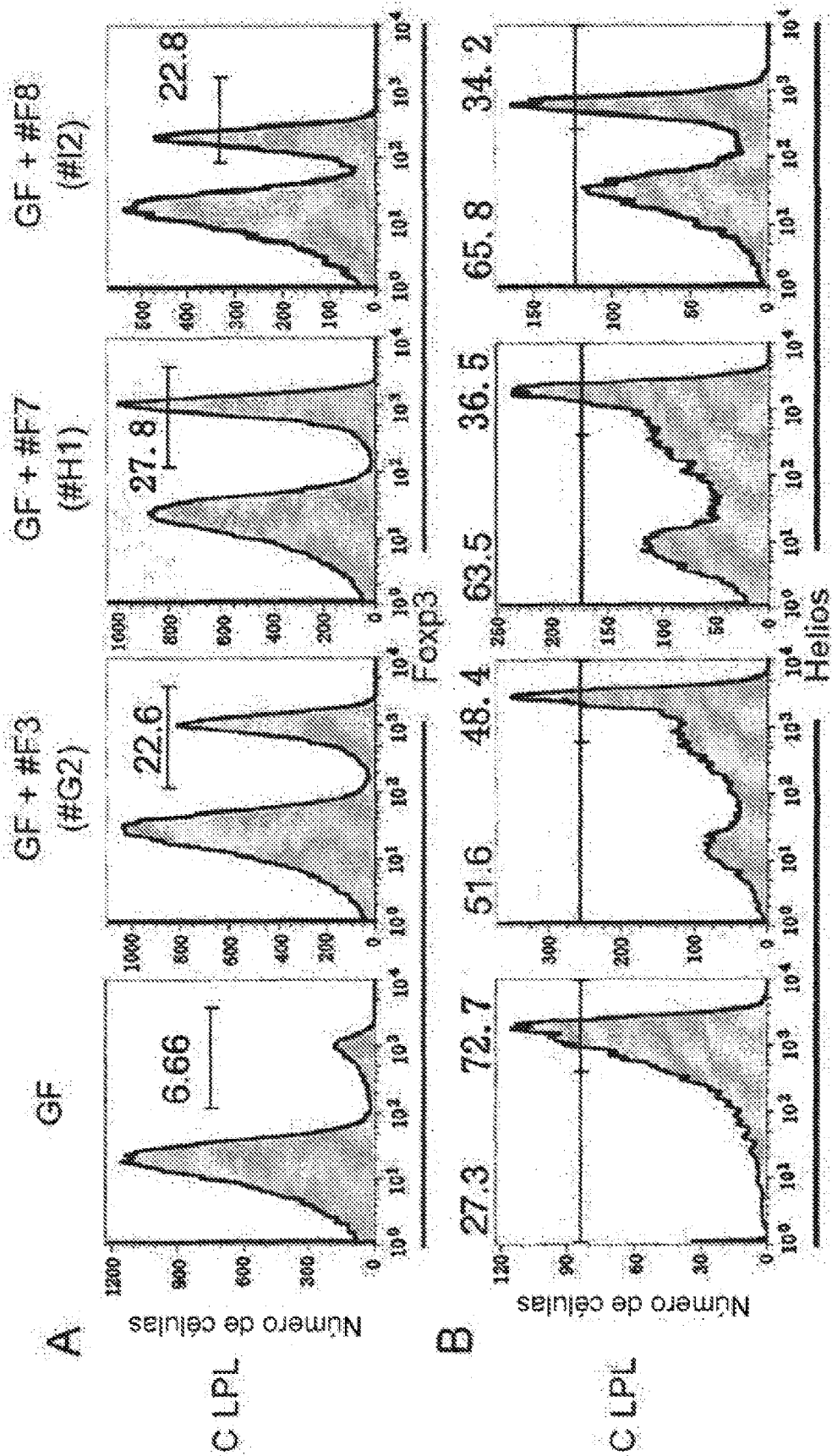


Figura 5

[Fig. 6]



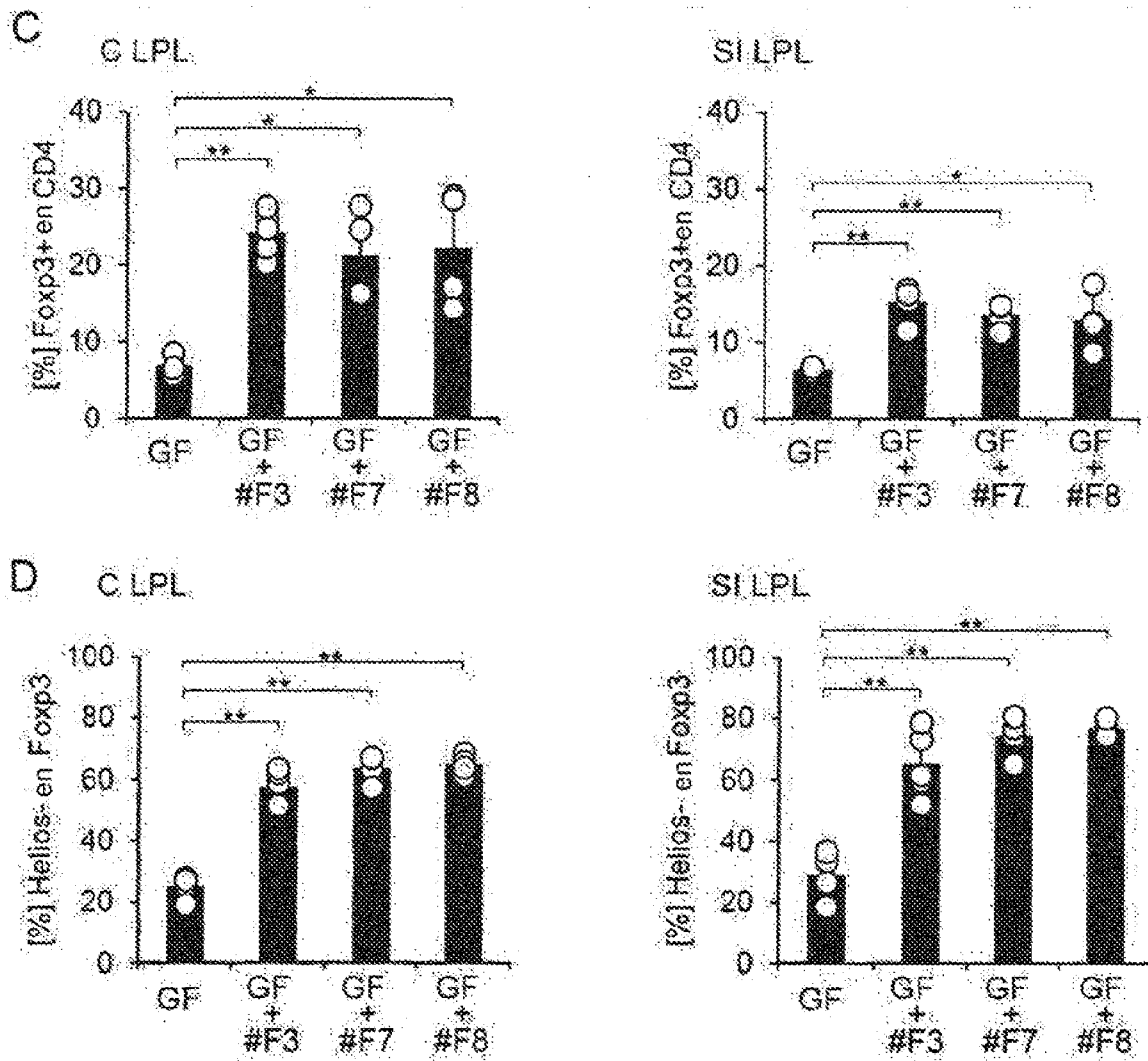


Figura 6

[Fig. 7]

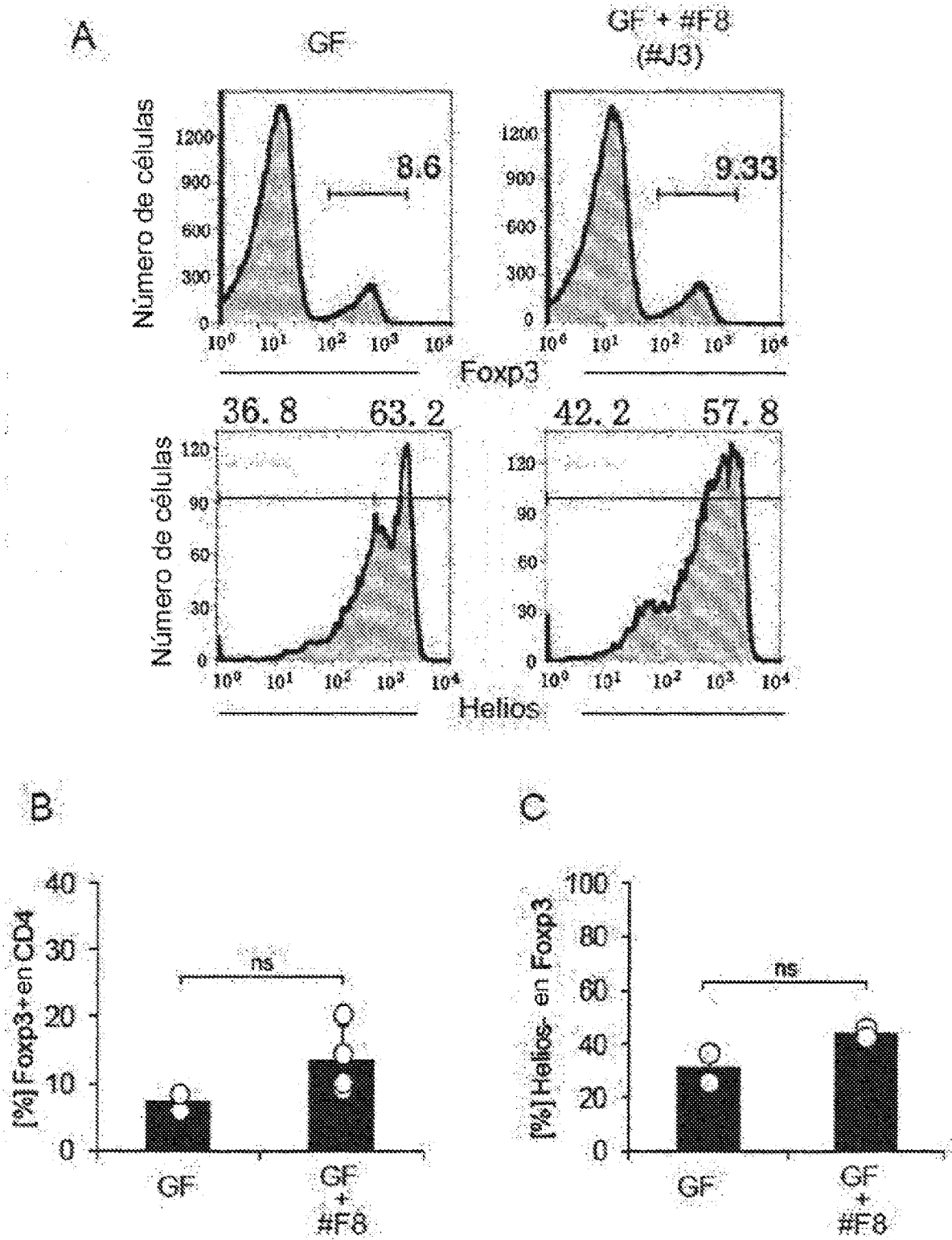


Figura 7

[Fig. 8]

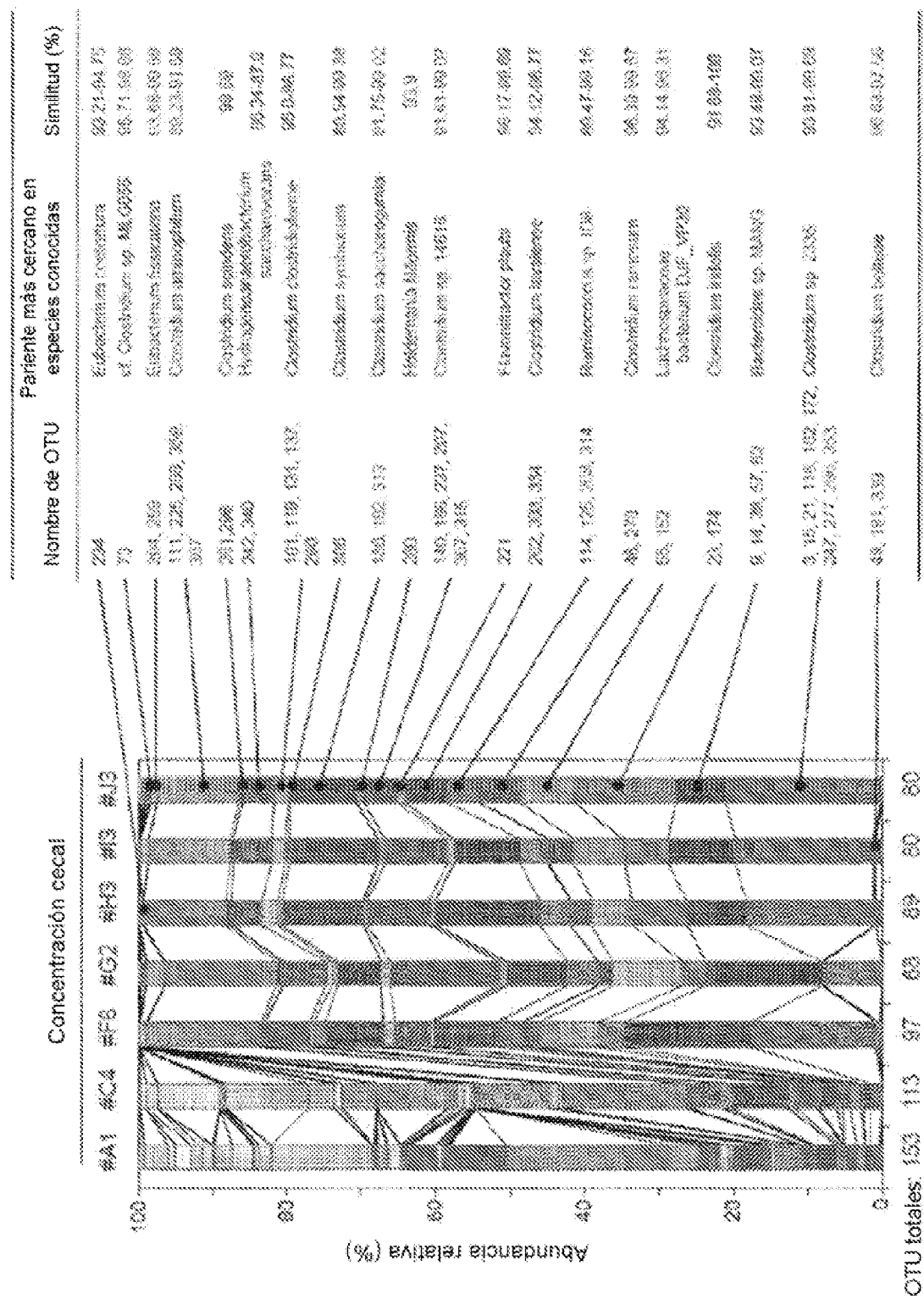


Figura 8

[Fig. 9]

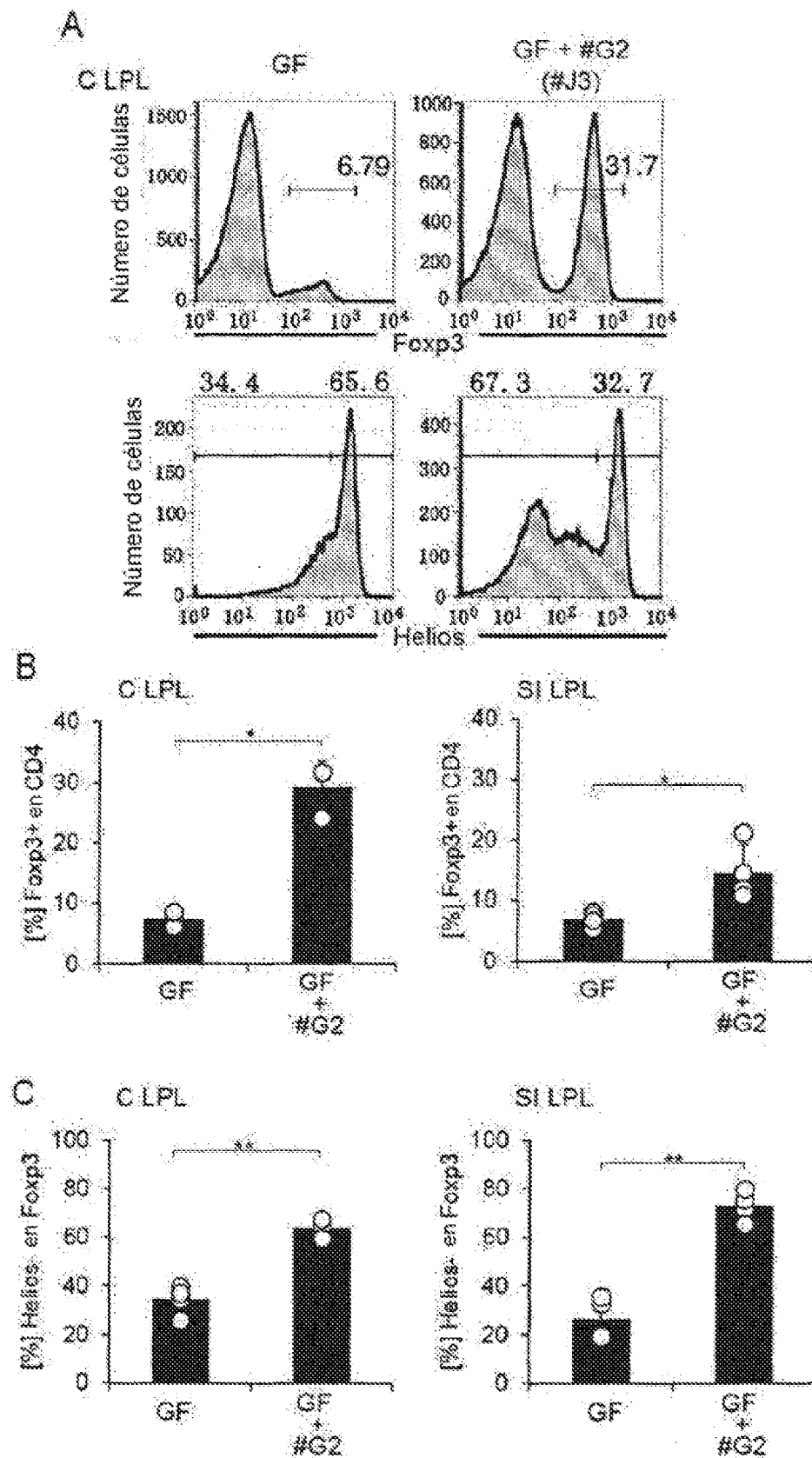


Figura 9

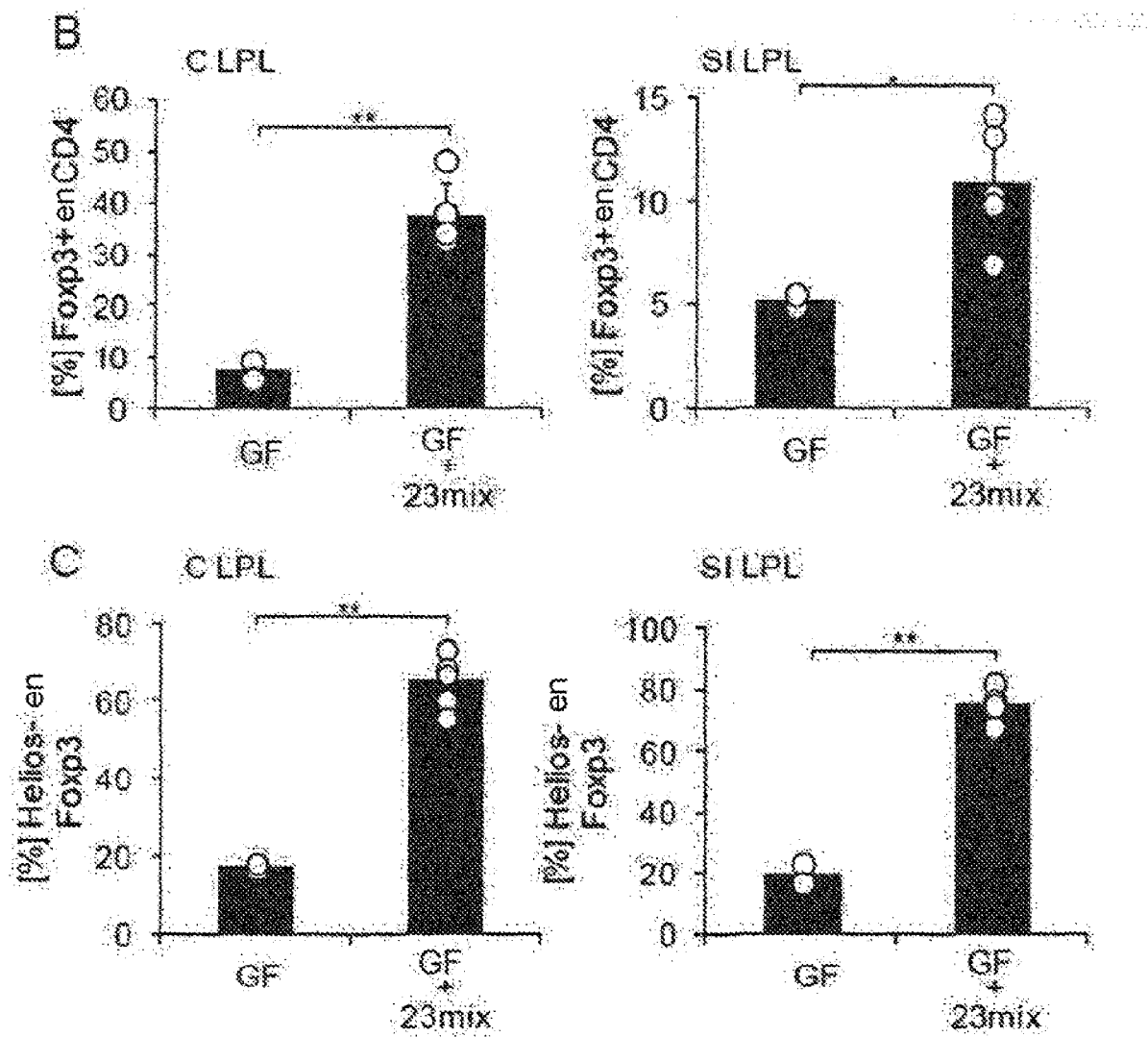


Figura 10

[Fig. 11]

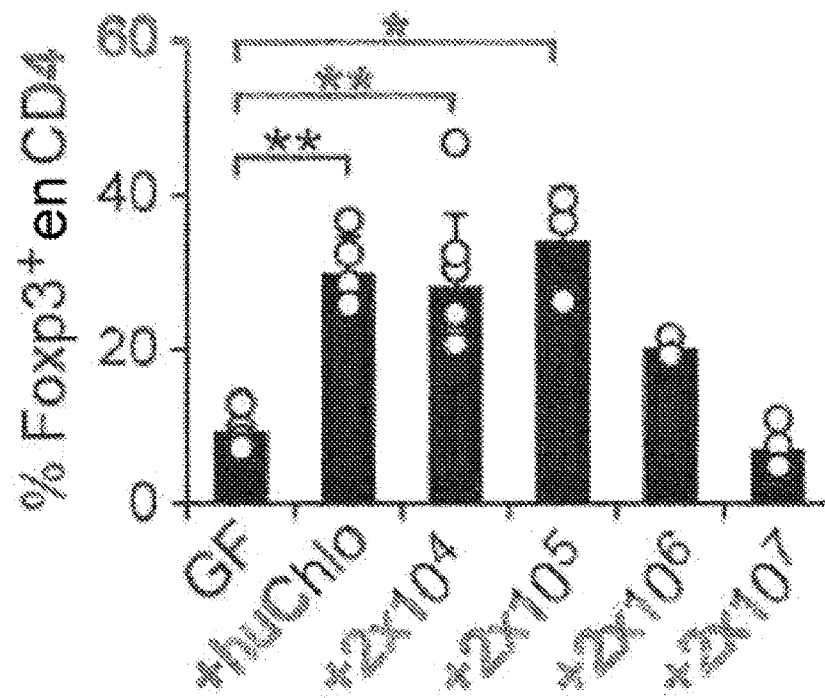


Figura 11

[Fig. 12]

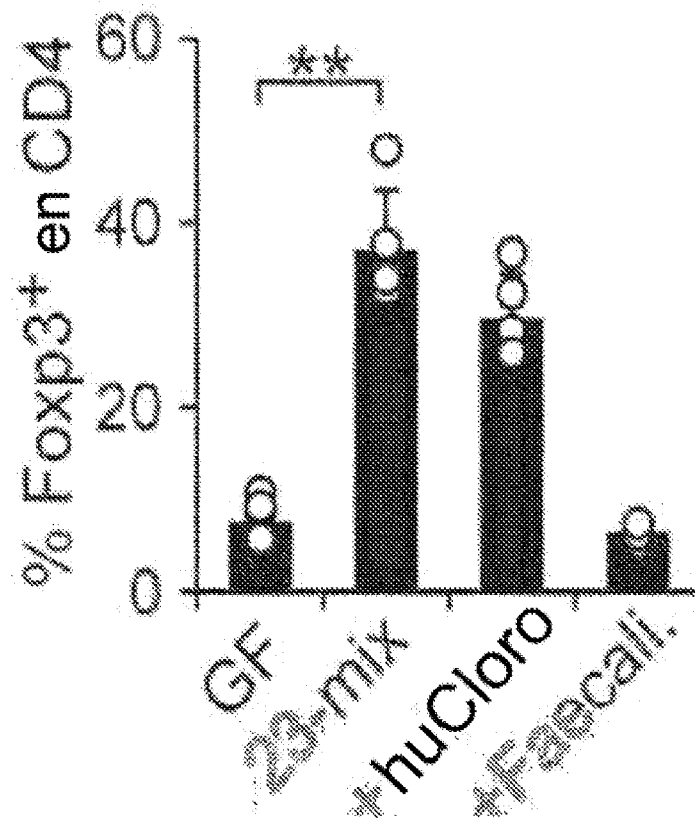


Figura 12

[Fig. 13]

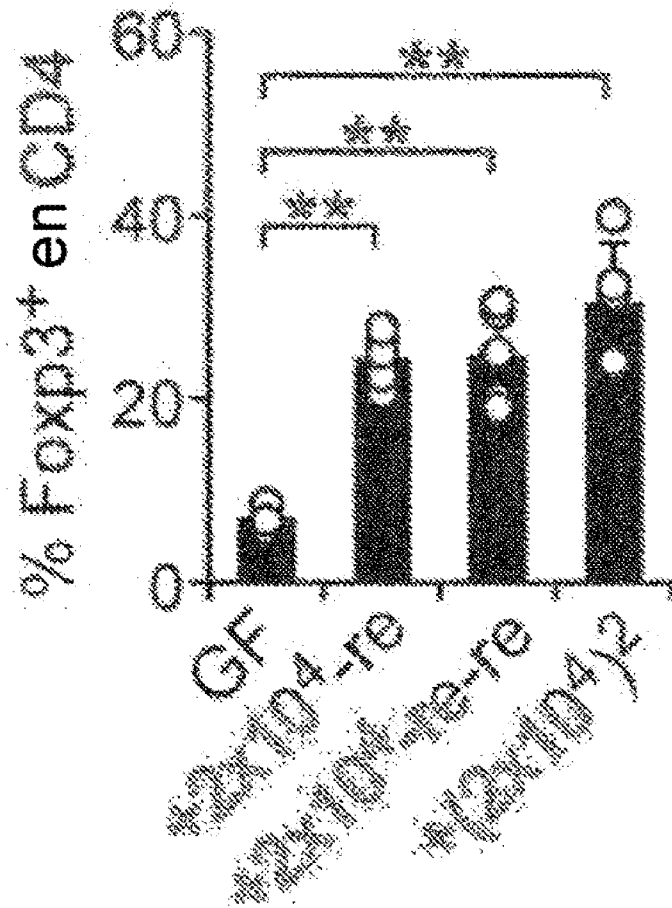


Figura 13

[Fig. 14]

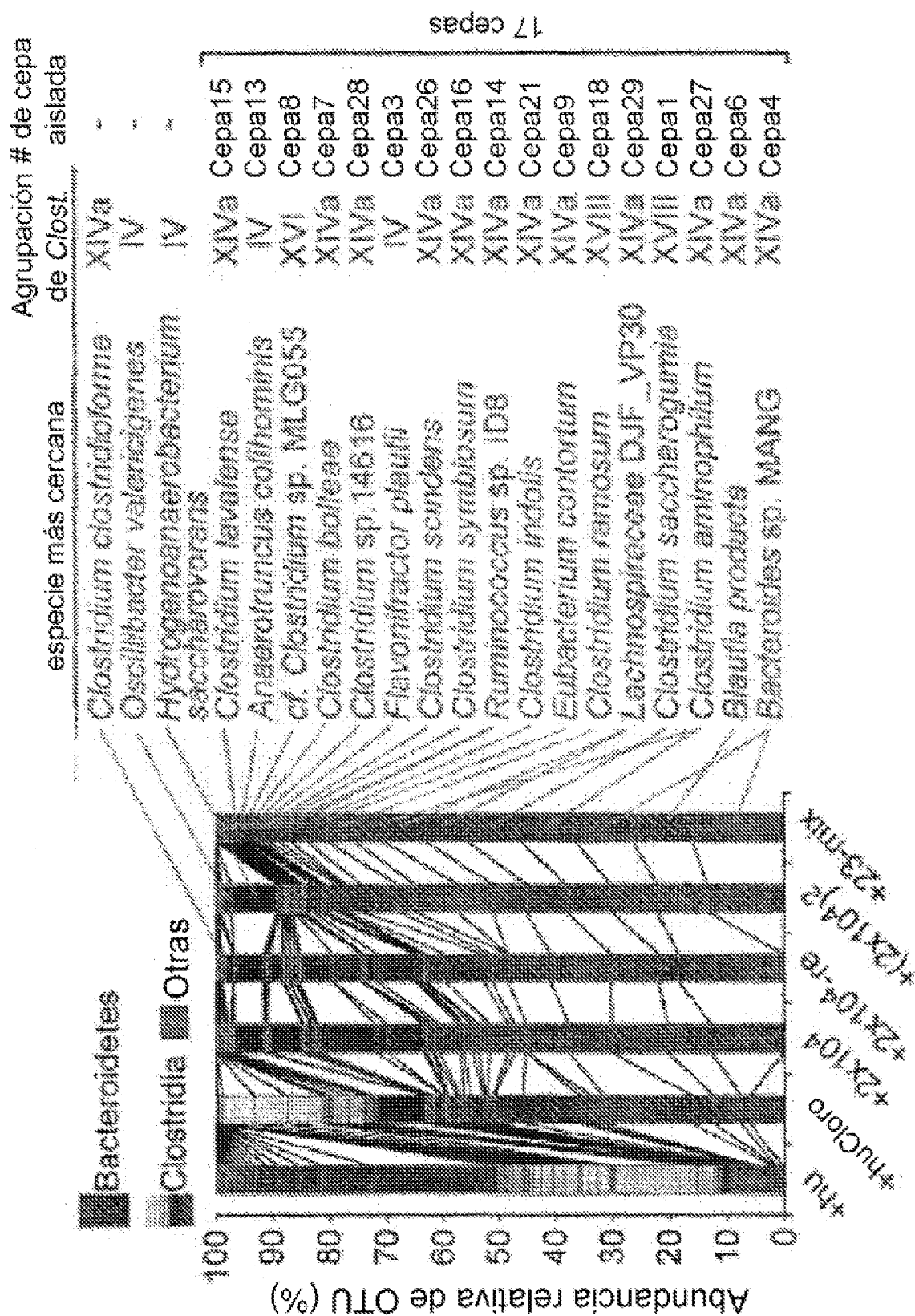


Figura 14

[Fig. 15]

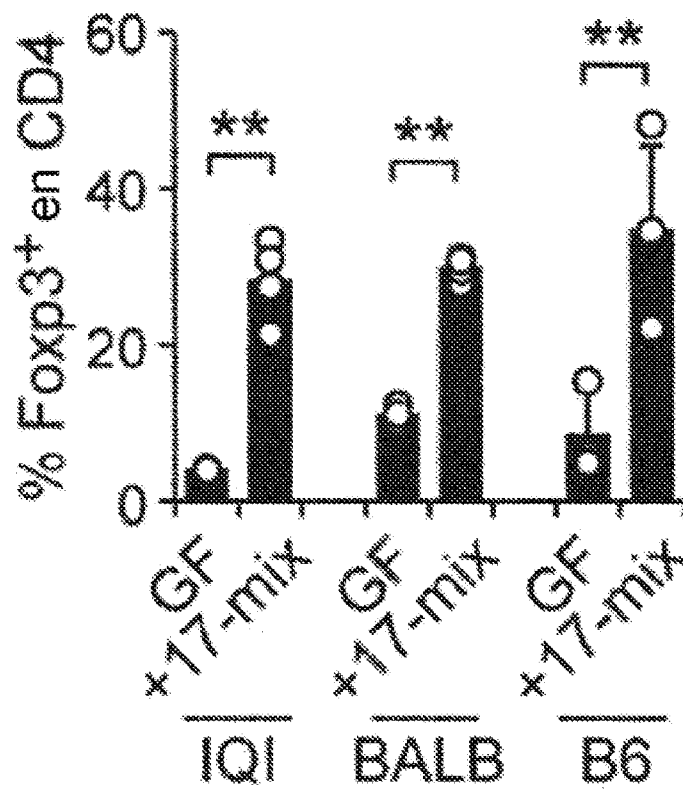


Figura 15

[Fig. 16]

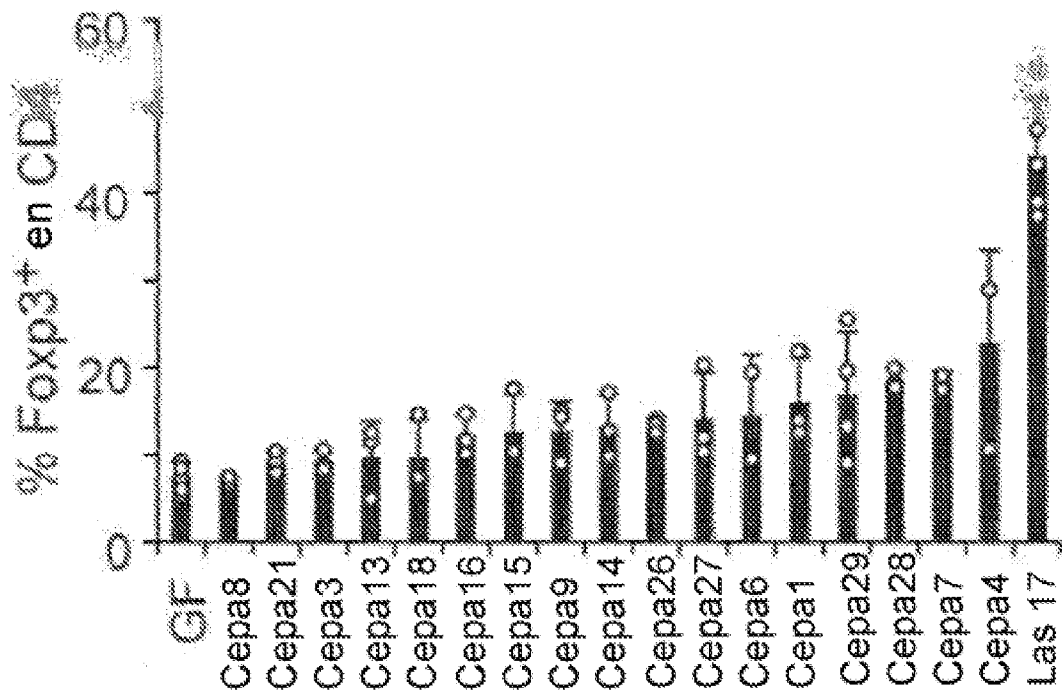


Figura 16

[Fig. 17]

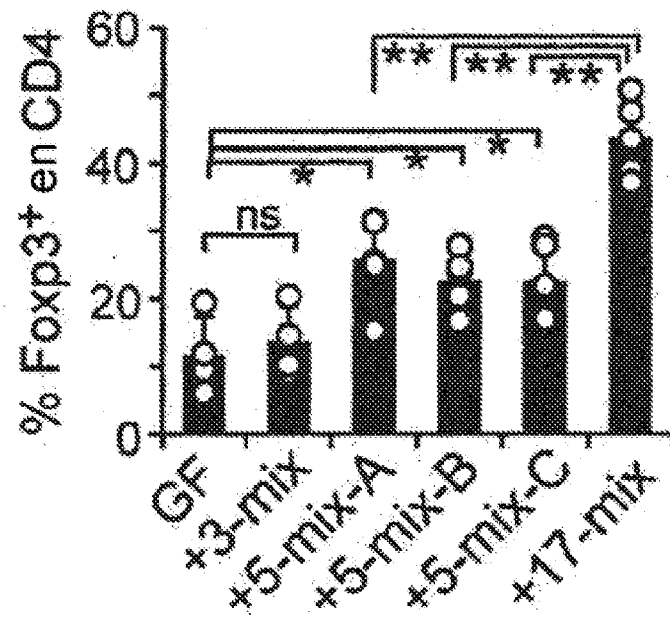


Figura 17

[Fig. 18]

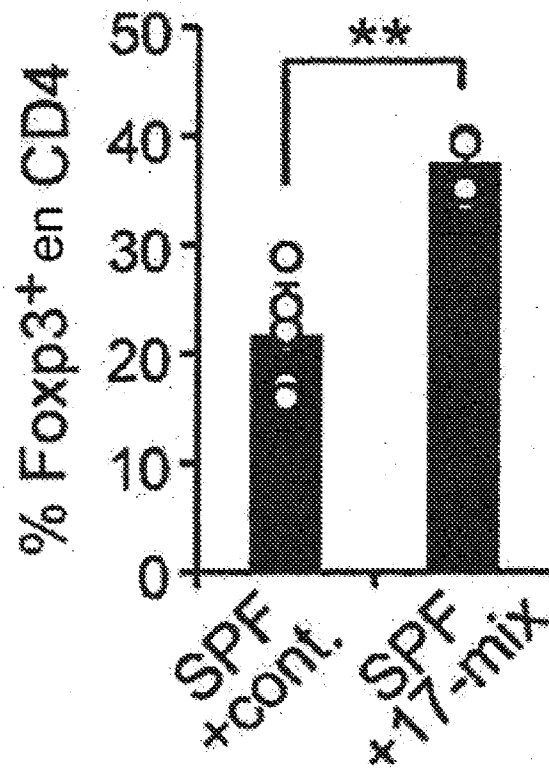


Figura 18

[Fig. 19]

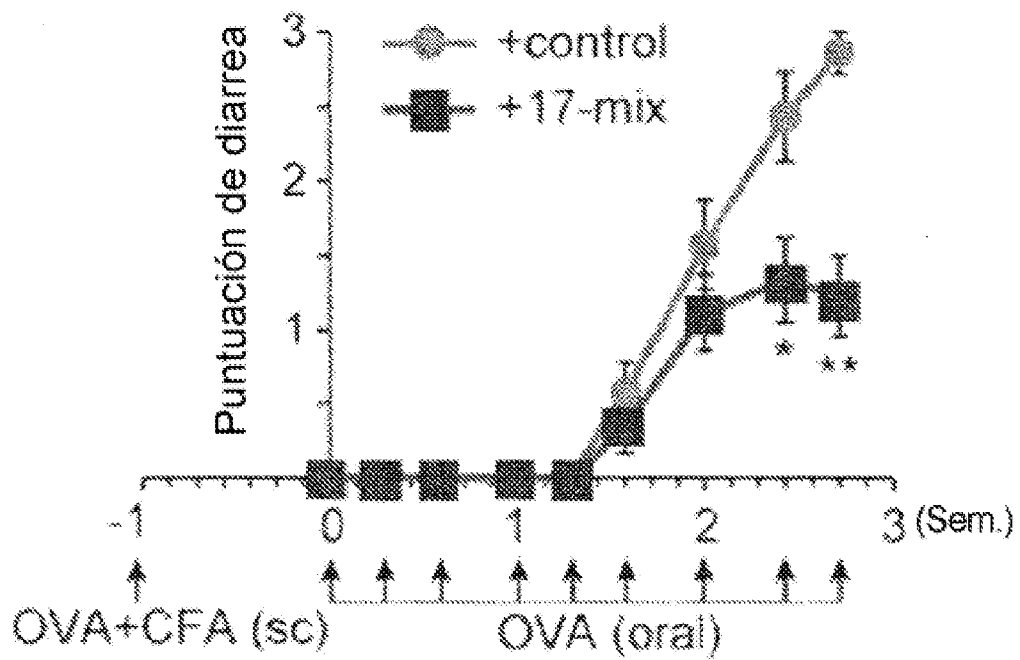


Figura 19

[Fig. 20]

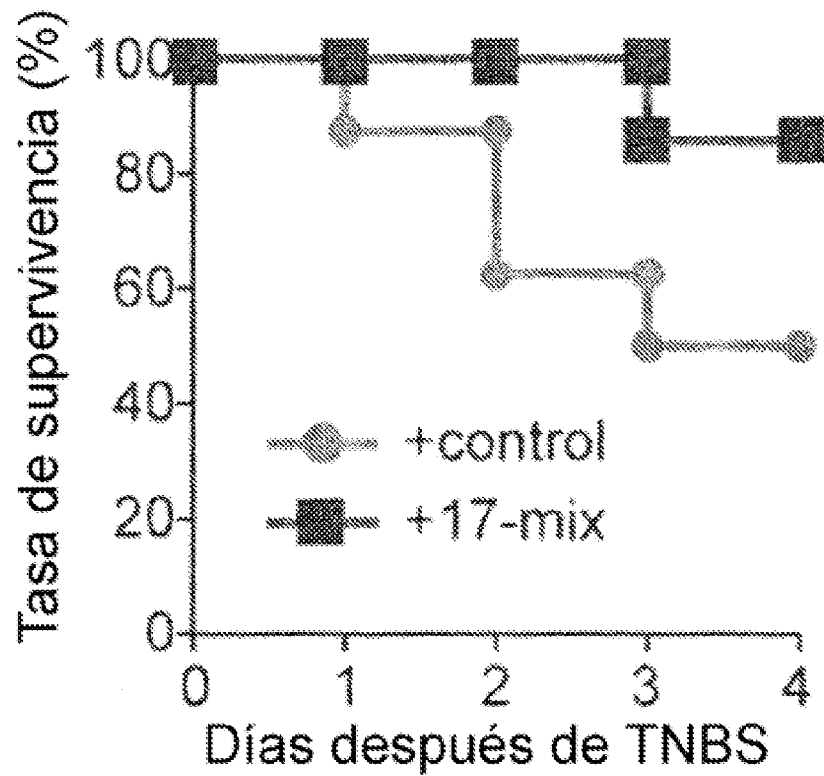


Figura 20

[Fig. 21]

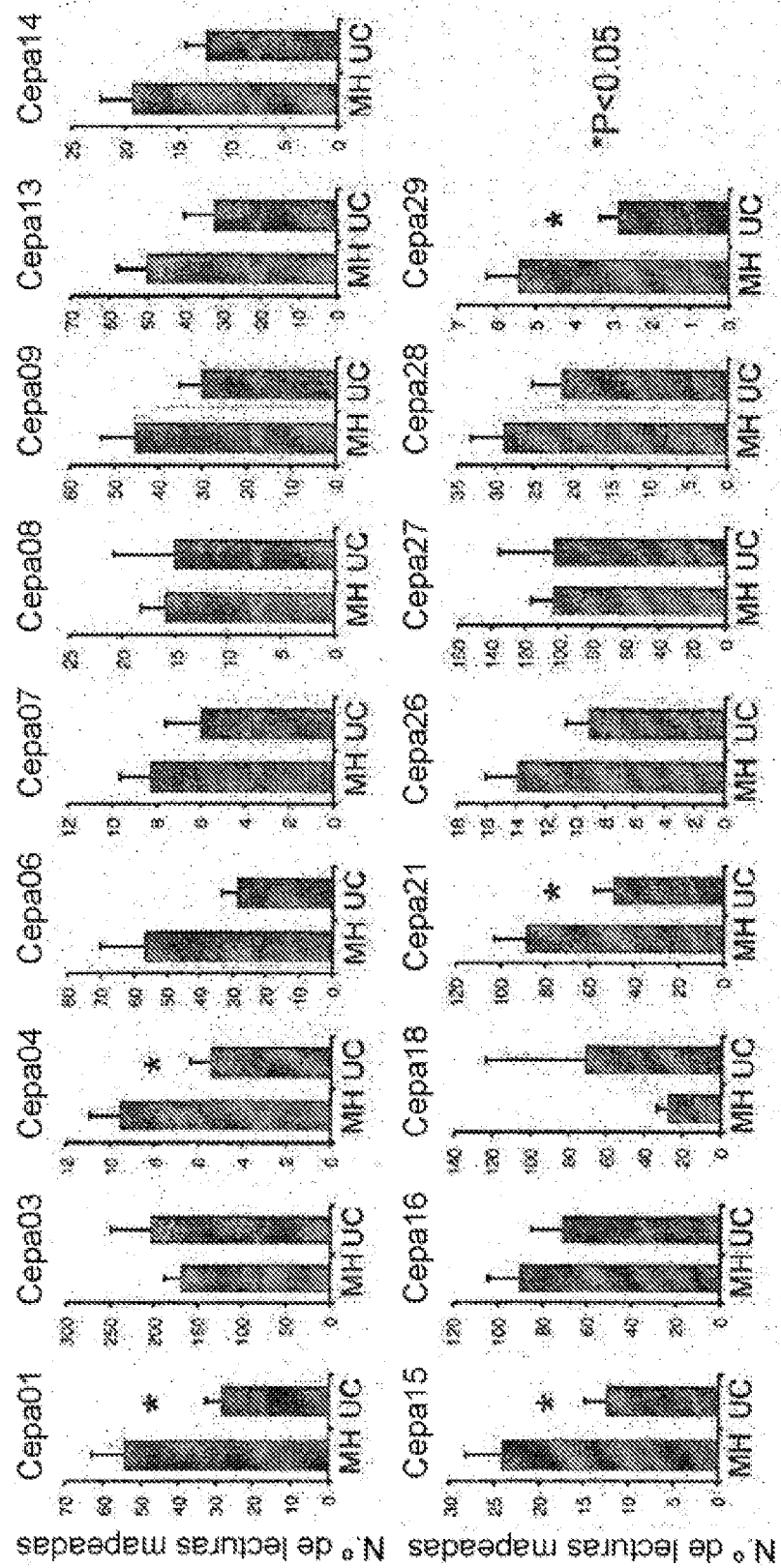


Figura 21