

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 943 714**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61K 8/99 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2016 PCT/US2016/050269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17041039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2016 E 16843142 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2023 EP 3344072**

54 Título: **Métodos para detectar riesgo de recidiva de cáncer usando *Eubacterium limosum***

30 Prioridad:

04.09.2015 US 201562214604 P

09.12.2015 US 201562265327 P

22.02.2016 US 201662298258 P

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

15.06.2023

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BRINK, MARCEL;
JENQ, ROBERT y
U. PELED, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 943 714 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

Métodos para detectar riesgo de recidiva de cáncer usando *Eubacterium limosum*

1. Introducción

La presente invención se refiere a métodos para diagnosticar que un sujeto tiene un riesgo mayor o reducido de recidiva de cáncer.

2. Antecedentes de la invención

El tracto gastrointestinal de los mamíferos está densamente colonizado por cientos de especies microbianas que coexisten simbióticamente con sus huéspedes. Los microbios, denominados colectivamente microbiota, contribuyen a numerosos aspectos de la salud del huésped, incluyendo el metabolismo de nutrientes, la homeostasis de tejidos intestinales, el desarrollo de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, y más generalmente, la defensa contra la infección intestinal. Las bacterias antagonizan los patógenos intestinales directamente, a través de inhibición dependiente de contacto y mediada por factores solubles, así como indirectamente modulando e induciendo respuestas inmunitarias del huésped, pero las contribuciones de bacterias individuales a la resistencia a la colonización contra patógenos específicos no se entienden bien.

Se ha notificado que los cambios en la flora intestinal pueden afectar a la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y están asociados con la bacteriemia y la supervivencia global después del trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico (alo-HSCT). Las principales causas de mortalidad después del alo-HSCT son recidiva, EICH e infección. Identificar componentes de la flora intestinal que están asociados con la recidiva después del alo-HSCT permitiría la intervención terapéutica en poblaciones específicas de pacientes en riesgo de recidiva.

La publicación de patente n.º US2015093360A1 describe composiciones terapéuticas que contienen esporas bacterianas no patógenas competentes para la germinación, para la prevención, el control y el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones gastrointestinales y para la salud nutricional general.

3. Sumario de la invención

Los solicitantes han descubierto que, sorprendentemente, el riesgo de recidiva de cáncer después del HSCT está asociado con la presencia y/o ausencia de un grupo específico de bacterias. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar un sujeto que tiene riesgo de recidiva de cáncer según la reivindicación 1 en el presente documento.

Se describe un método para determinar la presencia de bacterias o esporas de las mismas en una muestra de un sujeto al que se le ha diagnosticado, o tiene riesgo de padecer, cáncer. En determinadas descripciones, el sujeto ha recibido tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), tal como un trasplante de células madre alogénico (alo-HSCT), antes o después de determinar la presencia de bacterias en la muestra.

En determinadas descripciones, la detección de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en una muestra del sujeto indica un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, las bacterias o esporas de las mismas detectadas son *Eubacterium limosum*, *Peptococcus niger*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Armatimonas rosea*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, las bacterias o esporas de las mismas detectadas son *Eubacterium limosum*, o una agrupación que comprende *Eubacterium limosum*.

En determinadas descripciones, las bacterias detectadas son *Parvimonas micra*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, las bacterias o esporas de las mismas comprenden una secuencia de ARNr 16S que tiene entre aproximadamente el 85 y el 100% de identidad con una secuencia de ácido nucleico descrita por una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 o las SEQ ID NO: 1-17.

En determinadas descripciones, la muestra del sujeto es una muestra fecal o una muestra de microbiota intestinal. En determinadas realizaciones no limitativas, la abundancia de bacterias en la muestra de un primer sujeto indica un

riesgo reducido de recidiva de cáncer cuando la abundancia de las bacterias es mayor que el nivel de dichas bacterias en una muestra de un segundo sujeto que ha tenido una recidiva de cáncer, o mayor que un nivel de referencia, por ejemplo, un nivel de bacterias presentes en la microbiota intestinal por encima del cual es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

- 5 En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que
10 comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en una muestra de un primer sujeto que es menor que la abundancia de las bacterias en una muestra de un segundo sujeto que no ha tenido una recidiva de cáncer es indicativa de que el primer sujeto tiene un mayor riesgo de una recidiva de cáncer. En las descripciones, una abundancia en la muestra del primer sujeto que es menor que un nivel de referencia es indicativa de que el primer sujeto tiene un mayor riesgo de recidiva de cáncer, por ejemplo, un nivel de bacterias presentes en la microbiota
15 intestinal por debajo del cual es indicativa de tener un mayor riesgo de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, la detección de *Enterococcus faecium* en una muestra del sujeto indica un mayor riesgo de recidiva de cáncer. En determinadas descripciones, la muestra del sujeto es una muestra fecal o una muestra de microbiota intestinal. En determinadas descripciones, la abundancia de bacterias en la muestra de un primer sujeto indica un mayor riesgo de recidiva de cáncer cuando la abundancia de las bacterias es mayor que la
20 abundancia de dichas bacterias en una muestra de un segundo sujeto que no ha tenido una recidiva de cáncer, o mayor que un nivel de referencia, por ejemplo, un nivel de bacterias presentes en la microbiota intestinal por encima del cual es indicativa de tener un mayor riesgo de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Enterococcus faecium* en la muestra de un primer sujeto que es menor que la abundancia de las bacterias en una muestra de un segundo sujeto que ha tenido una
25 recidiva de cáncer es indicativa de que el primer sujeto tiene un riesgo reducido de una recidiva de cáncer. En determinadas descripciones, una abundancia en la muestra del primer sujeto que es menor que un nivel de referencia es indicativa de que el primer sujeto tiene un riesgo reducido de recidiva de cáncer, por ejemplo, un nivel de bacterias presentes en la microbiota intestinal por debajo del cual es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

- 30 En determinadas descripciones, los métodos para detectar la abundancia de una o más bacterias en una muestra fecal o una muestra de microbiota intestinal se llevan a cabo en la muestra *in vitro*.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden además administrar una terapia contra el cáncer a un sujeto cuando se ha determinado que el sujeto tiene un mayor riesgo de recidiva de cáncer.

- 35 En determinadas descripciones, la terapia comprende administrar un probiótico al sujeto, en la que el probiótico comprende *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

- 40 En determinadas descripciones, la terapia comprende administrar un prebiótico al sujeto, en la que el prebiótico comprende uno o más agentes, por ejemplo, un complemento nutricional, que aumentan el crecimiento y la supervivencia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una
45 combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el prebiótico comprende uno o más de hidratos de carbono complejos malabsorbidos, oligosacáridos, fructanos de tipo inulina o arabinoxilanos.

- 50 En determinadas descripciones, la terapia comprende administrar un posbiótico al sujeto, en el que el posbiótico comprende uno o más agentes, tales como una proteína, expresados por *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una
55 combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el posbiótico comprende medios de un cultivo de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium*

brachy, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el posbiótico comprende un ácido graso de cadena corta tal como butirato o ácidos similares, o ácidos biliares secundarios.

En determinadas descripciones, la terapia comprende administrar un antibiótico que es específico para *Enterococcus faecium*. En determinadas descripciones, el antibiótico comprende un antibiótico de penicilina, vancomicina y/o linezolid. En determinadas descripciones, el antibiótico no afecta de manera selectiva a *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, la terapia comprende administrar una *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy* recombinante, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, o progenie de las mismas, al sujeto. En determinadas descripciones, las bacterias recombinantes expresan un gen de resistencia a los antibióticos.

En determinadas descripciones, la terapia comprende cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia con células madre u otras terapias celulares tales como la administración de células T modificadas con receptor de antígeno quimérico (células T modificadas con CAR) y/o células T específicas de antígeno, o una combinación de las mismas.

En determinadas descripciones, se proporciona una composición, y usos terapéuticos de la misma tal como se describen en el presente documento, que comprenden una o más bacterias aisladas, o esporas de las mismas, seleccionadas del grupo que consiste en las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En algunas descripciones, las bacterias están en una formulación para la administración a un sujeto. En determinadas descripciones, las bacterias están en una formulación farmacéutica. En determinadas descripciones, las bacterias son bacterias recombinantes, por ejemplo, bacterias recombinantes que expresan un gen de resistencia a los antibióticos.

En determinadas descripciones, la composición se formula para administración oral, nasogástrica o rectal. En determinadas descripciones, la composición incluye además bacterias probióticas y/o levaduras, un prebiótico, un posbiótico o un antibiótico. En determinadas descripciones, la composición se formula como líquido, suspensión, polvo seco, comprimido, cápsula o producto alimenticio. En determinadas descripciones, las bacterias o la agrupación de las mismas son bacterias recombinantes, o progenie de las mismas, que pueden incluir uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican para una proteína que confiere a las bacterias recombinantes sensibilidad o resistencia a los antibióticos.

En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer, o aumentar la tasa de supervivencia, de un sujeto que tiene una recidiva de cáncer, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición que comprende las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En diversas descripciones, las bacterias pueden administrarse en el estado vegetativo o latente, o como esporas, o una mezcla de los mismos.

En algunas descripciones, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la gravedad de uno o más síntomas y/o signos clínicos de recidiva de cáncer que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de uno o más de una célula recombinante tal como se describe en el presente documento, o progenie de la misma; una composición que comprende las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores; un probiótico, prebiótico, posbiótico y/o

antibiótico tal como se describen en el presente documento; cirugía; radioterapia; quimioterapia; inmunoterapia; terapia con células madre; terapia celular, y combinaciones de las mismas, en el que los síntomas y/o signos clínicos se seleccionan del grupo que consiste en presencia de células cancerosas, proliferación de células cancerosas, crecimiento tumoral, presencia tumoral, volumen tumoral, cantidad detectable de enfermedad mínima residual, o una combinación de los mismos.

También se describen kits que comprenden las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el kit comprende además instrucciones que comprenden información sobre el uso de las células o la composición para tratar o prevenir la recidiva de cáncer. En determinadas descripciones, las instrucciones comprenden al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; pauta posológica y administración de dosificación para tratar o prevenir la recidiva de cáncer o síntomas de la misma; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información acerca de sobredosis; reacciones adversas; farmacología en animales; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en el recipiente (cuando está presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como folleto, prospecto, tarjeta u hoja de órdenes independiente suministrado en o con el recipiente.

También se describen kits para diagnosticar que un sujeto tiene un riesgo aumentado de recidiva de cáncer, que comprenden uno o más agentes para detectar la abundancia de una o más bacterias en una muestra de microbiota intestinal, en los que la una o más bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Enterococcus faecium*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, bacterias, y una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

La presente divulgación proporciona además composiciones que comprenden una o más bacterias aisladas, o esporas de las mismas, o una agrupación que comprende dichas una o más bacterias, tal como se describen en el presente documento, para su uso en reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer en un sujeto. En determinadas descripciones, el sujeto ha recibido tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), tal como un trasplante de células madre alogénico (alo-HSCT), antes o después de determinar la presencia de bacterias en la muestra. El trasplante de células madre alogénico (alo-HSCT) puede ser un alo-HSCT repleto de células T.

En determinadas descripciones, la composición puede administrarse en una cantidad eficaz para disminuir la presencia de *Enterococcus faecium* en el sujeto y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* en el sujeto.

En determinadas descripciones, el sujeto tiene un riesgo aumentado de recidiva de cáncer, en el que una muestra de microbiota intestinal del sujeto tiene un nivel de una o más de las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, que es menor que un nivel de referencia bacteriano. De manera alternativa o adicional, la muestra de microbiota intestinal del sujeto tiene un nivel de bacterias *Enterococcus faecium* que es mayor que un nivel de referencia bacteriano.

En determinadas descripciones, la composición para su uso en reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer en un sujeto comprende además someter a ensayo una muestra de microbiota intestinal de un sujeto y determinar el nivel de una o más de las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, presentes en la muestra de microbiota intestinal, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto si el nivel de la una o más bacterias en la muestra es menor que un nivel de referencia bacteriano.

En determinadas descripciones, la composición para su uso en reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer en un sujeto comprende además someter a ensayo una muestra de microbiota intestinal de un sujeto y determinar el nivel de bacterias *Enterococcus faecium* presentes en la muestra de microbiota intestinal, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al

sujeto si el nivel de bacterias *Enterococcus faecium* en la muestra es mayor que un nivel de referencia bacteriano.

En determinadas descripciones, la presente divulgación proporciona una composición para su uso en terapia contra el cáncer en un sujeto al que se le ha diagnosticado que tiene un riesgo aumentado de recidiva de cáncer, en el que una muestra de microbiota intestinal del sujeto tiene un nivel de una o más de las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, que es menor que un nivel de referencia bacteriano. De manera adicional o alternativa, una muestra de microbiota intestinal del sujeto tiene un nivel de bacterias *Enterococcus faecium* que es mayor que un nivel de referencia bacteriano. La terapia contra el cáncer puede incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia con células madre y/o terapia celular, o puede implicar administrar al sujeto bacterias probióticas y/o levaduras, un prebiótico, un posbiótico o un antibiótico.

4. Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la cuantificación de diversidad bacteriana durante un periodo de 1 año usando el índice inverso de Simpson después del análisis composicional de muestras de heces de 309 pacientes realizada mediante secuenciación del gen 16S.

La figura 2 muestra asociaciones de géneros bacterianos con recidiva, o con riesgo de recidiva, durante un periodo de observación de un año. Las asociaciones de bacterias se cuantificaron mediante regresión univariante de Cox. La posición a lo largo del eje vertical indica la significación estadística.

La figura 3 muestra la asociación entre la abundancia bacteriana y la recidiva después de ajustes multivariantes para los factores de riesgo. El modelo de regresión de Cox se ajustó para la intensidad de acondicionamiento, la fuente de injerto (de cordón frente a de adulto no modificado/repleto de células T) y el índice de riesgo de enfermedad.

Las figuras 4A-B muestran (A) que la abundancia de *Parvimonas micra* está asociada con un menor riesgo de recidiva y (B) diagramas de dispersión por supervivencia de Mann-Whitney por rangos logarítmicos, que indican que *Parvimonas micra* es un biomarcador candidato para la protección contra la recidiva.

La figura 5 muestra la asociación entre la abundancia de *Parvimonas micra* y la recidiva, que indica que la mejor capacidad discriminadora de *Parvimonas* es después de injertos no de cordón convencionales (repletos de células T).

La figura 6 muestra la asociación entre la abundancia de *Parvimonas micra* y la recidiva, que indica que la mejor capacidad discriminadora de *Parvimonas* es después de regímenes de acondicionamiento de alta intensidad.

La figura 7 muestra la asociación entre la abundancia de *Parvimonas micra*, *Streptococcus anginosus* y *Enterococcus faecium* y la recidiva.

La figura 8 muestra asociaciones entre los taxones bacterianos y la mortalidad relacionada con EICH al año. La asociación de los taxones bacterianos con la mortalidad relacionada con EICH se determinó mediante regresión univariante de Cox.

La figura 9 muestra la tasa de recidiva de la cohorte de 466 sujetos descrita en el ejemplo 2 durante 36 meses después del alo-HSCT.

La figura 10 muestra los umbrales de abundancia de >0,01% en >10% para UTO que se consideraron para el análisis de su asociación con la recidiva o la ausencia de recidiva tal como se describe en el ejemplo 2. El número total de UTO consideradas fue de 194.

La figura 11 muestra las asociaciones entre las 194 UTO consideradas y los niveles de recidiva usando el modelado de regresión de Cox en un subconjunto de descubrimiento de 234 pacientes de la cohorte de 466 pacientes.

Las figuras 12A-B muestran la asociación entre la abundancia de *Acidaminococcus intestini* y la recidiva en los subconjuntos tanto de descubrimiento como de validación de la cohorte de 466 pacientes, en los que el umbral de corte para la abundancia bacteriana fue de $3,4 \times 10^{-5}$ en el modelo de regresión. Este valor de corte dio como resultado que aproximadamente el 85% tuvieran una baja abundancia de las bacterias (que se correlacionó con la recidiva) y que el 15% tuvieran una alta abundancia (que se correlacionó con la ausencia de recidiva).

La figura 13 muestra la asociación entre la abundancia de *Acidaminococcus intestini* y la recidiva después del ajuste multivariante.

Las figuras 14A-B muestran la asociación entre la abundancia de *Acidaminococcus intestini* y la recidiva en pacientes que recibieron trasplantes repletos de células T, en las que la figura 14A muestra la asociación con respecto a varios factores y la figura 14B muestra una asociación inversa entre la abundancia de *Acidaminococcus*

intestini y la recidiva.

Las figuras 15A-B muestra diagramas de dispersión de microbiota intestinal diversa y sus asociaciones con la recidiva y la mortalidad relacionada con EICH.

5 La figura 16 muestra las asociaciones de microbiota intestinal diversa, incluyendo *Enterococcus*, *Acidaminococcus* y *Blautia*, con la recidiva y la ausencia de mortalidad relacionada con EICH.

La figura 17 muestra la asociación entre la abundancia de *Acidaminococcus* y la supervivencia global, la mortalidad relacionada con EICH y la ausencia de recidiva.

10 Las figuras 18A-B son representaciones esquemáticas de cálculos de abundancias promedio ponderadas en el tiempo, en las que la figura 18A es para pacientes en los que no había ninguna muestra disponible de la semana previa y/o la semana posterior al periodo de muestreo y la figura 18B es para pacientes en los que había disponible al menos una muestra adicional de la semana previa y/o la semana posterior al periodo de muestreo.

La figura 19 muestra la asociación entre la diversidad microbiana intestinal y el tiempo hasta la recidiva/POD en la cohorte del ejemplo 3.

15 Las figuras 20A-D muestran diagramas de volcán de valores de p multivariantes de UTOcr frente a las razones de riesgos instantáneos para recidiva/POD (figura 20A). La figura 20B muestra valores de p univariantes de UTOcr representados gráficamente frente a las razones de riesgos instantáneos para recidiva/POD. La figura 20C proporciona diagramas de volcán de valores de p multivariantes de UTO frente a las razones de riesgos instantáneos para recidiva/POD. La figura 20D muestra valores de p univariantes de UTO representados gráficamente frente a las razones de riesgos instantáneos para recidiva/POD.

20 La figura 21 proporciona la asociación de la abundancia de características de microbiota con la recidiva/POD mediante modelos de Cox en el conjunto de descubrimiento (n = 271).

25 Las figuras 22A-C proporcionan la asociación univariante y multivariante de UTOcr 1614 con el riesgo de recidiva/POD tras el alo-HCT usando regresión de riesgos instantáneos proporcionales de Cox específica de la causa en la cohorte completa (figura 22A, n = 541), en la cohorte de descubrimiento (figura 22B, n = 271) y en la cohorte de validación (figura 22C, n = 270). UTOcr 1614 se considera como variable continua transformada logarítmicamente (multivariante I), como variable binaria de presente frente a ausente (multivariante II) o como variable categórica ordenada de agrupamientos de abundancia (multivariante III).

La figura 23 muestra que la incidencia acumulada de recidiva/POD en los conjuntos de descubrimiento y de validación es mayor en ausencia de UTOcr 1614.

30 La figura 24 proporciona un cladograma de UTOcr 1614 que representa UTOcr (números azules) y UTO. Se enumeran el porcentaje de identidad con la secuencia de referencia de 16S del NCBI y su número de registro. Las barras a la derecha indican pertenencia a una familia taxonómica. La pequeña tabla en la parte inferior enumera la clasificación taxonómica de las cuatro especies principales en UTOcr 1614.

35 La figura 25 proporciona un diagrama de sectores de la contribución relativa (abundancia media) de las cuatro especies principales a la abundancia global de UTOcr 1614 en todos los pacientes.

Las figuras 26A-B muestran que, en la cohorte de pacientes del ejemplo 3, cuando se estratificó por la abundancia de UTOcr 1614, UTOcr estaba asociada con menos riesgo acumulado de recidiva/POD (figura 26A). La figura 26B proporciona la abundancia media de UTOcr 1614 (parte superior) y la incidencia acumulada de recidiva/POD a los 2 años (parte inferior) en los cuatro estratos.

40 La figura 27 muestra que el RDRI estratifica el riesgo de recidiva/POD de los pacientes en la cohorte del ejemplo 3.

La figura 28 proporciona índices de concordancia específicos de la causa en presencia de riesgos competitivos para combinaciones de presencia intestinal de UTOcr 1614 con factores de riesgo clínicos para recidiva/POD (es decir, RDRI, fuente de injerto e intensidad de acondicionamiento).

45 La figura 29 muestra las asociaciones entre la presencia de UTOcr 1614 en muestras de heces tres semanas después del alo-HCT y la supervivencia global, la incidencia acumulada de recidiva/POD, la incidencia acumulada de EICH aguda de grado 2-4 y la mortalidad relacionada con el trasplante (TRM). Diecisiete pacientes habían desarrollado EICH de grado 2-4 antes del día 21 de referencia y se excluyeron de este panel.

50 La figura 30 representa la asociación de la presencia de UTOcr 1614 con la recidiva/POD en subconjuntos de pacientes según la fuente de injerto, la intensidad de acondicionamiento, el grado de coincidencia con HLA, el RDRI y el tipo de enfermedad, en la que el tamaño del recuadro gris es proporcional al número de pacientes en el subgrupo.

Las figuras 31A-E representan la incidencia acumulada de recidiva/POD según la presencia de UTOcr 1614 y la

fuelle de injerto, en las que la figura 31A es para la cohorte completa, la figura 31B es para injertos repletos de células T, la figura 31C es para injertos de PBSC/BM no modificadas (repletos de células T), la figura 31D es para injertos de cordón (repletos de células T) y la figura 31E es para injertos agotados de células T.

5 La figura 32 muestra la asociación entre la abundancia de UTOcr y la recidiva/POD para receptores de injertos de PBSC/BM no modificadas (n = 143) basándose en una única muestra recogida por paciente antes del alo-HCT (pre-HCT).

La figura 33 muestra la asociación entre la abundancia de UTOcr y la recidiva/POD para receptores de todas las fuentes de injerto (n = 469) basándose en una única muestra recogida por paciente antes del alo-HCT (pre-HCT).

10 La figura 34 muestra los límites de categoría para los agrupamientos de abundancia usados durante todo el estudio, tal como se representan por las figuras 26B, 26C, 32 y 33.

5. Descripción detallada de la invención

15 Se describen métodos para determinar el riesgo de que un sujeto con cáncer experimente una recidiva de cáncer tras el tratamiento, por ejemplo, después del alo-HSCT, y también métodos y composiciones para reducir el riesgo de una recidiva de cáncer, así como composiciones y métodos para aumentar la probabilidad de que un sujeto sobreviva a una recidiva de cáncer. Con fines de claridad de descripción, y no a modo de limitación, esta sección se divide en las siguientes subsecciones:

(i) Métodos para determinar el riesgo de recidiva de cáncer;

(ii) Bacterias terapéuticas;

(iii) Células recombinantes;

20 (iv) Composiciones farmacéuticas;

(v) Métodos de tratamiento; y

(vi) Kits.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Lo siguiente son términos relevantes para la presente descripción:

25 Un "individuo" o "sujeto" o "paciente" en el presente documento es un vertebrado, tal como un ser humano o animal no humano, por ejemplo, un mamífero. Los mamíferos incluyen seres humanos, primates, animales de granja, animales deportivos, roedores y mascotas. Los ejemplos no limitativos de sujetos animales no humanos incluyen roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; conejos; perros; gatos; ovejas; cerdos; cabras; ganado vacuno; caballos; y primates no humanos tales como simios y monos.

30 Una "cantidad eficaz" de una sustancia, tal como se usa ese término en el presente documento, es aquella cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en que esté aplicándose. En el contexto de administrar una composición para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o administrar una composición para reducir al menos un signo o síntoma de una recidiva de cáncer, una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento es una cantidad 35 suficiente para tratar y/o mejorar una recidiva de cáncer, así como disminuir los síntomas y/o reducir la probabilidad de una recidiva de cáncer. La disminución puede ser una disminución del 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% en la gravedad de síntomas de recidiva de cáncer o la probabilidad de recidiva de cáncer. Una cantidad eficaz se administra en una o más administraciones.

40 Tal como se usa en el presente documento, y tal como se entiende bien en la técnica, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los propósitos de este objeto, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen alivio o mejora de uno o más signos o síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, remisión de la enfermedad (por ejemplo, remisión del cáncer) y/o mejora o paliación del estado patológico. La disminución puede ser una 45 disminución del 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% en la gravedad de complicaciones, signos o síntomas. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" también puede referirse a disminuir la probabilidad de recidiva de cáncer.

50 El término "vector de expresión" se usa para indicar una molécula de ácido nucleico que es o bien lineal o bien circular, en la que puede integrarse otro fragmento de secuencia de ácido nucleico de tamaño apropiado. Tal(es) fragmento(s) de ácido nucleico puede(n) incluir segmentos adicionales que proporcionan la transcripción de un gen codificado por el fragmento de secuencia de ácido nucleico. Los segmentos adicionales pueden incluir: promotores, terminadores de transcripción, potenciadores, sitios internos de entrada al ribosoma, regiones no traducidas, señales

de poliadenilación, marcadores seleccionables, orígenes de replicación y similares, tal como se conoce en la técnica. Con frecuencia, los vectores de expresión se derivan de plásmidos, cósmidos, vectores virales y cromosomas artificiales de levaduras; con frecuencia, los vectores son moléculas recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico procedentes de varias fuentes.

- 5 El término “unido operativamente”, cuando se aplica a secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, en un vector de expresión, indica que las secuencias están dispuestas de modo que funcionan en cooperación con el fin de lograr sus propósitos previstos, es decir, una secuencia promotora permite el inicio de la transcripción que avanza a través de una secuencia codificante unida hasta la señal de terminación.

- 10 Una “molécula de ácido nucleico” es una secuencia monocatenaria o bicatenaria de nucleótidos unidos covalentemente en la que los extremos 3' y 5' en cada nucleótido están unidos por enlaces fosfodiéster. El polinucleótido puede estar compuesto por bases desoxirribonucleotídicas o bases ribonucleotídicas. Los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, y pueden fabricarse sintéticamente *in vitro* o aislarse a partir de fuentes naturales.

- 15 El término “promotor”, tal como se usa en el presente documento, indica una región dentro de un gen a la que pueden unirse factores de transcripción y/o ARN polimerasa para controlar la expresión de una secuencia codificante asociada. Habitualmente, pero no siempre, los promotores están ubicados en las regiones no codificantes en 5' de los genes, aguas arriba del codón de inicio de traducción. La región promotora de un gen puede incluir una o más secuencias de consenso que actúan como sitios de unión reconocibles para dominios de unión a ácido nucleico específicos de secuencia de proteínas de unión a ácido nucleico. No obstante, tales sitios de
20 unión también pueden estar ubicados en regiones fuera del promotor, por ejemplo, en regiones potenciadores ubicadas en intrones o aguas abajo de la secuencia codificante.

Un “gen regulador” es un gen implicado en el control de la expresión de uno o más de otros genes.

- Una “agrupación” o “agrupación de bacterias relacionadas” puede incluir dos o más especies o cepas bacterianas que están relacionadas por secuencias de ARNr, por ejemplo, ARNr 16S (por ejemplo, una región variable de la
25 secuencia de ADNr 16S, tal como V1, V2, V3, V4 o V5), similitud y/o distancia evolutiva. Por ejemplo, en un árbol filogenético en el que los nodos (puntos de ramificación) se definen como las agrupaciones, las UTO en las puntas del árbol subsidiario a un nodo dado definen los miembros de tal agrupación. Tales agrupaciones pueden denominarse alternativamente “agrupaciones de unidades taxonómicas operativas relacionadas” o “UTOcr.” En determinadas descripciones, las especies bacterianas en una UTOcr presentan una identidad con ARNr 16S menor
30 de o igual al 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 99% o el 100%. En determinadas descripciones, las especies bacterianas en una UTOcr presentan una identidad con ARNr 16S de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 99% o el 100%.

- En determinadas descripciones, las especies bacterianas en una UTOcr comprenden una identidad con una o más secuencias de ácido nucleico descritas por una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 o las SEQ ID NO: 1-17, en las
35 que el nivel de identidad es de entre aproximadamente el 80 y el 100%, entre el 85 y el 100%, entre el 90 y el 100%, entre el 95 y el 100%, entre el 97 y el 100%, entre el 80 y el 97%, entre el 80 y el 95%, entre el 80 y el 90%, entre el 80 y el 85%, y valores entremedias, por ejemplo, aproximadamente el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100%. En algunas realizaciones, el nivel de identidad es de entre (inclusive) el 80 y el 100%, entre el 85 y el 100%, entre el 90 y el 100%, entre el 95 y
40 el 100%, entre el 97 y el 100%, entre el 80 y el 97%, entre el 80 y el 95%, entre el 80 y el 90%, entre el 80 y el 85%, y valores entremedias, por ejemplo, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100%. En determinadas descripciones, el porcentaje de identidad corresponde a la región variable V4-V5 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 o las SEQ ID NO: 1-17.

- En determinadas descripciones, las especies bacterianas en una UTOcr se determinan por la relación de las
45 secuencias de UTO basándose en poda y reinjerto de subárbol (SPR) de mínima evolución e intercambios de vecinos más cercanos (NNI) de máxima probabilidad, tal como describen Price *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9490.

- Un “probiótico” es un microorganismo o grupo de microorganismos que proporciona beneficios para la salud a, o que no es patógeno para, un sujeto cuando se consume, ingiere o administra de otro modo a un sujeto, por ejemplo, una
50 reducción en la probabilidad de recidiva tras el tratamiento contra el cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término probiótico puede usarse para describir, por ejemplo, bacterias probióticas y/o levaduras probióticas, y pueden incluir las bacterias descritas en el presente documento así como otras bacterias.

- Un “prebiótico” es una sustancia que fomenta el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de una o más bacterias o levaduras. Tal como se usa en el presente documento, el término prebiótico puede usarse para describir,
55 por ejemplo, un complemento nutricional incluyendo fibra vegetal, o uno o más de hidratos de carbono complejos malabsorbidos, oligosacáridos, fructanos de tipo inulina o arabinosilanos.

Un “posbiótico” es una sustancia derivada de un organismo probiótico. Tal como se usa en el presente documento, el término posbiótico puede usarse para describir, por ejemplo, una proteína expresada por una o más bacterias o levaduras, un producto metabólico de una o más bacterias o levaduras, o medios de un cultivo de una o más cepas

de bacterias o levaduras.

Tal como se usa en el presente documento, el término "recidiva de cáncer" se refiere al regreso o a la reaparición del cáncer, o de los signos y síntomas del cáncer, después de un periodo de mejora, por ejemplo, después de un periodo de reducción en la presencia de cáncer, o de los signos y síntomas del mismo, tras el tratamiento. En determinadas descripciones, "recidiva de cáncer" se refiere al regreso o a la reaparición del cáncer, o de los signos y síntomas del mismo, después de un periodo de mejora de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 12 meses o más, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o más. En determinadas realizaciones, el periodo de mejora es de entre aproximadamente 3 semanas y 2 años.

En determinadas descripciones, la recidiva de cáncer se determina midiendo el tiempo hasta la recidiva o la progresión de la enfermedad (POD) mediante criterios específicos de la enfermedad. La detección de enfermedad mínima residual se puntúa como acontecimiento de recidiva/POD cuando se realiza una acción clínica basándose en los resultados de citometría de flujo, radiográficos o moleculares mediante el inicio de la terapia, la infusión de linfocitos de donante o la suspensión de inmunodepresión.

5.1 Métodos para determinar el riesgo de recidiva de cáncer

En determinadas descripciones, se proporcionan métodos para determinar si un sujeto diagnosticado con cáncer tiene un riesgo mayor o reducido de tener una recidiva de cáncer tras un tratamiento contra el cáncer.

En determinadas descripciones, un sujeto que se determina que tiene un mayor riesgo de recidiva de cáncer se monitoriza más frecuentemente y durante un periodo de tiempo prolongado para detectar la recidiva tras el tratamiento, y pueden administrársele regímenes terapéuticos además de, o como alternativa a, un trasplante de células madre hematopoyéticas, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Los ejemplos no limitativos de cáncer incluyen leucemia aguda, leucemia crónica, neoplasias malignas linfoides, trastornos de células plasmáticas y neoplasias mieloproliferativas.

En determinadas descripciones, el tratamiento contra el cáncer comprende un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). En determinadas descripciones, el trasplante de células madre hematopoyéticas comprende células madre alogénicas de un donante que es diferente de las del paciente tratado (alo-HSCT). En determinadas descripciones, el trasplante de células madre hematopoyéticas comprende células madre autólogas del paciente que está tratándose.

En determinadas descripciones, el tratamiento contra el cáncer comprende un trasplante de sangre de cordón alogénico o un trasplante de células madre de cordón alogénico.

En determinadas descripciones, el tratamiento contra el cáncer comprende un trasplante repleto de células T o un trasplante agotado de células T.

En determinadas descripciones, el tratamiento contra el cáncer comprende un trasplante de médula ósea.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de una especie de bacterias, una UTO o una agrupación (también denominadas en el presente documento "bacteria") en una muestra de microbiota intestinal del sujeto que es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer. La invención se refiere al uso de *Eubacterium limosum* o las secuencias correspondientes tal como se define en la reivindicación 1. A continuación se describe el uso de otras bacterias, sin embargo, la invención se restringe al uso de las bacterias reivindicadas, que no son opcionales. En determinadas descripciones, las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, las bacterias detectadas son *Peptococcus niger*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Armatimonas rosea*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

Las bacterias detectadas son *Eubacterium limosum*, o una agrupación que comprende *Eubacterium limosum*.

En determinadas descripciones, las bacterias detectadas son *Parvimonas micra*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, las bacterias se detectan antes de tratar al sujeto, por ejemplo, antes de un HSCT.

En determinadas descripciones, las bacterias se detectan después de tratar al sujeto, por ejemplo, después de un HSCT. En determinadas descripciones, cuando las bacterias se detectan tras el tratamiento, la detección de

cualquier nivel de una o más de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, es indicativo de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en el sujeto que es mayor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en el sujeto que es mayor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que no ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en el sujeto que es menor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un mayor riesgo de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en el sujeto que es menor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que no ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un mayor riesgo de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de una bacteria más presente en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un riesgo reducido de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de la una o más bacterias en la microbiota del sujeto es mayor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de bacterias, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por encima del cual es indicativo de riesgo reducido de recidiva de cáncer, tal como determina un médico o experto en la técnica.

En un ejemplo no limitativo, tal nivel de referencia es la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto con cáncer que no ha tenido, o tiene un riesgo reducido de, una recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, tal nivel de referencia es la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto sano al que no se le ha diagnosticado cáncer o que tiene un riesgo reducido de tener cáncer.

En determinadas descripciones, tal nivel de referencia es el porcentaje de la abundancia total de bacterias en una muestra de microbiota intestinal del sujeto que comprende la una bacteria más descrita en el presente documento, o una agrupación que comprende dichas una o más bacterias. En determinadas descripciones, el nivel bacteriano de referencia es de entre aproximadamente el 0,10 y el 50%, entre aproximadamente el 0,15 y el 45%, entre aproximadamente el 0,5 y el 40%, entre aproximadamente el 1 y el 35%, entre aproximadamente el 1,5 y el 30%, entre aproximadamente el 2 y el 30%, entre aproximadamente el 2,5 y el 25%, entre aproximadamente el 3 y el 20%, entre aproximadamente el 3,5 y el 15%, entre aproximadamente el 4 y el 10%, entre aproximadamente el 4,5 y el 8%, entre aproximadamente el 5 y el 6%, y valores entremedias.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de una bacteria más presente en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finexgoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de la una o más bacterias en la microbiota del sujeto es menor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de bacterias, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finexgoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por dejado del cual es indicativa de un mayor riesgo de recidiva de cáncer, tal como determina un médico o experto en la técnica.

En un ejemplo no limitativo, tal nivel de referencia puede ser la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto con cáncer que ha tenido, o tiene un mayor riesgo de, una recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto que es indicativa de un riesgo aumentado de recidiva de cáncer. En determinadas descripciones, las bacterias son *Enterococcus faecium*.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Enterococcus faecium* en el sujeto que es mayor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un riesgo aumentado de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Enterococcus faecium* en el sujeto que es mayor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que no ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un riesgo aumentado de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Enterococcus faecium* en el sujeto que es menor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, detectar una abundancia de *Enterococcus faecium* en el sujeto que es menor que la abundancia de dichas bacterias en una muestra de microbiota intestinal de un segundo sujeto que no ha tenido una recidiva de cáncer tras la terapia contra el cáncer es indicativa de un riesgo reducido de recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de bacterias *Enterococcus faecium* presentes en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un riesgo aumentado de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de *Enterococcus faecium* en la microbiota del sujeto es mayor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de bacterias *Enterococcus faecium*, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por encima del cual es indicativo de tener un mayor riesgo de recidiva de cáncer, tal como determina un médico o experto en la técnica.

En un ejemplo no limitativo, tal nivel de referencia puede ser la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto con cáncer que ha tenido, o tiene un riesgo aumentado de, una recidiva de cáncer.

En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de bacterias *Enterococcus faecium* presentes en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un riesgo reducido de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de *Enterococcus faecium* en la microbiota del sujeto es menor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de bacterias *Enterococcus faecium*, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por debajo del cual es indicativo de tener un riesgo reducido de recidiva de cáncer, tal como determina un médico o experto en la técnica.

En un ejemplo no limitativo, tal nivel de referencia puede ser la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto con cáncer que no ha tenido, o tiene un riesgo reducido de, una recidiva de cáncer.

En un ejemplo no limitativo, tal nivel de referencia puede ser la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto sano al que no se le ha diagnosticado cáncer, o que tiene un riesgo reducido de tener cáncer.

- 5 En determinadas descripciones, las bacterias son una agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum*. Una agrupación de bacterias de este tipo puede comprender especies de las familias *Eubacteriaceae* y *Peptococcaceae*, incluyendo *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* y *Peptococcus niger*. En determinadas descripciones, la agrupación puede incluir además *Armatimonas rosea* y/o *Saccharofermentans acetigenes*. En determinadas descripciones, la agrupación puede comprender más de aproximadamente el 40%,
10 más de aproximadamente el 50%, más de aproximadamente el 60% o más de aproximadamente el 65% de *Eubacterium limosum*. En determinadas descripciones, la agrupación puede incluir de desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 20% de cada una de *Anaerofustis stercorihominis* y *Peptococcus niger*.

- 15 En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de una agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum* presentes en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un riesgo disminuido de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de la agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum* en la microbiota del sujeto es mayor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de la agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum*, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por encima del cual es indicativo de tener un menor riesgo de recidiva de cáncer, tal como
20 determina un médico o experto en la técnica. En un ejemplo no limitativo, tal nivel de referencia puede ser la abundancia de dichas bacterias en la microbiota de un sujeto con cáncer que ha tenido, o tiene un riesgo disminuido de, una recidiva de cáncer.

- 25 En determinadas descripciones, los métodos comprenden determinar la abundancia de una agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum* presentes en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un riesgo aumentado de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de la agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum* en la microbiota del sujeto es menor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de la agrupación de bacterias que comprende *Eubacterium limosum*, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por debajo del cual es indicativo de tener un riesgo aumentado de recidiva de cáncer, tal como
30 determina un médico o experto en la técnica.

En determinadas descripciones, la muestra de microbiota es una muestra fecal o una muestra de contenido intestinal, por ejemplo, un hisopado rectal.

En determinadas descripciones, la abundancia o cantidad de bacterias presentes en una muestra se determina midiendo la abundancia o cantidad de ácido nucleico bacteriano presente en la muestra, por ejemplo, ARNr 16S.

- 35 En determinadas descripciones, la abundancia o cantidad de bacterias presentes en una muestra se determina mediante secuenciación indiscriminada de ADN bacteriano, amplificación por PCR de genes específicos portados por las bacteria, PCR cuantitativa de transcritos expresados específicamente por las bacterias, métodos de detección bacteriana basados en anticuerpos, detección metabolómica de metabolitos bacterianos, detección proteómica de proteínas bacterianas y/o mediante métodos de cultivo de la muestra de microbiota.
- 40 En determinadas descripciones, la muestra de microbiota se recoge del sujeto hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o más días después de que el sujeto haya recibido un tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, alo-HSCT. En determinadas descripciones, la muestra de microbiota se recoge del sujeto hasta 1, 2, 3, 4 o más semanas, o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses, después de que el sujeto haya recibido un tratamiento contra el cáncer. En determinadas descripciones, la
45 muestra de microbiota se recoge del sujeto hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, o hasta 1, 2, 3, 4 o más semanas, o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses, antes de que el sujeto reciba un tratamiento contra el cáncer.

5.2 Bacterias terapéuticas

- En determinadas descripciones, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una o más bacterias terapéuticas, o esporas de las mismas, por ejemplo, *Streptococcus anginosus* (por ejemplo, 33397),
50 *Parvimonas micra* (por ejemplo, ATCC 33270), *Acidaminococcus intestini* (por ejemplo, DSM 21505), *Eubacterium limosum* (por ejemplo, ATCC 8486), *Clostridium glycyrrhizinilyticum* (por ejemplo, JCM 13369), *Desulfosporosinus lacus* (por ejemplo, DSM 15449), *Eubacterium bifforme* (por ejemplo, DSM 3989), *Anaerofustis stercorihominis* (por ejemplo, DSM 17244), *Pseudoramibacter alactolyticus* (por ejemplo, ATCC 23263), *Peptococcus niger* (por ejemplo, DSM 20475), *Armatimonas rosea* (por ejemplo, DSM 23562), *Saccharofermentans acetigenes* (por ejemplo, JCM 14006), *Fingoldia magna* (por ejemplo, ATCC 29328), *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae* (por ejemplo, ATCC 49795), *Murdochella asaccharolytica* (por ejemplo, ATCC BAA-1631), *Eubacterium brachy* (por ejemplo, ATCC 33089), una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Streptococcus anginosus*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) 33397, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_118289.1 (SEQ ID NO: 13), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Streptococcus anginosus*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Parvimonas micra*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 33270, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_114338.1 (SEQ ID NO: 12), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Parvimonas micra*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Eubacterium limosum*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 8486, 51976, o 10825, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_113248.1 (SEQ ID NO: 1), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Eubacterium limosum*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Eubacterium bifforme*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 27806, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_044731.2 (SEQ ID NO: 14), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Eubacterium bifforme*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Acidaminococcus intestini*, por ejemplo, que tiene el número de depósito de DSMZ (Instituto Leibniz DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH) n.º de DSM 21505, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_041894.1 (SEQ ID NO: 15), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Acidaminococcus intestini*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, por ejemplo, que tiene el número de depósito de DSMZ n.º de DSM 17593, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_112553.1 (SEQ ID NO: 16), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Clostridium glycyrrhizinilyticum*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Desulfosporosinus lacus*, por ejemplo, que tiene el número de depósito de DSMZ n.º de DSM 15449, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_042202.1 (SEQ ID NO: 17), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Desulfosporosinus lacus*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Anaerofustis stercorihominis*, por ejemplo, que tiene el número de depósito de DSMZ n.º de DSM 17244, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_027562.1 (SEQ ID NO: 3), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Anaerofustis stercorihominis*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Pseudoramibacter alactolyticus*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 23263, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_112097.1 (SEQ ID NO: 6), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Pseudoramibacter alactolyticus*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Peptococcus niger*, por ejemplo, que tiene el número de depósito de DSMZ n.º de DSM 20475, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_029221.1 (SEQ ID NO: 2), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Peptococcus niger*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Armatimonas rosea*, por ejemplo, que tiene el número de depósito de DSMZ n.º de DSM 23562, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_113009.1 (SEQ ID NO: 5), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Armatimonas rosea*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Saccharofermentans acetigenes*,

por ejemplo, que tiene el n.º de la Colección Japonesa de Microorganismos (JCM) 14006, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_115340.1 (SEQ ID NO: 4), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Saccharofermentans acetigenes*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Finegoldia magna*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 29328, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_113383.1 (SEQ ID NO: 7), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Finegoldia magna*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Levyella massiliensis*, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_133039.1 (SEQ ID NO: 9), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Levyella massiliensis*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Gallicola barnesae*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 49795, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_040843.1 (SEQ ID NO: 10), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Gallicola barnesae*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Murdochiella asaccharolytica*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC BAA-1631, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_116331.1 (SEQ ID NO: 8), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Murdochiella asaccharolytica*.

En determinadas descripciones, la una o más bacterias terapéuticas comprenden *Eubacterium brachy*, por ejemplo, que tiene el n.º de ATCC 33089, o bacterias que tienen al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad con una o más secuencias de ADNr 16S, por ejemplo, tal como se describe por el número de registro de GenBank NR_118779.1 (SEQ ID NO: 11), o una región variable de una o más secuencias de ADNr 16S, tal como la región V4, de dicha *Eubacterium brachy*.

En diversas descripciones, las bacterias pueden administrarse en el estado vegetativo o latente, o como esporas, o una mezcla de los mismos.

En determinadas descripciones, las bacterias terapéuticas descritas en el presente documento pueden modificarse, por ejemplo, introduciendo uno o más ácidos nucleicos exógenos en las bacterias, produciendo de ese modo bacterias recombinantes. Tales ácidos nucleicos pueden comprender, por ejemplo, un gen de resistencia a los antibióticos y/o un gen de susceptibilidad a los antibióticos. Tales bacterias recombinantes pueden prepararse tal como se describe en el presente documento.

En determinadas descripciones, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, pueden administrarse en forma de bacterias purificadas, o esporas u otros progenitores de las mismas, o alternativamente pueden administrarse como constituyente en una mezcla de tipos de bacterias, opcionalmente incluyendo una o más especies o una agrupación de bacterias adicionales, por ejemplo, bacterias probióticas, levaduras probióticas, un prebiótico, un posbiótico y/o un antibiótico.

En las descripciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas, y usos terapéuticos de las mismas, tal como se describen en el presente documento, que comprenden tales formas de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, y que incluyen opcionalmente una o más especies o una agrupación de bacterias adicionales, por ejemplo, bacterias probióticas, levaduras probióticas, un prebiótico, un posbiótico y/o un antibiótico. Las bacterias pueden administrarse en forma de un líquido, una suspensión, un polvo seco (por ejemplo, liofilizado), un comprimido, una cápsula o un supositorio, y pueden administrarse por vía oral, nasogástrica o rectal. En determinadas descripciones, las bacterias se administran en un producto alimenticio, por ejemplo, un producto alimenticio de yogur. En determinadas descripciones, un "producto alimenticio" significa un

producto o una composición que está destinado para el consumo por un ser humano o un animal no humano. Tales productos alimenticios incluyen cualquier alimento, pienso, tentempié, complemento alimenticio, líquido, bebida, golosina, juguete (juguetes masticables y/o consumibles), sustituto de las comidas o reemplazo de las comidas.

En determinadas descripciones, se proporciona una composición que comprende *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy* aisladas, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En algunas descripciones, las bacterias están en una formulación para la administración a un sujeto.

En otras descripciones, la composición comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o dieciséis bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* y *Eubacterium brachy*.

En determinadas descripciones, se proporciona una composición que comprende bacterias *Streptococcus anginosus* aisladas, bacterias *Parvimonas micra* aisladas, bacterias *Acidaminococcus intestini* aisladas, bacterias *Eubacterium limosum* aisladas, bacterias *Clostridium glycyrrhizinilyticum* aisladas, bacterias *Desulfosporosinus lacus* aisladas, bacterias *Eubacterium biforme* aisladas, bacterias *Anaerofustis stercorihominis* aisladas, bacterias *Pseudoramibacter alactolyticus* aisladas, bacterias *Peptococcus niger* aisladas, bacterias *Armatimonas rosea* aisladas, bacterias *Saccharofermentans acetigenes* aisladas, bacterias *Finegoldia magna* aisladas, bacterias *Levyella massiliensis* aisladas, bacterias *Gallicola barnesae* aisladas, bacterias *Murdochiella asaccharolytica* aisladas y/o bacterias *Eubacterium brachy* aisladas.

En algunas descripciones, dichas bacterias son una o más de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* y *Eubacterium brachy*, pero pueden estar comprendidas bacterias alternativas o adicionales en las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo, bacterias que pueden producirse de manera natural, bacterias que están en una agrupación que comprende una cualquiera o más de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, o bacterias modificadas por ingeniería para expresar proteínas de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* y/o *Eubacterium brachy*.

5.3 Células recombinantes

También se describen composiciones terapéuticas, y usos terapéuticos de las mismas, tal como se describen en el presente documento, que reducen el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentan la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer en un sujeto. Tales composiciones terapéuticas pueden comprender, por ejemplo, bacterias terapéuticas, moléculas pequeñas, polipéptidos o moléculas de ácido nucleico.

En determinadas descripciones, las composiciones terapéuticas reducen la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhiben la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto.

En alguna realización no limitativa, la composición terapéutica comprende bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micro*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy* recombinantes, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, o progenie de las mismas.

En determinadas descripciones, la composición terapéutica comprende una célula recombinante, o progenie de la misma, por ejemplo, una célula recombinante que expresa una o más proteínas expresadas de manera endógena por las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium biforme*, *Anaerofustis stercorihominis*,

Pseudoramibacter alactolyticus, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finergoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, la expresión de un gen de resistencia a los antibióticos por la célula recombinante, o progenie de la misma, reduce la inhibición en el crecimiento o la supervivencia de la célula recombinante provocada por la exposición a dicho antibiótico, tal como un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico β -lactámico, clindamicina, una cefalosporina, un antibiótico de quinolona, levofloxacina, fluoroquinolona, un antibiótico de macrólido, trimetoprim y un antibiótico de sulfonamida. En otras descripciones, la célula recombinante es resistente a un antibiótico distinto de los antibióticos anteriores.

En determinadas descripciones, la expresión de un gen de susceptibilidad a los antibióticos por la célula recombinante aumenta la inhibición en el crecimiento o la supervivencia de la célula recombinante provocada por la exposición a dicho antibiótico. En determinadas descripciones, tales antibióticos pueden incluir un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico β -lactámico, clindamicina, una cefalosporina, un antibiótico de quinolona, levofloxacina, fluoroquinolona, un antibiótico de macrólido, trimetoprim y un antibiótico de sulfonamida. En otras descripciones, la célula recombinante es susceptible a un antibiótico distinto de los antibióticos anteriores.

En determinadas descripciones, las células recombinantes descritas en el presente documento expresan uno o más genes recombinantes que aumentan la síntesis y la secreción de un metabolito que modula el riesgo de recidiva de un sujeto, por ejemplo, una proteína de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finergoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy* que reduce el riesgo de recidiva de cáncer del sujeto.

La administración de ácido nucleico a un sujeto o a una célula, por ejemplo, células bacterianas de la microbiota intestinal, puede ser o bien directa, en cuyo caso el sujeto o la célula, por ejemplo, células bacterianas de la microbiota intestinal de un sujeto, se expone directamente al ácido nucleico o a vectores que portan el ácido nucleico, o bien indirecta, en cuyo caso, las células, por ejemplo, una célula huésped, tales como células bacterianas aisladas de la microbiota intestinal, se transforman en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro*, luego se trasplantan en el sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in situ* o *ex vivo*.

Para una revisión general de los métodos de terapia génica, véanse Kron y Kreppel, Curr Gene Ther 12(5):362-73 (2012); Yi *et al.* Curr Gene Ther 11(3):218-28 (2011); Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); y May, TIBTECH 11(5):155-215 (1993). Métodos habitualmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

En determinadas descripciones, el ácido nucleico puede introducirse en células, por ejemplo, células huésped bacterianas, antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo transfección, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión esferoplástica, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células (véanse, por ejemplo, Loeffler y Behr, Met. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen *et al.*, Met. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985)), y pueden usarse según la presente divulgación, siempre que las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células del receptor no se vean alteradas. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células huésped. Luego, las células se colocan bajo selección para aislar aquellas células huésped que han captado y están expresando el gen transferido. Luego, esas células huésped se administran a un paciente.

Las células recombinantes resultantes, o progenie de las mismas, pueden administrarse a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede determinarla un experto en la técnica.

En determinadas descripciones, los términos “vector” y “vector de expresión” significan el vehículo mediante el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen foráneo) en una célula huésped, para transformar el huésped y fomentar la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc. Un “vector terapéutico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un vector que es aceptable para su administración a un animal, y particularmente a un ser humano.

Los vectores normalmente incluyen el ADN de un agente transmisible, en el que se inserta ADN foráneo. Un modo habitual para insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas denominadas

enzimas de restricción que escinden el ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) denominados sitios de restricción. Generalmente, el ADN foráneo se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN de vector, y luego se transporta por el vector al interior de una célula huésped junto con el ADN de vector transmisible. Un segmento o una secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede denominarse “constructo de ADN”. Un tipo habitual de vector es un “plásmido”, que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario, habitualmente de origen bacteriano, que puede aceptar ADN adicional (foráneo) y que puede introducirse en una célula huésped adecuada. Un vector plasmídico puede contener ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN foráneo. El ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos particular para una proteína o enzima particular. El ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula o media en o controla de otro modo la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden proceder del mismo gen o de genes diferentes, y pueden proceder del mismo organismo o de organismos diferentes. Se han descrito un gran número de vectores, incluyendo vectores plasmídicos y fúngicos, para su replicación y/o expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitativos incluyen plásmidos pKK (Clonotech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, Wis.), plásmidos pRSET (Invitrogen, San Diego, Calif.), plásmidos pCDNA3 (Invitrogen), plásmidos pREP (Invitrogen) o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.), y muchas células huésped apropiadas, usando los métodos dados a conocer o citados en el presente documento o conocidos de otro modo por los expertos en la técnica relevante. Con frecuencia, los vectores de clonación recombinantes incluirán uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a los antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, ADN desnudo, complejos de ADN-lípido y otros vehículos de recombinación normalmente usados en la técnica, que se han descrito para su expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas y pueden usarse para terapia génica así como para la expresión sencilla de proteínas.

5.4 Composiciones farmacéuticas

En determinadas descripciones, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas, y usos terapéuticos de las mismas, tal como se describen en el presente documento, que incluyen una composición terapéutica, tal como se describe en el presente documento, tal como, por ejemplo, bacterias terapéuticas, tal como se describen en el presente documento. Tales composiciones farmacéuticas pueden incluir además al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante o un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un probiótico, un prebiótico, un posbiótico y/o un antibiótico, y pueden administrarse en cualquier portador farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, glicerol, polietilenglicol y agua. La composición puede estar en forma líquida o liofilizada o secada por congelación. En algunas descripciones, una formulación incluye un diluyente (por ejemplo, un tampón tal como los tampones Tris, citrato, acetato o fosfato) que tiene valores de pH y fuerzas iónicas adecuados, un solubilizador tal como polisorbato (por ejemplo, Tween®), portadores tales como albúmina sérica humana o gelatina. En algunos casos, puede incluirse un conservante que no afecte a la viabilidad de los organismos en la composición. Los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, parabenos, cloruro de benzalconio o alcohol bencílico, antioxidantes tales como ácido ascórbico o metabisulfito de sodio, y otros componentes tales como lisina o glicina. La selección de una composición particular dependerá de varios de factores, incluyendo la afección que esté tratándose, la vía de administración y los parámetros farmacocinéticos deseados. Se encuentra un resumen más exhaustivo de componentes adecuados para las composiciones farmacéuticas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. A. R. Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980).

En determinadas descripciones, los métodos y las composiciones de la presente divulgación encuentran uso en reducir el riesgo de recidiva de cáncer en un sujeto y/o aumentar la probabilidad de supervivencia en un sujeto que tiene una recidiva de cáncer. Tales bacterias terapéuticas se administran al paciente en un portador farmacéuticamente aceptable. La vía de administración eventualmente elegida dependerá de varios factores y puede determinarla un experto en la técnica.

En determinadas descripciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden formularse usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración oral, nasogástrica o rectal. Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones, para su ingesta oral, rectal o nasal por parte de un paciente que va a tratarse. En algunas descripciones, la formulación comprende una cápsula o un comprimido formulado para administración gastrointestinal, por ejemplo, una pastilla o cápsula con recubrimiento entérico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente divulgación incluyen, en determinadas descripciones, composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de varios factores, incluyendo el estado físico general del paciente, por ejemplo, la gravedad y el grado de recidiva de cáncer, el crecimiento de células cancerosas y/o el crecimiento tumoral.

- En determinadas descripciones, las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Por ejemplo, en descripciones alternativas, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se administran en una cantidad suficiente para tratar, prevenir y/o mejorar la recidiva de cáncer, por ejemplo, el crecimiento de células cancerosas y/o la presencia de células cancerosas y/o el crecimiento tumoral y/o la presencia tumoral y/o el volumen tumoral. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el estadio de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y la interacción con otros fármacos que estén administrándose simultáneamente.
- Por consiguiente, en determinadas descripciones, las bacterias terapéuticas pueden administrarse a un paciente solas, o en combinación con uno o más de otros fármacos, secuencias de nucleótidos, cambios en el estilo de vida, etc., usados en el tratamiento o la prevención de recidiva de cáncer, o síntomas de la misma, o en composiciones farmacéuticas en las que se mezclan con excipiente(s) u otros portadores farmacéuticamente aceptables.
- Puede proporcionarse administraciones únicas o múltiples de las formulaciones dependiendo de la dosificación y la frecuencia que se requieran y sean toleradas por el paciente. En determinadas descripciones, las formulaciones deben proporcionar una cantidad suficiente de agente activo para tratar, prevenir o mejorar eficazmente la recidiva de cáncer, o los síntomas o las complicaciones de la misma, tal como se describe en el presente documento.

5.5 Métodos de tratamiento

- En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibir la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento, por ejemplo, una célula recombinante y/o una composición que comprende una o más bacterias terapéuticas, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.
- Los sujetos que necesitan tal tratamiento o tales composiciones incluyen sujetos que han tenido una recidiva de cáncer y/o pacientes con cáncer que se ha determinado que tienen un mayor riesgo de recidiva de cáncer, tal como se describe en el presente documento.
- Los sujetos que tienen un mayor riesgo de recidiva de cáncer incluyen individuos que han recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (por ejemplo, un HSCT alogénico o autólogo), un trasplante de médula ósea y/o un trasplante de células madre de cordón o sangre de cordón. En determinadas descripciones, el trasplante está repleto de células T. En determinadas descripciones, el trasplante está agotado de células T.
- En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o mejorar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición o bacterias terapéuticas descritas en el presente documento, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.
- En determinadas descripciones, una cantidad eficaz de una composición o bacterias terapéuticas descritas en el presente documento es una cantidad que reduce la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibe la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto.
- Aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer se refiere a una disminución en el crecimiento de células cancerosas, y/o la proliferación de células cancerosas, y/o el crecimiento tumoral, y/o el volumen tumoral, y/o la presencia tumoral, y/o la cantidad detectable de enfermedad mínima residual. Una reducción en la gravedad de recidiva de cáncer, o un aumento en la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer, puede dar como resultado una mejora de los síntomas o signos de cáncer, por ejemplo, adelgazamiento, fiebre, fatiga y/o dolor.
- En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibir la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de un probiótico. En determinadas descripciones, el probiótico comprende las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*,

Acidaminococcus intestini, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme* *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el probiótico comprende flora endógena (por ejemplo, un trasplante de microbiota fetal autólogo) que vuelve a introducirse en el sujeto.

En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibir la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de un prebiótico. En determinadas descripciones, el prebiótico fomenta el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en el sujeto.

En determinadas descripciones, la terapia comprende administrar un prebiótico al sujeto, en la que el prebiótico comprende uno o más agentes, por ejemplo, un complemento nutricional, que aumentan el crecimiento y la supervivencia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el prebiótico comprende uno o más de hidratos de carbono complejos malabsorbidos, oligosacáridos, fructanos de tipo inulina o arabinosilanos.

En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibir la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de un posbiótico. En determinadas descripciones, el posbiótico comprende uno o más agentes, tales como una proteína, expresados por *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el posbiótico comprende metabolitos bacterianos, por ejemplo, metabolitos que fomentan efectos antiinflamatorios. En determinadas descripciones, el posbiótico comprende medios de un cultivo de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el posbiótico comprende un ácido graso de cadena corta tal como butirato o ácidos similares, o ácidos biliares secundarios.

En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibir la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de un antibiótico. En determinadas realizaciones, el antibiótico es selectivo para *Enterococcus faecium*. En determinadas descripciones, el antibiótico no selecciona como diana *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. Por ejemplo, en determinadas descripciones, los métodos comprenden administrar un antibiótico al sujeto junto con *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy* recombinantes, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en los que las células recombinantes expresan un gen de resistencia a los antibióticos de tal manera que las células son resistentes al antibiótico administrado con las células recombinantes. En determinadas descripciones, el antibiótico comprende un antibiótico de penicilina, vancomicina y/o linezolid.

En determinadas descripciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva de cáncer y/o aumentar la probabilidad de supervivencia frente a una recidiva de cáncer y/o disminuir la cantidad de la toxina de *Enterococcus faecium* y/o inhibir la proliferación y/o el crecimiento de *Enterococcus faecium* en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de una terapia contra el cáncer, por ejemplo, cirugía para extirpar células o tejido cancerosos, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra CTLA-4, PD-1, CD52 y/o CD20; y citocinas tales como interferones e interleucinas), terapia con células madre y/o terapias celulares (por ejemplo, células T modificadas con CAR y otras células T específicas de antígeno).

En determinadas descripciones, tales métodos comprenden determinar la abundancia de una o más bacterias presentes en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer, por ejemplo, las bacterias *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica* o *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de la una o más bacterias en la microbiota del sujeto es menor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de bacterias, por ejemplo, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por debajo del cual es indicativo de tener un mayor riesgo de recidiva de cáncer, tal como determina un médico o experto en la técnica.

En determinadas descripciones, tales métodos comprenden determinar la abundancia de bacterias *Enterococcus faecium* presentes en una muestra de microbiota intestinal de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer, en los que se diagnostica o se identifica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una recidiva de cáncer cuando la abundancia o cantidad de las bacterias en la microbiota del sujeto es mayor que un nivel de referencia bacteriano. En algunas descripciones, un nivel de referencia bacteriano es una abundancia de las bacterias, por ejemplo, *Enterococcus faecium*, presentes en la microbiota intestinal, un nivel por encima del cual es indicativo de tener un mayor riesgo de recidiva de cáncer, tal como determina un médico o experto en la técnica.

En determinadas descripciones, un sujeto que se determina que tiene un mayor riesgo de recidiva de cáncer puede monitorizarse más frecuentemente y/o durante un periodo de tiempo prolongado para detectar la recidiva tras el tratamiento, y pueden administrársele regímenes terapéuticos además de, o como alternativa a, un trasplante de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, cirugía para extirpar células o tejido cancerosos, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra CTLA-4, PD-1, CD52 y/o CD20; y citocinas tales como interferones e interleucinas), terapia con células madre y/o terapias celulares (por ejemplo, células T modificadas con CAR y otras células T específicas de antígeno).

5.6 Kits

El objeto dado a conocer en el presente documento proporciona kits para diagnosticar que un sujeto tiene un riesgo mayor o reducido de recidiva de cáncer, en los que el kit comprende uno o más agentes para detectar la presencia de *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Enterococcus faecium*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores. En determinadas descripciones, el agente comprende cebadores de ácido nucleico específicos de dichas bacterias. En determinadas descripciones, los cebadores de ácido nucleico son específicos de secuenciación de ARNr 16S.

El objeto dado a conocer en el presente documento proporciona kits para tratar a un sujeto que tiene mayor riesgo de recidiva de cáncer, o a un sujeto que tiene recidiva de cáncer. En determinadas descripciones, el kit comprende una o más de la composición terapéutica o las células descritas en el presente documento, por ejemplo, bacterias terapéuticas seleccionadas del grupo que consiste en *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium glycyrrhizinilyticum*, *Desulfosporosinus lacus*, *Eubacterium bifforme*, *Anaerofustis stercorihominis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptococcus niger*, *Armatimonas rosea*, *Saccharofermentans acetigenes*, *Finegoldia magna*, *Levyella massiliensis*, *Gallicola barnesae*, *Murdochiella asaccharolytica*, *Eubacterium brachy*, una combinación de las mismas, o una agrupación que comprende una cualquiera o más de las bacterias anteriores.

En determinadas descripciones, el kit comprende instrucciones para administrar la composición terapéutica o las

- 5 células. Las instrucciones pueden comprender información sobre el uso de la composición o las células para reducir el riesgo de recidiva de cáncer o para aumentar la probabilidad de sobrevivir a una recidiva de cáncer. En determinadas descripciones, las instrucciones comprenden al menos uno de los siguientes: descripción de la composición terapéutica o células; pauta posológica y administración de dosificación; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información acerca de sobredosis; reacciones adversas; farmacología en animales; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en un recipiente (cuando está presente) que comprende las células, o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como folleto, prospecto, tarjeta u hoja de órdenes independiente suministrado en o con el recipiente.

6. Ejemplos

- 10 El objeto dado a conocer en el presente documento se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. Los ejemplos 1-3 describen la identificación de flora intestinal que está asociada con un riesgo reducido de recidiva de cáncer en poblaciones solapantes de pacientes con cáncer.

EJEMPLO 1: Determinada flora intestinal está asociada con el riesgo de recidiva de cáncer en pacientes con cáncer

15 Métodos

- En el presente ejemplo, se aplicó un enfoque de descubrimiento de biomarcador y se realizó un análisis observacional retrospectivo de 160 adultos que recibieron un aloinjerto no modificado (repleto de células T). Los pacientes se inscribieron de manera prospectiva en un protocolo de recogida de biomuestras fecales. Para este análisis, se seleccionaron pacientes que habían proporcionado al menos una muestra durante las primeras 3 semanas tras el alo-HSCT. Las enfermedades primarias en esta cohorte fueron LMA (37%), linfoma no de Hodgkin (33%), LLA (8%), SMD (7%), LLC (6%), linfoma de Hodgkin (6%), LMC (2%) y neoplasia mieloproliferativa (2%). La edad media de los pacientes fue de 52 años (intervalo de 21-75). Se acondicionaron con regímenes ablativos (17%), de intensidad reducida (64%) y no mieloablativos (19%). Recibieron injertos de sangre de cordón (46%), de adultos no emparentados (33%) o de adultos emparentados (22%). De entre los injertos de adulto, el 92% fueron de sangre periférica y el 8% fueron de médula ósea. Este grupo de pacientes es la "cohorte de flora de paciente".

También se analizó un segundo grupo de 309 pacientes adultos. La tabla 1 describe las enfermedades primarias de esta cohorte, así como el tipo de aloinjerto recibido y el régimen de acondicionamiento.

Tabla 1: Cáncer y estado de tratamiento de la población de 309 pacientes adultos

LMA	112	36%	Ablativo	174	56%
SMD	49	16%	Intensidad reducida	105	34%
LNH	39	13%	No ablativo	30	10%
mieloma	36	12%			
LLA	25	8%	Injerto		
T-LNH	14	5%	TCD	149	48%
LLC/LLCP	10	3%	PBSC/BM no modificadas	87	28%
NMP	9	3%	Cordón	73	24%
Hodgkin	9	3%			
LMC	6	2%	Media de edad (intervalo)	53,4 (21 - 75)	

- 30 Se generó un censo de las especies bacterianas en cada muestra de heces mediante qPCR de la secuenciación exhaustiva de ARNr 16S tal como se describió previamente (Jenq *et al.*, Biol Bone Marrow Transplant 21:1373-1383 2015). Brevemente, para cada muestra de heces, se purificó ADN usando una técnica de extracción con fenol-cloroformo con perturbación mecánica (agitación con perlas) basándose en un protocolo previamente descrito. Las muestras de la cohorte de flora de paciente se analizaron usando la plataforma 454 GS FLX Titanium (454 Life Sciences, Branford, CT) para secuenciar la región V1-V3 del gen de ARNr 16S bacteriano.
- 35 Se compilieron los datos de secuencia y se procesaron usando Mothur versión 1.34, se cribaron y se filtraron por calidad, y luego se clasificaron a nivel de especie usando una forma modificada de la base de datos de referencia

Greengenes. Se cuantificó la diversidad microbiana usando el índice inverso de Simpson y el índice de diversidad de Shannon de unidades taxonómicas operativas con una similitud del 97%. Se realizaron comparaciones de abundancia taxonómica para identificar biomarcadores de recidiva de cáncer tras el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico usando análisis de tamaño de efecto del análisis discriminador lineal, usando un valor de corte de análisis discriminador lineal logarítmico de 2,0 tal como se describe en el artículo original de los desarrolladores.

Se usó el área bajo la curva de abundancia bacteriana a lo largo del tiempo como medida de la exposición acumulada de cada paciente a cada taxón bacteriano. Se evaluaron los taxones bacterianos de cada paciente presentes a una frecuencia >1% para determinar su asociación con el desenlace de recidiva o progresión de la enfermedad dentro del primer año después del alo-HSCT usando análisis discriminador lineal del tamaño de efecto (LEfSe; por ejemplo, Segata *et al.*, Genome Biology, 2011).

Resultados

Se cuantificaron las asociaciones de bacterias con riesgo de recidiva mediante regresión univariante de Cox. De entre los taxones más significativamente asociados con el riesgo de recidiva se encontraron miembros de la flora oral humana incluyendo *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium limosum* y *Actinomyces* (figura 2). Después de estratificar a los pacientes por mediana de abundancia, se halló que aquellos con una mayor abundancia de esta bacteria tenían menos recidiva después del trasplante ($p = 0,0014$). Los pacientes con una mayor abundancia de la bacteria *Parvimonas micra* también tenían menos recidiva después del trasplante (figuras 2, 4A, 4B y 7). *Parvimonas micra* es un coco anaerobio Gram-positivo, "*Peptostreptococci*", una especie oral hallada habitualmente en la placa dental y puede estimular la producción de macrófagos de TNF- α , IL-6 e IL8 y estimula los receptores de NOD2 que están aguas arriba de NF- κ B (Marchesan, Molecular Oral Microbiology 2015, volumen 31, número 3, junio de 2016, páginas 243-258). *Parvimonas micra* también produce una proteína de unión a Fc. *Parvimonas micra* tuvo la mejor correlación con la ausencia de recidiva en pacientes que recibieron injertos no de cordón repletos de células T (figuras 5 y 7) y después acondicionamiento mieloablativo (figura 6). Además, los pacientes con una mayor abundancia de la bacteria *Acidaminococcus intestini* y *Streptococcus anginosus*, respectivamente (figura 7), también tuvieron menores tasas de recidiva. También se identificaron bacterias asociadas con un riesgo aumentado de recidiva, tales como *Enterococcus faecium* ($p = 0,0103$) (figuras 2 y 7). Adicionalmente, determinadas bacterias estaban asociadas con un riesgo reducido de mortalidad relacionada con EICH, por ejemplo, *Akkermansia muciniphila* y *Phascolarctobacterium*, o un riesgo aumentado de mortalidad relacionada con EICH, por ejemplo, *Eubacterium bifforme* y *Dysgonomonas*, tal como se determina mediante regresión univariante de Cox (figura 8).

Se evaluaron estas bacterias como biomarcadores en modelos multivariantes de Cox ajustados para tres factores que estaban asociados con la recidiva en esta cohorte: índice de riesgo de enfermedad refinado (RDRI o DRI, Armand *et al.*, Blood. 5 de junio de 2014;123(23):3664-71), intensidad de acondicionamiento y fuente de injerto (sangre de cordón frente a donante adulto), y la figura 3 muestra que la abundancia bacteriana predice la recidiva después de realizar estos ajustes.

Streptococcus anginosus predijo la recidiva en un modelo multivariante ajustado para estos tres factores (HR de 0,39, IC del 95% de 0,16-0,96, $p = 0,041$). *Enterococcus faecium* predijo la recidiva en un modelo ajustado para el RDRI y la intensidad de acondicionamiento, pero no lo logró en un modelo adicionalmente ajustado para la fuente de injerto.

Los solicitantes notificaron previamente que una baja diversidad bacteriana está asociada con una supervivencia global disminuida después del alo-HSCT (Taur *et al.*, Blood. 14 de agosto de 2014;124(7):1174-82). La diversidad bacteriana se cuantificó usando el índice de diversidad de Simpson recíproco ($p > 0,1$) después del análisis composicional de muestras de heces de 309 pacientes realizado mediante secuenciación del gen 16S, tal como se describió anteriormente. Sorprendentemente, en los presentes estudios, los solicitantes no encontraron ninguna asociación entre la diversidad bacteriana y la recidiva de cáncer (figura 1).

Por tanto, los resultados de este análisis retrospectivo han identificado una asociación entre la recidiva después del alo-HSCT y la abundancia de determinadas especies bacterianas o UTO en la flora intestinal. Por consiguiente, estos datos demuestran que la detección de tales especies o UTO puede usarse para evaluar si un paciente que se ha sometido a tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, con HSCT, tiene un riesgo aumentado de recidiva de cáncer.

EJEMPLO 2: La abundancia de *Acidaminococcus intestini* en la flora intestinal de un paciente con cáncer está asociada con un riesgo reducido de recidiva de cáncer

Métodos

Se recogieron semanalmente 2.391 muestras fecales de 613 pacientes adultos con cáncer que recibieron un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico (alo-HSCT) a lo largo de tres semanas y se analizaron tal como se describió en el ejemplo 1 para determinar los niveles de bacterias presentes en las muestras. En este ejemplo, se secuenció la región V4-V5 del gen de ARNr 16S bacteriano. Se recogieron muestras a partir del día 0-21

después del alo-HSCT. Se excluyeron del estudio 147 pacientes de tal manera que se analizó una cohorte final de 466 pacientes. En la tabla 2 se proporcionan las características de la cohorte de 466 pacientes. La cohorte presentó una tasa de recidiva de cáncer del 26% en el plazo de 36 meses después del alo-HSCT (figura 9).

Tabla 2: Cáncer y estado de tratamiento de la población de 466 pacientes adultos

Enfermedad			Acondicionamiento		
LMA	175	38%	Ablativo	266	57%
SMD	75	16%	Intensidad reducida	156	34%
LNH	53	11%	No ablativo	44	9%
mieloma	50	11%			
LLA	40	9%	Injerto		
T-LNH	20	4%	Agotado de células T	229	49%
LLC/LLCP	14	3%	PBSC/BM no modificadas	148	32%
Hodgkin	13	3%	Cordón	89	19%
LMC	11	2%			
NMP	10	2%	Media de edad (intervalo)	54 (22 - 75)	
Otro	5	1%			
Índice de riesgo de enfermedad					
Duración del seguimiento			Bajo	55	12%
mediana de 436 días (14,5 meses)			Intermedio	299	64%
intervalo: 9 - 2.132 días			Alto	112	24%

5 Resultados

Los datos de estos experimentos respaldan adicionalmente el descubrimiento de que, aunque la diversidad de flora intestinal predice la supervivencia global después del alo-HSCT, no predice la recidiva. Se usó el área bajo la curva de abundancia bacteriana a lo largo del tiempo como medida de la exposición acumulada de cada paciente a cada taxón bacteriano. Se identificaron 2.018 unidades taxonómicas operativas (UTO) en todas las muestras. Sólo se consideraron las UTO presentes a una abundancia $>0,01\%$ en $>10\%$ de los pacientes (figura 10). Se dividieron los pacientes en los conjuntos de descubrimiento y de validación ($n = 232$ y $n = 234$) con una misma distribución de acontecimientos de recidiva. Se evaluaron las AUC de abundancia para 194 UTO para determinar asociaciones con la recidiva en el conjunto de descubrimiento usando modelos de regresión de Cox (figura 11). Se seleccionó sistemáticamente un umbral de corte de $3,4 \times 10^{-5}$ en el conjunto de descubrimiento para minimizar el valor de p (Camp, Clin Cancer Res 2004), que luego se aplicó al conjunto de validación. Este valor de corte dio como resultado que aproximadamente el 85% tenían una baja abundancia de las bacterias (que se correlacionó con la recidiva) y el 15% tenían una alta abundancia (que se correlacionó con ausencia de recidiva). Se identificó que la abundancia de *Acidaminococcus intestini* estaba asociada con menos recidiva en los conjuntos tanto de descubrimiento como de validación (figuras 12A y 12B).

Se evaluó *Acidaminococcus intestini* como biomarcador en modelos multivariantes de Cox ajustados para tres factores que estaban asociados con la recidiva en esta cohorte: índice de riesgo de enfermedad refinado (RDRI, Armand *et al.*, Blood 2014), intensidad de acondicionamiento y fuente de injerto. *Acidaminococcus intestini* predijo la recidiva en un modelo multivariante ajustado para el RDRI (figura 13). Además, la asociación de *Acidaminococcus intestini* con menos recidiva estaba asociada principalmente con trasplantes repletos de células T (figuras 14A y 14B). Por consiguiente, la presencia de *Acidaminococcus intestini* puede usarse en la selección de un tratamiento apropiado para un paciente. Por ejemplo, los pacientes que tienen un alto nivel de *Acidaminococcus intestini* presentes en su flora intestinal tienen un riesgo reducido de recidiva cuando se tratan con un trasplante repleto de

células T. De este modo, los pacientes con niveles aumentados de *Acidaminococcus intestini* presentes en su flora intestinal son candidatos para el tratamiento con un trasplante repleto de células T (en lugar de otras formas de trasplante, tales como un trasplante agotado de células T).

- 5 Adicionalmente, microbiota intestinal diversa también estaba asociada con la recidiva y la mortalidad relacionada con EICH (figuras 15A y 15B). En particular, *Enterococcus* estaba asociada con la mortalidad relacionada con EICH y la recidiva (figura 16), *Acidaminococcus* estaba asociada con la mortalidad relacionada con EICH y la ausencia de recidiva (figuras 16 y 17) y *Blautia* estaba asociada con la recidiva y la ausencia de mortalidad relacionada con EICH (figura 16).

- 10 EJEMPLO 3: La abundancia de una agrupación de bacterias incluyendo *Eubacterium limosum* en la flora intestinal de pacientes con cáncer está asociada con una progresión reducida de la enfermedad y un riesgo reducido de recidiva de cáncer

Métodos

- 15 Se recogieron muestras fecales de 541 pacientes adultos con cáncer que recibieron un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico (alo-HSCT) y se secuenciaron usando secuenciación ribosómica de 16S. Los pacientes se inscribieron de manera prospectiva en un protocolo de recogida de biomuestras fecales. Cada paciente tuvo una muestra secuenciada recogida en el plazo de los primeros 21 días tras el alo-HSCT. En la tabla 3 se describen las características de la cohorte de 541 pacientes. Hubo 138 acontecimientos de recidiva/POD (incidencia del 25,5%) durante el periodo de análisis de dos años.

- 20 Se incluyeron pacientes que habían recibido previamente un trasplante de células madre autólogo. Se excluyeron pacientes con indicaciones no malignas y aquellos con enfermedades raras no clasificables por el índice de riesgo de enfermedad refinado (Armand *et al.*, Blood 2014; 123:3664-71). En la tabla 4 se detallan los pacientes excluidos. Se clasificaron los regímenes de acondicionamiento por intensidad de mieloablación (Bacigalupo *et al.*, Biol Blood Marrow Transplant 2009; 15:1628-33).

Tabla 3: Cáncer y estado de tratamiento de la población de 541 pacientes adultos

N = 541	
Enfermedad - n.º (%)	
LMA	195 (36,0)
SMD	85 (15,7)
LNH	68 (12,6)
Mieloma múltiple	61 (11,3)
LLA	44 (8,1)
Neoplasias malignas de células T	24 (4,4)
LLC	16 (3,0)
Hodgkin	15 (2,8)
LMC	12 (2,2)
NMP	12 (2,2)
LMMC	8 (1,5)
SMD/NMP	1 (0,2)
Intensidad de acondicionamiento - n.º (%)	
Mieloablativo	317 (58,6)

Intensidad reducida	162 (29,9)
No mieloablativo	62 (11,5)
Fuente de injerto - n.º (%)	
PBSC/BM no modificadas	172 (31,8)
Cordón	95 (17,6)
Agotado de células T	274 (50,6)
RDRI - n.º (%)	
Bajo	63 (11,6)
Intermedio	353 (65,2)
Alto	125 (23,1)
Edad - años	
Media (DE)	53,8 (12,1)
Intervalo	19 - 75
Sexo masculino - n.º (%)	323 (59,7)
Media de seguimiento - meses (DE)	21,5 (16,6)

Tabla 4: Flujo de participantes.

N	
877	pacientes adultos admitidos en el centro de trasplantes para un primer alo-HCT durante el periodo de estudio (29/08//2009 - 14/05/2015)
562	pacientes con muestras evaluables que se recogieron durante el periodo de muestreo (3 semanas tras el HCT) cuya elegibilidad se sometió a evaluación
Excluidos	
-4	indicaciones no malignas
-11	otras indicaciones malignas raras (5 leucemias bifenotípicas agudas, 6 neoplasias de células dendríticas plasmotoides blásticas)
-1	paciente con dos indicaciones malignas concurrentes durante el trasplante (LLC y SMD)
-1	paciente en el que no podía evaluarse el desenlace primario de tiempo hasta la recidiva/POD ya que el paciente no estaba en remisión en el momento del HCT y falleció de enfermedad persistente en el plazo de 30 días del HCT
-4	recidiva o muerte por cualquier causa antes del día 21 de referencia
541	Cohorte de análisis

La primera muestra de heces se recogió el 29 de agosto de 2009. Para este estudio se consideraron pacientes

consecutivos con muestras evaluables recogidas hasta el 14 de mayo de 2015. Se obtuvieron datos clínicos a partir de una base de datos de investigación clínica institucional. Se analizó el desenlace primario entre junio de 2015 y octubre de 2015 mediante una revisión manual de registros médicos electrónicos. Para los pacientes que habían transferido su atención fuera del centro de trasplantes en el plazo de dos años de seguimiento, los desenlaces se evaluaron mediante entrevistas telefónicas con los médicos responsables de los pacientes. No hubo datos faltantes para las variables notificadas en el presente documento.

Durante el periodo de estudio, se admitieron 877 adultos en el centro de trasplantes para un primer alo-HCT. De éstos, 562 pacientes (64,1%) tenían muestras de microbiota de heces evaluables que se recogieron durante el periodo de muestreo, que se definió como las tres semanas tras el alo-HCT. Las muestras posteriores al trasplante fueron el foco de este ejemplo porque se creía que el periodo de tiempo durante el cual los injertos se expusieron a la microbiota facilitaría la detección de factores asociados con GVT. La duración del periodo de muestreo se seleccionó debido a una uniformidad relativa de las muestras disponibles hasta las tres semanas después del trasplante. Se evaluó la elegibilidad de estos 562 pacientes. Tal como se detalla en la tabla 4, se excluyeron 21 pacientes. Por consiguiente, la cohorte de análisis consistió en 541 pacientes.

Las muestras de heces se almacenaron congeladas sin aditivos. Se extrajo ADN de 2.303 muestras de heces de los 541 pacientes (media de 4,3 por paciente). Se amplificó la región variable V4-V5 de ARN ribosómico 16S genómico y se secuenció en la plataforma Illumina MiSeq tal como se describió previamente. (Jenq *et al.*, Biol Blood Marrow Transplant 2015; 21:1373-83; Taur *et al.*, Blood 2014; 124:1174-82). De las 2.303 muestras de heces, se recogieron 1.186 muestras durante el periodo de muestreo de tres semanas inmediatamente tras el alo-HCT, y se recogieron 648 muestras adicionales durante la semana previa o la semana posterior al periodo de muestreo (periodos "flanqueantes"). Se usaron los datos de secuencia de estas 1.834 muestras (media de 3,4 por paciente) para calcular la abundancia bacteriana promedio ponderada en el tiempo (figuras 18A y 18B). En la tabla 5 se detallan los números de muestras recogidas durante cada periodo de tiempo.

Tabla 5: Número de muestras recogidas en cada periodo de tiempo

Periodo de muestreo	Día de trasplante	N.º de muestras	N.º de pacientes con ≥ 1 muestra dentro del periodo (%)	Media de muestras por paciente
Periodo de muestreo de tres semanas	≤ 0 y ≤ 21	1186	541 (100%)	2,2
Periodos flanqueantes de una semana	≤ -7 y < 0 , o > 21 y ≤ 28	648	420 (77,6%)	1,5
Periodos de muestreo + flanqueantes	≤ -7 y ≤ 28	1834	541 (100%)	3,4
Muestra única previa al trasplante	≤ -21 y ≤ 0	469	469 (86,7%)	1,0
Muestras totales	≤ -21 y ≤ 28	2303	541 (100%)	4,3

Las secuencias filtradas por calidad con una identidad $>97\%$ se agruparon en UTO (véase Edgar, Nature Methods 2013; 10:996-8) que se clasificaron a nivel de especie con respecto a la base de datos de secuencias de ARN ribosómico 16S del NCBI (versión emitida el 4 de diciembre de 2015). (Véase Tatusova *et al.*, About Prokaryotic Genome Processing and Tools. The NCBI Handbook [Internet]. 2ª ed: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (EE.UU.); 2014). Se calcularon las abundancias promedio ponderadas en el tiempo de las UTO para cada paciente usando el método trapezoidal (figura 18A), usando parámetros similares a los descritos previamente (Falcão *et al.*, Gynecol Oncol 2005; 97:529-34; Oudard *et al.*, J Clin Oncol 2004; 22:9579). Para 420 (77,6%) de los pacientes, había disponible al menos una muestra adicional de la semana previa y/o la semana posterior al periodo de muestreo (es decir, 647 muestras flanqueantes). Para estos pacientes, se usaron muestras flanqueantes para interpolar vectores de abundancia a los límites del periodo de muestreo (figura 18B). En el análisis previo al trasplante de muestras individuales, cuando había disponible más de una muestra por paciente, se seleccionó la muestra recogida más próxima al día -10 para su análisis. Durante todo el estudio, la abundancia se refiere a los promedios ponderados en el tiempo logarítmicamente transformados a lo largo del periodo de muestreo posterior al trasplante de tres semanas, excepto tal como se indica en el análisis de muestras previas al trasplante individuales. Se analizó la presencia o ausencia de características de microbiota como variable binaria, con un valor de corte de cualquier abundancia > 0 .

Se construyó un árbol filogenético para derivar agrupaciones de UTO relacionadas (UTOcr). El árbol filogenético se construyó usando el algoritmo FastTree (véase Price *et al.*, Mol Biol Evol 2009; 26:1641-50) en el paquete de software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (véase Caporaso *et al.*, Nat Methods 2010; 7:335-6) a partir de una alineación de secuencias de las 3.952 (96,4% de las 4.100 en total) UTO en el conjunto de datos que se alinearon con éxito. Se agruparon juntos miembros de los mismos filos, lo que indica que el árbol era ampliamente concordante con la taxonomía convencional.

El árbol resultante contenía 3.951 nodos, cada uno de los cuales representa una agrupación de UTO relacionadas (es decir, una UTOcr). Se calculó la abundancia de cada UTOcr como la suma de las abundancias de sus UTO miembros. Posibles ventajas de este enfoque con respecto a la taxonomía convencional pueden incluir: (1) clasificación de bacterias mejorada, ya que la similitud de secuencia de ARNr 16S puede ser una mejor medida de proximidad evolutiva que los rasgos fenotípicos; y (2) resolución más fina de las agrupaciones bacterianas que niveles taxonómicos convencionales tales como el orden, la familia y el género.

Análisis estadístico

El desenlace primario estudiado fue el tiempo hasta la recidiva o progresión de la enfermedad (POD) mediante criterios específicos de la enfermedad. La detección de enfermedad mínima residual se puntuó como acontecimiento de recidiva/POD cuando se realizó una acción clínica basándose en los resultados de citometría de flujo, radiográficos o moleculares mediante el inicio de la terapia, la infusión de linfocitos de donante o la suspensión de inmunodepresión.

La causa de muerte después del alo-HCT se asignó según criterios uniformes. (Véase Copelan *et al.* Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13:1469-76). Durante todo el estudio, se aplicó un análisis de referencia para considerar el tiempo hasta el acontecimiento partiendo desde el final del periodo de muestreo de microbiota; los pacientes con un desenlace antes del día 21 de referencia se excluyeron del análisis de ese desenlace. Se realizaron análisis estadísticos usando el software R. (Véase R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena, Australia: R Foundation for Statistical Computing; 2015).

La cohorte de 541 pacientes se dividió temporalmente en los conjuntos de descubrimiento (n = 271) y de validación (n = 270) cronológicamente en la mediana de la fecha del trasplante, el 13 de febrero de 2013. Se ha considerado que la validación temporal es el modo más riguroso de dividir un conjunto de datos de un único centro para el análisis de biomarcadores. (Véase Altman *et al.*, BMJ 2009; 338:b605). En el conjunto de descubrimiento hubo 85 acontecimientos de recidiva/POD (31,3%) y en el conjunto de validación hubo 63 acontecimientos de recidiva/POD (incidencia del 23,3%). Se evaluaron las características de microbiota que cumplieron un criterio de filtrado de abundancia de >0,01% en >10% de los pacientes en el conjunto de descubrimiento para determinar su asociación con la recidiva/POD usando modelos de regresión multivariantes de riesgos instantáneos proporcionales de Cox específicos de la causa. Los modelos multivariantes se ajustaron para el RDRI, la intensidad de acondicionamiento y la fuente de injerto. Se usaron modelos de regresión multivariantes de riesgos instantáneos proporcionales de Cox específicos de la causa para evaluar las asociaciones entre la microbiota y los desenlaces.

Se calculó la probabilidad de concordancia específica de la causa en presencia de riesgos competitivos usando el paquete R "pec". (Véase Wolbers *et al.*, Biostatistics (Oxford, Inglaterra) 2014; 15:526-39). Se determinaron los incidentes acumulados de recidiva/POD, mortalidad relacionada con el trasplante y EICH usando el método de riesgos competitivos. El riesgo competitivo considerado para la recidiva/POD fue la muerte sin recidiva/POD. El riesgo competitivo para la mortalidad relacionada con el trasplante fue la recidiva. Los riesgos competitivos para EICH fueron la recidiva y la muerte sin EICH. Se censuraron los pacientes vivos después de dos años de seguimiento. Se dibujaron curvas de tiempo frente a acontecimiento usando funciones de incidencia acumulada de riesgos competitivos. Se evaluó la significación estadística usando riesgos instantáneos proporcionales específicos de la causa excepto cuando se indicara de otro modo. No se realizaron ajustes para pruebas múltiples. Se realizaron tres pruebas en el conjunto de validación (mejor UTOcr, siguiente mejor UTOcr y mejor UTO individual).

Resultados

Los grupos de bacterias relacionadas (UTOcr) empíricamente definidos tuvieron asociaciones más fuertes con desenlaces clínicos que las unidades taxonómicas operativas (UTO) que representan especies individuales. La presencia de una UTOcr que estaba compuesta principalmente por *Eubacterium limosum* estaba asociada con menos recidiva en un modelo multivariante (HR de 0,54, IC de 0,38 - 0,78, p = 0,001). Esta asociación fue la más clara entre receptores de aloinjertos repletos de células T.

Estos datos indican que la presencia de una UTOcr puede usarse para evaluar el riesgo de recidiva de cáncer en un sujeto que recibe un HSCT, en el que la presencia de altos niveles de UTOcr 1614 y/o 1790 en una muestra de microbiota intestinal del sujeto indica que el sujeto tiene un riesgo reducido de recidiva. Además, la información puede usarse como parte de un método para seleccionar una terapia de HSCT apropiada para un sujeto. Por ejemplo, la presencia de *E. limosum* o una UTOcr que comprende *E. limosum* (por ejemplo, UTOcr 1614) indica que el paciente que recibe o se espera que reciba un HSCT tendría un menor riesgo de recidiva de cáncer si recibiera un aloinjerto repleto de células T.

Características de microbiota

La diversidad microbiana intestinal, tal como se evalúa por el índice inverso de Simpson, no estaba asociada con el tiempo hasta la recidiva/POD ($p = 0,16$) (véase la figura 19), según observaciones previas. (Véase Taur *et al.*, Blood 2014; 124:1174-82).

- 5 Para evaluar si subconjuntos de bacterias particulares pueden estar asociados con el tiempo hasta la recidiva/POD, se definieron UTOcr para evaluar las asociaciones con desenlaces clínicos. Para agrupar UTO por distancias evolutivas, se construyó empíricamente un árbol filogenético a partir de una alineación de secuencias de todas las UTO identificadas en la cohorte completa, tal como se describió anteriormente. El análisis se limitó a taxones que superaban un umbral de abundancia de $\geq 0,01\%$ en $\geq 10\%$ de los pacientes.

10 Asociación de microbiota con el tiempo hasta la recidiva/POD en el conjunto de descubrimiento

- Se evaluaron las asociaciones entre la abundancia y el tiempo hasta la recidiva/POD en el conjunto de descubrimiento para las 208 UTO y 1.343 UTOcr. La figura 21 proporciona las 10 UTOcr que tenían los valores de p multivariantes más bajos. Para cada UTOcr, se enumeran las especies más abundantes, así como especies raras que diferencian una UTOcr de una UTOcr vecina. Los números entre corchetes indican el número de UTO en las especies denominadas asociadas con una UTOcr particular. Luego se ajustaron los modelos multivariantes para el RDRI, la intensidad de acondicionamiento y la fuente de injerto. Se usó un criterio de $p \leq 0,01$ en modelos de Cox o bien univariantes (figuras 20A y 20C) o bien multivariantes (figuras 20B y 20D) para identificar fuertes candidatos asociados con el tiempo hasta la recidiva/POD. El candidato más estrechamente asociado con el riesgo de recidiva/POD en el conjunto de descubrimiento fue UTOcr 1614 (HR multivariante de 0,84, IC de 0,73-0,96, $p = 0,01$), una agrupación que estaba compuesta principalmente por *Eubacterium limosum* así como otras especies relacionadas (figura 21).

Por consiguiente, en algunas descripciones, se evalúan uno o más miembros de UTOcr 1614, por ejemplo, *E. limosum*.

Validación

- 25 Se evaluó la mejor UTOcr candidata identificada en el conjunto de descubrimiento para determinar la reproducibilidad de su asociación con el desenlace en el conjunto de validación. La abundancia de UTOcr 1614 estaba significativamente asociada con un riesgo reducido de recidiva/POD en el conjunto de validación (HR = 0,82, IC de 0,71 - 0,95, $p = 0,009$, figura 22C). Esta asociación permaneció significativa después del ajuste multivariante para la intensidad de acondicionamiento, la fuente de injerto y el RDRI (HR = 0,82, IC = 0,70-0,96, $p = 0,01$, figura 22C).

- Se estratificaron los pacientes en los conjuntos de descubrimiento y de validación según la presencia o ausencia de UTOcr 1614. La presencia se definió como cualquier cantidad detectable (es decir, cualquier abundancia > 0). La presencia intestinal de UTOcr 1614 estaba asociada con un riesgo reducido de recidiva/POD en los conjuntos tanto de descubrimiento (HR = 0,49, IC = 0,30-0,82, $p = 0,006$) como de validación (HR = 0,52, IC = 0,31-0,87, $p = 0,01$) (figura 23). La incidencia acumulada a los dos años de recidiva/progresión entre pacientes con y sin este grupo de bacterias fue del 33,8% y el 19,8%, respectivamente. Esta asociación permaneció significativa después del ajuste para el RDRI, la fuente de injerto y la intensidad de acondicionamiento tanto en el conjunto de descubrimiento (HR = 0,46, IC = 0,27-0,78, $p = 0,004$, figura 22B) como en el conjunto de validación (HR = 0,54, IC = 0,31-0,92, $p = 0$, figura 22C).

- 40 La composición de UTOcr 1614 (figura 24) incluye 30 UTO (comprendiendo cada amplicón aproximadamente 250 pb), de las cuales 5, 7 y 1 se identificaron respectivamente como *Eubacterium limosum*, *Anaerofustis stercorihominis* y *Pseudoramibacter alactolyticus*, todas las cuales son miembros de la familia *Eubacteriaceae*. Se identificaron 15 UTO adicionales como *Peptococcus niger*, un miembro de la familia relacionada *Peptococcaceae*. En la cohorte completa, la mayor parte (67%) de la abundancia de UTOcr 1614 podía atribuirse a *Eubacterium limosum*, con menores contribuciones por parte de *Anaerofustis stercorihominis* y *Peptococcus niger* (15% cada una) (figura 25). Por tanto, una agrupación de especies que está comprendida predominantemente por *Eubacterium limosum* y otras bacterias relacionadas (es decir, miembros de UTOcr) está asociada con un riesgo disminuido de recidiva/POD.

Capacidad discriminatoria

- 50 Se combinaron los conjuntos de descubrimiento y de validación para análisis exploratorios adicionales. UTOcr 1614 estaba presente en 422 (78%) de los 541 pacientes, con una abundancia media del 0,16% y una abundancia máxima del 8%. Se observó un riesgo progresivamente menor de recidiva/POD en la cohorte cuando se estratificó en cuatro agrupamientos de abundancia ($p = 0,001$, figuras 26A y 26B) y esta asociación permaneció significativa después del ajuste multivariante ($p = 0,004$, figura 22B). La abundancia estaba asociada con menos recidiva/POD de una manera dependiente de la dosis (figura 26A).

Tal como se muestra en la tabla 6, el examen de las características clínicas de pacientes según la presencia o

ausencia de UTOcr 1614 no demostró diferencias significativas en el tipo de enfermedad, la intensidad de acondicionamiento ni la fuente de injerto.

Tabla 6. Características de pacientes basándose en la presencia de UTOcr 1614

	Ausente N= 119	Presente N = 422
Enfermedad - n.º (%)		
LMA	47 (39,5)	148 (35,1)
SMD	23 (19,3)	62 (14,7)
LNH	12 (10,1)	56 (13,3)
Otro	37 (31,1)	156 (37,0)
Intensidad de acondicionamiento - n.º (%)		
Mieloablatoivo	74 (62,2)	243 (57,6)
Intensidad reducida	33 (27,7)	129 (30,6)
No mieloablatoivo	12 (10,1)	50 (11,8)
Fuente de injerto - n.º (%)		
Adulto	40 (33,6)	132 (31,3)
Cordón	19 (16,0)	76 (18,0)
Agotado de células T	60 (50,4)	214 (50,7)
RDRI - n.º (%)		
Bajo	9 (7,6)	54 (12,8)
Intermedio	72 (60,5)	281 (66,6)
Alto	38 (31,9)	87 (20,6)
Edad media - años (DE)	51,6 (13,1)	54,4 (11,8)

- 5 Hubo un predominio moderado de puntuaciones de RDRI de mayor riesgo en pacientes con ausencia de UTOcr 1614 intestinal ($p = 0,02$), y la asociación permaneció significativa ajustando para el RDRI en un modelo multivariante ($HR = 0,54$, $IC = 0,38-0,78$, $p < 0,001$, figuras 22A-C). Los pacientes con presencia de UTOcr 1614 tenían una edad ligeramente más avanzada (media de 54,4 años en comparación con 51,7 años, $p = 0,04$). Se evaluó la asociación entre UTOcr 1614 y el riesgo de recidiva/POD dentro de cada una de las tres categorías de RDRI. La presencia intestinal de UTOcr 1614 estaba asociada con menos riesgo de recidiva/POD entre los
- 10 pacientes con RDRI alto ($HR = 0,45$, $IC = 0,25-0,81$, $p = 0,008$) y los pacientes con RDRI intermedio ($HR = 0,52$, $IC = 0,33-0,83$, $p = 0,006$) (figura 27). Sin embargo, no hubo ninguna asociación entre los pacientes con RDRI bajo ($HR = 2,16$, $IC = 0,28-16,95$, $p = 0,46$).

- 15 Para evaluar la capacidad discriminadora de UTOcr 1614 en relación con factores de riesgo clínicos conocidos de recidiva/POD, se usó un índice de concordancia (índice C) en el que un valor más próximo a 1 indica una mayor precisión (figura 28). (Véase Wolbers *et al.*, *Biostatistics*, 2014; 15:526-39). La capacidad discriminadora de UTOcr 1614 (índice C = 0,572) fue comparable al RDRI (índice C = 0,569). La combinación de UTOcr 1614, RDRI, fuente de injerto e intensidad de acondicionamiento produjo una potencia discriminadora moderadamente más fuerte (índice C = 0,650) que los tres factores clínicos solos (índice C = 0,619). Este grado de potencia predictiva es
- 20 comparable a modelos establecidos para otros desenlaces después del alo-HCT (véase Sorror *et al.*, *J Clin Oncol* 2014; 32:3249-56) e indica que un biomarcador de microbiota intestinal puede sumarse a las evaluaciones de riesgo

clínico actualmente conocidas de recidiva/POD.

Parámetros de trasplante y otros desenlaces

La presencia intestinal de UTOcr 1614 estaba asociada con un aumento en la supervivencia global (HR = 0,65, IC = 0,47-0,90, $p = 0,008$, figura 29) y una incidencia acumulada disminuida de recidiva/POD (figura 29). La UTOcr no estaba significativamente asociada con EICH aguda (grado 2-4, HR = 0,81, IC = 0,56-1,17, $p = 0,27$) ni con la mortalidad relacionada con el trasplante (HR = 1,0, IC = 0,63-1,59, $p = 0,99$, figura 29). A la luz de la heterogeneidad de la población en estudio, la asociación de UTOcr 1614 con la recidiva/POD en los subconjuntos de pacientes según la fuente de injerto, la intensidad de acondicionamiento, el grado de coincidencia con HLA, el RDRI y el tipo de enfermedad (figura 30).

Con respecto al tipo de enfermedad, la asociación de UTOcr 1614 con un riesgo reducido de recidiva/POD fue significativa entre los pacientes con LMA (HR = 0,56, IC = 0,32-0,96, $p = 0,04$) y mieloma múltiple (HR = 0,29, IC = 0,12-0,67, $p = 0,004$) y no estadísticamente significativa para otros tipos de enfermedad. Para la fuente de injerto (figuras 29 y 30), la asociación de UTOcr 1614 con un riesgo reducido de recidiva/POD fue significativa en receptores de trasplantes repletos de células T (HR = 0,40, IC = 0,24-0,65, $p < 0,001$), particularmente entre receptores de injertos de PBSC/BM no modificadas (HR = 0,40, IC = 0,23-0,69, $p = 0,001$). Tampoco se observó ninguna asociación significativa en receptores de injertos agotados de células T (HR = 0,66, IC = 0,39-1,11, $p = 0,12$) ni en receptores de injertos de cordón (HR = 0,38, IC = 0,11-1,32, $p = 0,13$, figura 29).

Muestras previas al trasplante

Tal como se demostró anteriormente, un biomarcador de riesgo de recidiva es útil para evaluar y tratar a pacientes tratados con HSCT. Un biomarcador de este tipo tiene una utilidad adicional si proporciona información sobre el riesgo de recidiva antes del trasplante, por ejemplo, como parte de un procedimiento de toma de decisiones sobre el régimen de tratamiento que va a usarse para un paciente. De entre los 172 receptores de injertos de PBSC/BM no modificadas (repletos de células T) en los que la asociación de UTOcr 1614 fue la más clara, 143 pacientes (83%) también tenían una muestra recogida en las tres semanas previas a la infusión de células madre. Estos pacientes se estratificaron en cuatro agrupamientos basándose en la abundancia de UTOcr 1614 en una única muestra de heces recogida durante las tres semanas anteriores al alo-HCT. Si estaba disponible más de una muestra a partir de las tres semanas anteriores al alo-HCT, se seleccionó la muestra recogida más próxima al día -10 para su análisis. Los pacientes en el agrupamiento de abundancia más alto tenían un menor riesgo de recidiva/POD en comparación con los tres grupos de menor abundancia combinados (HR = 0,28, IC = 0,10-0,80, $p = 0,02$, figura 32). También se observó una asociación similar, aunque estadísticamente menos significativa, entre un riesgo disminuido de recidiva/POD y UTOcr 1614 en muestras previas al trasplante en los 469 receptores de todos los tipos de fuentes de injerto que tenían disponibles muestras previas al trasplante (figura 33, HR = 0,63, IC = 0,40-1,09, $p = 0,06$). Por tanto, la presencia intestinal de UTOcr 1614 o un subconjunto de organismos UTOcr 1614, ya sea antes o después del alo-HCT, puede usarse como biomarcador de riesgo de recidiva/POD posterior al trasplante. La figura 34 muestra los límites de categoría para los agrupamientos de abundancia usados durante todo el estudio, tal como representan las figuras 26B, 26C, 32 y 33.

Discusión

En este estudio monocéntrico observacional retrospectivo, se estudió la composición de microbiota intestinal para la cohorte más grande de pacientes sometidos a alo-HCT reunida para este tipo de análisis hasta la fecha. Se usó un enfoque de descubrimiento-validación para identificar una asociación (figura 23) entre la abundancia de un subconjunto particular de bacterias intestinales y un riesgo disminuido de recidiva/POD después del alo-HCT.

La asociación de este biomarcador con un menor riesgo de recidiva/POD fue la más fuerte entre los receptores de injertos que contenían células T y otros linfocitos maduros (figura 30). En estos pacientes puede haber un mayor papel para la actividad GVT mediada por células de donante en comparación con receptores de injertos agotados de células T, lo que sugiere que la composición de la microbiota intestinal puede estar modulando la actividad GVT.

El grupo de bacterias intestinales asociadas con la actividad GVT está compuesto principalmente por *Eubacterium limosum*, un bacilo Gram-positivo no formador de esporas anaerobio que es un miembro común de la microbiota intestinal humana. (Véase Rajilic-Stojanovic *et al.*, FEMS Microbiol Rev 2014; 38:996-1047).

Además, la consideración de exposiciones microbianas acumuladas como promedios ponderados en el tiempo de abundancia permitió la inclusión de muchas más muestras por paciente con el fin de reducir posiblemente los sesgos que podrían producirse al tomar muestras únicamente en puntos de tiempo individuales. Adicionalmente, la derivación empírica de UTOcr combinó las abundancias de UTO evolutivamente relacionadas tal como se determina por la similitud de secuencia de 16S (tabla 5). Una limitación de un análisis a nivel de UTO tradicional es que, algunas veces, la fuerza de asociación de una única especie se distribuye entre múltiples UTO. Por otro lado, en un análisis de niveles taxonómicos más altos, tales como género o familia, pueden perderse posibles asociaciones cuando se agrupan juntas decenas o cientos de UTO. La UTOcr identificada en este ejemplo contiene principalmente miembros de la familia *Eubacteriaceae* (figura 24) con menores contribuciones de otras familias, pero no incluía ninguna de las otras 15 especies de la familia *Eubacteriaceae* que estaban presentes en el conjunto de

datos. De hecho, cuando se agruparon UTO en clasificaciones taxonómicas convencionales, ni el género *Eubacterium* en su conjunto ni la familia *Eubacteriaceae* tuvieron una asociación significativa con la recidiva/POD. Cabe destacar que la principal UTO que representa *Eubacterium limosum* estaba asociada con menos riesgo de recidiva. Esto ilustra la utilidad de agrupar UTO en grupos filogenéticos empíricamente derivados en el estudio de asociaciones entre la microbiota y los desenlaces clínicos. Además, estos datos muestran que la similitud de secuencia de ARNr 16S puede ser una mejor medida de proximidad evolutiva que los rasgos fenotípicos.

EJEMPLO 4: Métodos para reducir la recidiva de cáncer en un modelo animal mediante la administración de una composición que comprende bacterias terapéuticas

En los ejemplos 1-3 se describe una asociación entre determinados miembros de la microbiota intestinal con riesgo disminuido de recidiva después de un trasplante de células hematopoyéticas alogénico (por ejemplo, cuando están presentes células T en el injerto). El presente ejemplo describe un método para determinar que dichas bacterias en la flora intestinal pueden aumentar la actividad injerto frente a tumor (GVT) e injerto frente a leucemia (GVL). En un modelo de este tipo, GVT o GVL también se aumentarán mediante antibióticos y mediante la reintroducción de dichas bacterias, por ejemplo, *Eubacterium limosum* y/o *Parvimonas micra*, en la microbiota intestinal.

Métodos

1. Efecto del tratamiento con antibióticos sobre la actividad GVT en un modelo de ratón

En un modelo de GVT, después de inyectar en ratones células tumorales que expresan luciferasa y médula ósea (BM) incompatible agotada de células T con o sin células T, puede monitorizarse en serie la carga tumoral mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia. Se inyectarán derivados del linfoma de células B de ratón A20 y el linfoma de células T de ratón EL4 que portan un constructo de expresión de luciferasa en ratones por vía intravenosa en diluciones en serie limitantes para definir la dosis que es mortal para el 50% de los animales en 2-4 semanas. Luego, a los ratones se les inyectará esta concentración de células junto con médula ósea (BM) incompatible agotada de células T con o sin células T, y luego se tratarán con antibióticos según uno de los dos regímenes diferentes (descontaminación digestiva de amplio espectro o un espectro definido). Tras el tratamiento con antibióticos, se someterá a ensayo GVT mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*, análisis de supervivencia e histología. La flora intestinal de los ratones se manipulará de dos maneras diferentes. La primera es descontaminación digestiva de amplio espectro con vancomicina y ampicilina orales. La segunda será alterar la composición de la flora empleando fármacos con espectros definidos. Dado que tanto *Eubacterium limosum* como *Parvimonas micra* son anaerobias, se comparará el efecto de aztreonam (que carece de actividad anaerobia) con imipenem (que tiene una potente actividad anaerobia).

Por tanto, el presente experimento determinará si la presencia de *Eubacterium limosum* y *Parvimonas micra* puede reducir la presencia tumoral en el modelo de ratón de GVT.

2. Efecto de *Eubacterium limosum* y *Parvimonas micra* intestinales sobre la actividad GVT

Una desventaja de los modelos experimentales convencionales es que la correlación clínica de líneas celulares tumorales está limitada por diferencias clave entre ellas y reacciones GVT en los pacientes. Como alternativa, se desarrolló un modelo experimental de injerto frente a leucemia (GVL) para leucemia mielógena aguda (LMA) relacionada con leucemia de linaje mixto (LLM). Los reordenamientos que implican al gen de LLM son particularmente relevantes para estudios de trasplante, ya que son muy prevalentes en LMA relacionada con la terapia, conllevan un mal pronóstico clínico y son una indicación para el trasplante alogénico. (DiMartino *et al.*, British Journal of Haematology 106, 614-626 (1999)). Tras el tratamiento con antibióticos de descontaminación digestiva, se inducirá LMA mediante la inyección en ratones de células de médula ósea que expresan GFP transfectadas de manera retroviral con un constructo de fusión LLM-AF9 que recapitula una translocación de LLM común (Stubbs *et al.*, Leukemia 22, 66-77 (2007); y Krivtsov *et al.*, Nature 442, 818-822 (2006)), seguido de un trasplante incompatible de BM agotada de células T con o sin células T. Este modelo de leucemia secundaria de alto riesgo utiliza una leucemia recién generada con un defecto genético definido y refleja la enfermedad clínica más fielmente que las líneas celulares tumorales sometidas a pases *in vitro*. La progresión tumoral se monitorizará mediante el desenlace del trasplante y la fluorescencia de GFP, lo que indica una leucemia en sangre periférica, bazo y médula.

A continuación, se tratarán ratones C57BL/6 que portan linfomas derivados de líneas celulares (para el análisis de GVT) o LMA inducida por LLM-AF9 (para el análisis de GVL) con vancomicina y ampicilina orales, luego se colonizarán a través de alimentación por sonda gástrica con bacterias y, por último, se les trasplantarán médula ósea B10.BR con CMH dispar y células T. En primer lugar, se usarán cepas disponibles comercialmente de *Eubacterium limosum* y *Parvimonas micra*. Los desenlaces que se evaluarán en los ratones incluyen carga tumoral mediante bioluminiscencia para tumores que expresan luciferasa o citometría de flujo para leucemia que expresa GFP, supervivencia e histología tisular en los días 14 y 21.

Por tanto, el presente experimento determinará si la presencia de *Eubacterium limosum* y *Parvimonas micra* puede reducir la presencia tumoral en el modelo de ratón de GVT y GVL.

En todos los estudios con ratones anteriores del presente ejemplo, los experimentos incluirán 10 ratones por grupo y se repetirán al menos dos veces. Se usarán métodos de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia global en estudios de trasplante en ratones, y una prueba de rangos logarítmicos basada en permutación comparará la supervivencia entre los grupos de tratamiento. Para cada experimento, un total de 10 ratones por grupo proporcionarán una potencia del 80% para detectar un parámetro de probabilidad de 5.

Lista de secuencias

<110> Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR RIESGO DE RECIDIVA DE CÁNCER

<130> 072734.0414

<150> Documento 62/214.604

<151> 04-09-2015

<150> Documento 62/265.327

<151> 09-12-2015

<150> Documento 62/298.258

<151> 22-02-2016

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1484

<212> ADN

<213> *Eubacterium limosum*

<400> 1

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggtatgc ttaacacatg caagtcgaac	60
gagaagggttt tgatggatcc ttcgggtgac attagaactg gaaagtggcg aacgggtgag	120
taacgcgtgg gtaacctgcc ctatggaaag gaatagcctc gggaaactgg gagtaaagcc	180
ttatattatg gttttgtcgc atggcaagat catgaaaact ccggtgccat aggatggacc	240
cgcgtcccat tagctagtgt gtgagataac agcccaccaa ggcgacgatg ggtaaccggt	300
ctgagagggc gaacggtcac actggaactg agacacggtc cagactccta cgggaggcag	360
cagtggggaa tattgcgcaa tgggggcaac cctgacgcag caataccgcg tgagtgaaga	420
aggttttcgg atcgtaaagc tctgttattg gggagaaga atgacggtag ccaatgagga	480
agtcccggt aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggggacaag cgttgtccgg	540
aatgactggg cgtaaagggc gcgtaggcgg tctattaagt ctgatgtgaa aggtaccggc	600
tcaaccggtg aagtgcattg gaaactggta gacttgagta ttggagaggc aagtggaatt	660
cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt aggaggaaca ccagtggcga aggcggcttg	720
ctggacaaat actgacgtg aggtgcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct	780
ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgcta ggtgttgggg aaactcagt cgcagttaa	840
cacaataagc attccgcctg gggagtacga ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg	900
gggacccgca caagcagcgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc	960
aggtcttgac atcctctgac gagcctagag ataggaagtt tccttcggga acagagagac	1020
aggtgggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga	1080
gcgcaacccc tgcctttagt tgccagcatt aagttgggca ctctagaggg actgcgtag	1140
acaatacggg ggaagggtgg gacgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac	1200
acacgtgcta caatggtctg aacagagggc cgcgaagccg cgaggtgaag caaatccctt	1260
aaaacagatc ccagttcgga ttgcaggctg caactcgcct gcatgaagtt ggagttgcta	1320
gtaatcgcg atcagaatgc cgcggtgaat gcgttcccgg gtcttgtaga caccgcccgt	1380
cacaccacga gagttggcaa caccgaagc ctgtgagaga accgcaagga ctcagcagtc	1440
gaagggtggg ctagtaattg ggggtgaagtc gtaacaagggt aacc	1484

<210> 2

<211> 1393

<212> ADN

<213> *Peptococcus niger*

<400> 2

gcctaataca tgcaagtcga acggacgagg aaagagacct cttcggagtg acctttcccg	60
agttagtggc ggatgggtga gtaacgcgtg agtgacctgc ccagcagtg ggaataacag	120
tgagaaatca ttgctaatac cgcataatctt acaagtgtt catggtacct gtaagaaaga	180
cggccttcgt gctgtcgtg ttggatggac tcgcgtctga ttagccagtt ggtggggtaa	240
cggcctacca aagcaatgat cagtagccgg cctgagaggg tgaacggcca cattgggact	300
gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga atcttcgcga atgggcgcaa	360
gcctgacgga gcaatgccgc gtgagtgaag aaggccttcg ggttgtaaaa ctctgtcctc	420
atccaagaga ggggaaggta gtaactgacc tttccaggac ggtagatgag gaggaagccc	480
cggctaacta tgtgccagca gccgcggtaa aacatagggg gcaagcgttg tccggaatca	540
ctgggcgtaa agggcgcgca ggcggtctgt taagtcagat gtgaaagggtt agggctcaac	600
cctgaacgtg catctgatac tggcagactt gagtatggaa gaggtaagtg gaattcctag	660
tgtagcgggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt ggcgaaggcg acttactggg	720
ccataactga cgctgaggcg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag	780
tccacgcgt aaacgatggg tactaggtgt cggaggtttc aagaccgtcg gtgccgcagt	840
taacacaata agtaccgccg ctggggagta cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg	900
acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gacgcaacgc gaagaacctt	960
accaagactt gacatcctgc tgccgagtga tgtaatgtca cttttccttc gggacagcag	1020
agacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga	1080
acgagcgcaa cccttgtcgt cagttgccat cattaagttg ggcactctga cgagactgcc	1140
gcagacaatg cggaggaagg tggggatgac gtcaaatacat catgcccctt atgtcttggg	1200
ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaga gggcagcgaa ggagcgatcc ggagccaatc	1260
tcacaaagcc gatcccagtt cggattgcag gctgcaactc gcctgcatga agtcggaatg	1320
cgtagtaatc gcaggtcagc atactgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacacgcg	1380
ccgtcacacc acg	1393

<210> 3

<211> 1462

<212> ADN

<213> *Anaerofustis stercorihominis*

<400> 3

tggcggcgtg cttaacacat gcaagtcgaa cgagaaactt ataatgata cttcgggtga	60
atctataagc ggacagtggc gaacgggtga gtaacgcgta ggtaaccaac ctcatgcagg	120
gggatagccc agggaaactt ggattaaacc cgcataagac cacagcaccg catggtgcag	180
gggtaaaaac tccggtggca tgagacggac ctgcgtctta ttaggtagtt ggtgaggtaa	240
cggctcacca agccaacgat gagtagccga cctgagaggg tgatcggcca cattgggact	300
gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcgca atgggggaaa	360
ccctgacgca gcaacgccgc gtgagcgatg aaggttttcg gatcgtaaag ctctgtcttt	420
ggggaagata atgacggtac ccaaggagga agctccggct aactacgtgc cagcagccgc	480
ggtaatacgt agggagcaag cgttgtccgg attcactggg cgtaaagagc acgtaggcgg	540
ttaattaagt caggtgtgaa agttttcggc tcaaccggaa aagtgcactt gaaactggat	600
aaattgagta tcggagaggt aagcggaatt cctagtgtag cggtgaaatg cgtagagatt	660
aggaagaaca ccggtggcga aggcggotta ctggacgata actgacgctg aggtgcgaaa	720
gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatacta	780
ggtgttgggg taactcagt cgcagttaa cacattaagt attccgcctg gggagtacgc	840
tcgcaagagt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcagcgg agcatgtggt	900
ttaattcgaa gcaacgcgaa gaacottacc aggtcttgac atcccttgac cgctaagag	960
attaggcttt ccttcgggac aaggagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg	1020
tgagatgttg ggtaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tgtttagtta ctaacattca	1080
gttgaggact ctagacagac tgcccttgaa agagggagga aggtggggac gacgtcaa	1140
catcatgccc cttacgacct gggctacaca cgtgctacaa tggctctgtac agagggttgc	1200
gaagcagtga tgctaagcta atctcaaaaa gcagatctca gttcggattg caggctgcaa	1260
ctcgcctgca tgaagtcgga gttgctagta atcgcgaatc agaattgtcg ggtgaatgcg	1320
ttcccgggcc ttgtacacac cgcctgtcac accacgagag ttggtaaacac ccgaagccag	1380
tgagctaacc attaggaggc agctgtcgaa ggtgggatca gtaattgggg tgaagtcgta	1440
acaaggtagc cgtatcggaa gg	1462

<210> 4

<211> 1510

<212> ADN

<213> *Saccharofermentans acetigenes*

<400> 4

ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcctaac acatgcaagt cgagcggaga	60
tgagaagagt acttgtaacg atttcacctt agcggcggac gggtgagtaa tgcgtgagga	120
acctgccttt cactggggaa taacatcgag aaatcggcgc taataccgca taaagtcgcg	180
agatcgcatg gttttgacgac caaaggagca atccggtgaa agatggactc acgtccgatt	240
aggtagttgg tgaggtaacg gccacccaag cctacgatcg gtagccgaac tgagaggttg	300
atcggccaca ttgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat	360
attgggcaat gggcgaaagc ctgaccacgc aacgcgcgt gaaggaagaa ggtcttcgga	420
ttgtaaactt ctttgatcag ggacgaaaga aatgacggta cctgaagaac aagccacggc	480
taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttatccg gatttactgg	540
gtgtaaaggg cgtgtaggcg gttctgcaag tcagatgtga aattcccggg ctttaaccgg	600
gcgctgcatc tgaaactgca ggacttgagt actggagagg atagtggaaat tcctagtgtg	660
gcggtaaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggcta tctggacagt	720
aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca	780
cgccgtaaac gatgaatact aggtgtaggg ggtatcgact cccctgtgc cgacgctaac	840
gcaataagta ttccacctgg ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg	900
gggcccgcac aagcagtgga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca	960
ggacttgaca tcccttgacc ggcatagaga tatgcctttc cttcgggaca aggagagcag	1020
gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc	1080
gcaaccctta ttgccagttg ccatcattca gttgggaact ctggcgatac tgccgtggac	1140
aacacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcacatgcc ccttatgtcc tgggctacac	1200
acgtaataca atggcaacga cagagggcag ctactccgcg aggacaagcg aatccctaaa	1260
cgttgtctca gttcggattg caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga attgctagta	1320
atggcaggtc agcatactgc cgtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac	1380
accatgagag tctgcaatac ccgaagtcag tagtctaacc gcaaggggga cgctgccgaa	1440
ggtagggccg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtatcggaa ggtgcggctg	1500
gatcacctcc	1510

<210> 5

<211> 1438

<212> ADN

<213> *Armatimonas rosea*

<400> 5

gacgaacgct gcggcgtgcc taagaaatgc aagtcgaacg gacagtggct tcggttactg	60
ttagtggcga acggtcgcgt aacacgtaag aaacctgcct cgaagcgggg gacaacagtc	120
cgaaggact gctaataccg catgtggcca gtcgggggca tccccgattg tctaaagatt	180
tatcaacttcg agatggtcct gcggcctatc agctagttagg tggggtaacg gcctaccaag	240
gcgacgacgg gtagctggtc tgagaggacg atcagccgga ttgggactga gatacggccc	300
agactcctac gggggggcagc aattaggaat cttgcacaat gggcgaaagc ctgatgcagc	360
gacgccgcgt gaaggatgaa ggttctcgga tcgtaaactt cttttaagtg ggaagaaatt	420
tgacgggtacc acttgaataa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta	480
ggggggcgagc gttgtccgaa gttactgggc gtaaagcgcg cgtaggcggg ttcttaagtc	540
tggggtgaaa ggttcaacgc tcaacgtgaa cagtgccttg gatactggga gacttgagtt	600
agggagaggg tagtagaatt cctggtgtag cggtgaaatg cgtagatatc aggaggaata	660
ccaatggcga aggcagctac ctggcctata actgacgctg aggtgcgaaa gcgtggggag	720
caaacgggat tagatacccc ggtagtcac gccctaaacg atgagtgcta gatgtaagag	780
gtatcgaccc ctcttgtgtc gtcgctaacg cattaagcac tccgcctggg gagtacggcc	840
gcaagggtga aactcaaagg aattgacggg ggccgcaca agcggtgagg catgtggatt	900
aattcgtcac taaccgaaga accttaccga gggttgacat cctaggaacc ctgatgaaag	960
ttgggggtgc tcgcaagaga gcctagagac aggtgttgca tggctgtcgt cagctcgtgt	1020
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct caccgtatgt tggcagcgta	1080
aagtcggcaa ctcttacgga actgcccggt caagcgggag gaagggtggg atgacgtcaa	1140
gtcggcatgg cccttacgcc tggggcttca cacatgctac aatgggtggc aacaaagggc	1200
tgctaaaccg tgaggtcaag caaatcccaa aaatccatcc tcagttcgga ttgtaggctg	1260
caactcgctt acatgaagcc ggaatcgcta gtaaccgcag gtcagctaaa ctgcggtgaa	1320
tacgttcccc ggcttgtac acaccgcccg tcaagtcacc tgaattgtct gcacccgaag	1380
ccggtggcca aactcgcaag agatggagcc gtctaagggtg tggggagtaa gggggact	1438

<210> 6

<211> 1480

<212> ADN

<213> *Pseudoramibacter alactolyticus*

<400> 6

ES 2 943 714 T3

taagtcaaaa agaacagttt gatcatgggt caggacgaac gctggcggta tgcttaaac	60
atgcaagtgc aacgagaagt tttttattga ccttcggggg atataagaga cagacagtgg	120
cgaacgggtg agtaacgcgt gggcaacctt cctatcggag cgggatagcc tcgagaaatc	180
gggagtaaaa ccgcataaca cagcagaatc gcatgacttt gctgtcaaaa ctccggtgcc	240
gatagatggg cccgcgtctg attagctagt tggtaaggta agggcttacc aaggcaacga	300
tcagtagccg gtctgagagg gcgacggcc aactggaac tgagacacgg tccagactcc	360
tacgggaggc agcagtgggg aatattgcgc aatgggggca accctgacgc agcaataccg	420
cgtgagtga gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttat tggggaagaa gcagtgcgg	480
taccaatga ggaagtcccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggggac	540
gagcgttgtc cggaatcact gggcgtaaa ggcgcgtagg cggttttata agtcagatgt	600
gaaaggtagc ggctcaaccg gtgacgtgca tttgaaactg taagacttga gtactgaaga	660
ggcaagcggg attcctagtg tagcgggtgaa atgcgtagat attaggaaga acaccgggtg	720
cgaaggcggc ttgctgggca gatactgacg ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcgaacag	780
gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgaata ctaggtgttg gcgaataagt	840
cagtgccgga gttaacacaa taagtattcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac	900
tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc agcggagcat gtggtttaat tcgaagcaac	960
gcgaagaacc ttaccaggcc ttgacatcct ctgagcgcaa tagagatatt gctttccctt	1020
cggagacaga gagacagggt gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt	1080
taagtccgc aacgagcgca acccctgtca ttagttgcca tcattgagtt gggcactcta	1140
atgagactgc cgtagacaat acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgccctt	1200
tatggcctgg gctacacacg tgctacaatg gtctgaacaa agggaagcga aggagcgatt	1260
cggagcgaat ctcataaaac agatcccagt tcggattgca ggctgcaact cgctgcatg	1320
aagatggagt tgctagtaat cgcggatcag aatgtcgcgg tgaatgcgtt cccgggtctt	1380
gtacacaccg cccgtcacac cagcagagtc ggtaacaccc gaagccagtg agacaaccgg	1440
aaggagtcag ctgtcgaagg tgggatcggt aattgggggtg	1480

<210> 7

<211> 1483

<212> ADN

<213> *Finegoldia magna*

<400> 7

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
gggatttagt agacagaagc ttcggtggaa gattactaat gagagtggcg aacgggtgag      120
taacgcgtga gcaacctgcc tatgacagtg ggatagcctc gggaaaccgg gattaatacc      180
gcataaaatc gtagaaacac atgttttaac ggtcaaagat ttatcgggtca tagatgggct      240
cgcgtctgat tagctagttg gtgagataac agcccaccaa ggcgacgatc agtagccggt      300
ctgagaggat gaacggccac attggaactg agacacggtc caaactccta cgggaggcag      360
cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcgcgc tgaacgaaga      420
aggtattcgt atcgtaaagt tctgtcctat gggaagataa tgacagtacc atagaagaaa      480
gctccggcta aatacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg tggagcgagc gttgtccgga      540
attattgggc gtaaagggtg cgcaggcggg ttaataagtc gaatgttaaa gatcggggct      600
caaccccgta aagcattgga aactgataaa cttgagtagt ggagaggaaa gtggaattcc      660
tagtgtagtg gtgaaatacg tagatattag gaggaatacc agtagcgaag gcgactttct      720
ggacacaaac tgacgctgag gtacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg      780
tagtccacgc cgtaaacgat gaatgctagg tgttgggggt caaacctcgg tgccgaagtt      840
aacacattaa gcattccgcc tggggagtag gcacgcaagt gtgaaactca aaggaattga      900
cggggacccg cacaagcagc ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta      960
ccaggggttg acatgtgggt gaaaggtata gagatatacc cctctcttta tgagacatcc     1020
atacaggttg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca     1080
acgagcgcaa cccctatact tagttaccag cgagtaaagt cggggactct aagtagactg     1140
ccgatgacaa atcggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgccct ttatgtcctg     1200
ggctacacac gtgctacaat ggttggtaga gagggagct ataatgtgat ataattgcaa     1260
actccaaagc caatcccagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggagt     1320
tgctagtaat cgcggatcag aatgtcgcgg tgaatgcgtt cccgggtctt gtacacaccg     1380
cccgtcacac catgggagtt gataataccc gaagcctgtg acctaatga ggagcagtcg     1440
aaggtaggat tgatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta acc                        1483

```

<210> 8

<211> 1362

<212> ADN

<213> *Murdochiella asaccharolytica*

<220>

<221> misc_feature

<222> (643) .. (643)

<223> n e s a, c, g o t

<400> 8

aacgagaatg tactgacgga tccttagggg gaagatagta caggacagtg gcggatgggt	60
gagtaacgcg taagaaacct gcctttcaca ccgggatagc agctggaaac ggctattaat	120
accggatgac actttttccc cgcattgagga agaggttaaa gaatttcggg gaaagatggg	180
cttgcgctctg attagctagt tgggtgggga acggcctacc aaggcgacga tcagtagccg	240
gcctgagagg gtgtacggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggg	300
agcagtgggg aattttgcac aatggaggaa actctgatgc agcgacgccg cgtgaacgaa	360
gaaggtcttc ggattgtaaa gttctgtcct ggggtgaagat aatgacggta actcaggagg	420
aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggggcga gcgttggtcg	480
gaattattgg gcgtaaaggg tacgtaggcg gtttggttaag tttggcgta aatcacgggg	540
ctcaaccccg ttcagcggtg aaaactggca aacttgagta gtagagggga cagtggaatt	600
cctagtgtag cgggtgaaatg cgtagagatt aggaagaata ccngtggcga aggcgactgt	660
ctggatacat actgacgctc aggtacgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct	720
ggtagtccac gccctaaacg atgagtgtca ggtgtcgggt gtcaaagctc ggtgccgccg	780
ttaacacatt aagcactccg cctggggagt acgcacgcaa gtgtgaaact caaatgaatt	840
gacggagacc cgcacaagta gcggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct	900
taccagggct tgacataaca gtgacgggtt aagagattaa ccgttcctt cggggacact	960
gctacagggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc	1020
aacgagcgca acccttgctg ttagttgcca gcattgagtt ggggactcta gcgagactgc	1080
cggtgataaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatac tcatgccctt tatgtcctgg	1140
gctacacacg tgctacaatg gccgaaaaca gcgtgaagca acctcgtgag agcaagcgaa	1200
ccacgaaaag tcggtctcag ttccgactgt aggctgcaac tcgcctacac gaagtcggag	1260
ttactagtaa tcgcgaatca gcatgtcgcg gtgaatgcgt tcccgggtct tgtacacacc	1320
gcccgtcaca ccatggaagt tggtaatacc cgaagccgct ga	1362

<210> 9

<211> 1489

<212> ADN

<213> *Levyella massiliensis*

<400> 9

tagagtttga tcttggtca ggataaacgc tggcggcgtg cgtaacacat gcaagtcgaa	60
cgagaatgtg ctgacggatc cttaggggtga agatagcaca ggacagtggc ggatgggtga	120
gtaacgcgta agaaacctgc ctttcacacc gggatagcag ctggaaacgg ctattaatac	180
cggatgacac tttttccccg catgaggaag aggttaaaga atttcggtga aagatggtct	240
tgcgtctgat tagctagttg gtggggtaac ggcctaccaa ggcgacgatc agtagccggc	300
ctgagaggggt gtacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggagggcag	360
cagtggggaa ttttgcacaa tggaggaaac tctgatgcag cgacgccgcg tgaacgaaga	420
aggtcttcgg attgtaaagt tctgtcctgg gtgaagataa tgacggtaac tcaggaggaa	480
gccccggota actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcgagc gttgttcgga	540
attattgggc gtaaagggtg cgtaggcgggt ttgttaagtt tggcgttaa tccacggggct	600
caaccccggt cagcgttgaa aactggcaaa cttgagtagt agaggggaca gtggaattcc	660
tagtgtagcg gtgaaatgcg tagagattag gaagaatacc ggtggcgaag gcgactgtct	720
ggatacatat tgacgctcag gtacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg	780
tagtccacgc cctaaacgat gagtgcctagg tgcgggtgt caaagcccg tgcgcgcgtt	840
aacacattaa gcaactccgc tggggagtag gcacgcaagt gtgaaactca aaggaattga	900
cggggacccg cacaagtagc ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta	960
ccagggtctg acataacagt gacgggttaa gagattaacc gttcccttcg gggacactgc	1020
tacagggtgt gcatggttgt cgtcagctcg tgcctgaga tgttggtta agtcccga	1080
cgagcgcaac ccttgctggt agttgccagc attaagttgg ggactctagc gagactgccg	1140
gtgataaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccttta tgtcctgggc	1200
tacacacgtg ctacaatggc cgaaaacagc gtgaagcaac ctctgagag caagcgaacc	1260
acgaaaagtc ggtctcagtt cggactgtag gctgcaactc gcctacacga agtcggagtt	1320
actagtaatc gcgaatcagc atgtcgcgggt gaatgcgttc ccgggtcttg tacacaccgc	1380
ccgtcacacc atggaagttg gtaatacccg aagccgctga gcgaacctat gacgcaggcg	1440
tcgaaggtag gatcaatgac tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgta	1489

<210> 10

<211> 1357

<212> ADN

<213> *Gallicola barnesae*

<220>

<221> misc_feature

<222> (20) .. (20)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (55) .. (55)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (493) .. (496)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (888) .. (895)

<223> n es a, c, g o t

<400> 10

cgaacgctgg cggcgtgatn aaaacatgca agtcgaacga tcacccttcc atttntctat	60
tccgagagat tgaggagcgg gttaggggag aggggttgaa taacgtgtga gccaccctgt	120
ctaaacaagg ggatagcctc gggactccgg gatttattcc gtatgagacc ccgccttccc	180
atgtagaaga ggttcaaaga ttttatcggg ttaagatggg ctgcgcgtctg attagctagt	240
tggtgagata aaagcccacc aagtcaacga tcagtaaccg gcttgagaga gtgaacggtc	300
acattggaca ctgagacacg gtccaaactc ctccaggagg cagcagtgagg gaatattgca	360
caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgagcga tgaaggaatt cgtttcgtaa	420
agctctgtcc taggggaaga taatgacagt acccttgagg gaagccccgg ctaaatacgt	480
gcgcagcagc cgnnnnttac gtatggggcg agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaagg	540
gtacgtaggc ggtttcataa gtcagatgta aaagcgtggg gctcaacccc ataaagcatt	600
tgaaactgtg gaacttgagt agtggagagg aaagtggaaat tcctagtgtg gcggtgaaat	660
gcgtagatat taggaggaat accagtggcg aaggcgactt tctggacaca aactgacgct	720
gaggtacgaa agcatgggga gcacacagga ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac	780

ES 2 943 714 T3

gatgaatgct aggtgtcggg ggtcaaacct cggtgccgca gttaacacag taagcattcc	840
gcctggggag tacggtggca aactgaaac tcaatggatc aaatgaannn nnnnnngccc	900
gcgcaagcag cggagcatgt ggtttatttc gatgcaacgc gaagaacctt accaggactt	960
gacatataga tgaaagatct agagatagat ccctctcttc ggagacagct atacagggtg	1020
tgcattggttgc tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcac	1080
cccctatagc tagttaccag cacttcgggt ggggactcta gttagactgc cgatgataaa	1140
tccggaggaag gtgggggatga cgtcaaatac tcatgccctt tatgtcctgg gctacacacg	1200
tgtctacaatg gtcgggtacag agggcagcga gactgtgaag ttaagcgaat ctacagaaagc	1260
cgaacccagc tcggattgca ggcttgcaac tcgcctgcat gaagtcggag ttggtagtaa	1320
tcgcagatca gaatgctgcg gtgaatgctt gccgctc	1357

<210> 11

<211> 1438

<212> ADN

<213> *Eubacterium brachy*

<400> 11

gatgaacgct ggccggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc gagaagtttt gaaaagattc	60
ttcggatgaa atttaaaatg gaaagcggcg gacgggtgag taacgcgtag gcaaccatac	120
aaagggatag catttggaac cgaatattaa taccttatga aacttaacta gtgcatgcta	180
ggtaggtcaa agatttatcg gtatgggatg ggccctgcgc tgactgccct tagctagttg	240
gtgaggtaac ggctcaccaa ggcgacgac agtagccgac ctgagagggg gaacggccac	300
attggaactg agacacggtc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa	360
tgggggaaac cctgatgcag caacgccgcg tgaacgatga aggcctttgg gtcgtaaagt	420
tctgttctag gtgatgaaaa ctgacagtaa cctaggagaa agccccggct aactccgtgc	480
cagcagccgc ggtaatactg gagggggcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaaggg	540

tacgtagggtg gccttttaag cgtaggggtat aaggcaatgg ctcaaccatt gttcgcccta	600
tgaactggaa ggcttgagtg caggagagga aagcgggaatt cctagtgtag cggtggaatg	660
catagatatt aggaggaaca tcagcggcga aggcggcttt ctggactgca actgacactg	720
aggtacgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg	780
atgagcacta ggtgtcgggg tcgtaaggct tcggtgccgt agttaacgca ttaagtgtc	840
cgcctgggga gtacgcacgc aagtgtgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag	900
cagcggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgagaacc ttaccaggac ttgacatcct	960
tctgaccggt ctttaatagg acctttcttt tgacagaaga gacaggtggt gcatggttgt	1020
cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgtcatt	1080
agttgccatc attaagttgg gcaactctagt gagactgccg gggacaactc ggaggaaggt	1140
ggggatgacg tcaaactcgc atgcccctta tgttctgggc tacacacgtg ctacaatggc	1200
tggtacaaag agaagcaaga ccgcaagggtg gagcaaagct caaaaaccag ccccgattcg	1260
gattgtaggc tgaaactcgc ctacatgaag tcggagttgc tagtaatcgc agatcagaat	1320
gctgcggtga atgcgttccc gggctttgta cacaccgcc gtcacaccat ggaagttggg	1380
ggcgcccaaa gttggcagat aaatatgcta cctaagggtga aaccaatgac tgggggtga	1438

<210> 12

<211> 1487

<212> ADN

<213> *Parvimonas micra*

<400> 12

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac	60
gtgatttttg tggaattct ttcgggaatg gaaatgaaat gaaagtggcg aacgggtgag	120
taacaogtga gcaacctacc ttacacaggg ggatagccgt tggaaacgac gattaatacc	180
gcatgagacc acagaatcgc atgatatagg ggtcaaagat ttatcggtgt aagaagggct	240
cgcgtctgat tagctagttg gaagggtaaa ggctaccaa ggcgacgatc agtagccggt	300
ctgagaggat gaacggccac attggaactg agacacggtc caaactccta cgggaggcag	360
cagtggggaa tattgcacaa tgggggggaa cctgatgcag cgacgccgcg tgagcgaaga	420
aggttttcga atcgtaaagc tctgtcctat gagaagataa tgacggtatc ataggaggaa	480
gccccggcta aatacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta tggggcgagc gttgtccgga	540
attattgggc gtaaagggtg cgtaggcggg tttttaagtc aggtgtgaaa gcgtgaggct	600

ES 2 943 714 T3

taacctcatt aagcacttga aactggaaga cttgagtga ggagaggaaa gtggaattcc	660
tagtgtagcg gtgaaatgcg tagatattag gaggaatacc ggtggcgaag gcgactttct	720
ggactttttac tgacgctcag gtacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg	780
tagtccacgc cgtaaacgat gaatgctagg tgttgggagt caaatctcgg tgccgaagtt	840
aacacattaa gcattccgcc tggggagtac ggtggcaaca ctgaaactca aaggaattga	900
cggggacccg cacaagcagc ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta	960
ccaaggcttg acatatagtt gagttattga gaaattgata agtccctcgg gacaactata	1020
caggtgggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacgc	1080
agcgcaaccc ttatcttcag ttgccagcac gtagagggtg gaactctgga gagactgccg	1140
atgacaaatc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccttta tgtcttgggc	1200
tacacacgtg ctacaatggt tgggtacaacg agaagcgaga tagagatggt aagcgaaact	1260
ctaaaaacca atctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gtcggagttg	1320
ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatgcgttcc cgggtcttgt acacaccgcc	1380
cgtcacacca tgggagttgg caatacccg aagcccgcat ctaaccgcaa ggaggaaggc	1440
gtcgaaggta ggggttaatga ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtaacc	1487

<210> 13

<211> 1478

<212> ADN

<213> *Streptococcus anginosus*

<400> 13

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtaggac gcacagttta taccgtagct	60
tgctacacca tagactgtga gttgcgaacg ggtgagtaac gcgtaggtaa cctgcctatt	120
agagggggat aactattgga aacgatagct aataccgcat aacagtatgt aacacatggt	180
agatgcttga aagatgcaat tgcctcgcta gtagatggac ctgcgttgta ttagctagta	240
ggtagggtaa tggcctacct aggcgacgat acatagccga cctgagaggg tgatcggcca	300
cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcggca	360
atggggggaa ccctgaccga gcaacgccgc gtgagtgaag aaggttttcg gatcgtaaag	420
ctctgttggt aaggaagaac gagtgtgaga atggaaagtt catactgtga cgggtactta	480
ccagaaaggg acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt cccgagcgtt	540
gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc aggcgggttag aaaagtctga agtgaaaggc	600

```

agtggctcaa ccattgtagg ctttggaac tgtttaactt gagtgcagaa ggggagagtg      660
gaattccatg tgtagcgggtg aaatgcgtag atatatggag gaacaccggt ggcgaaagcg      720
gctctctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat      780
accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaggtgt tgggtccttt ccgggactca      840
gtgccgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc      900
aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc      960
gaagaacctt accaggtctt gacatcccg a tgctatttct agagatagga agtttcttcg     1020
gaacatcgggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta     1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattggt agttgccatc attaagttgg gcactctagc     1140
gagaactgcg gtaataaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta     1200
tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggc tggtaacaac agtcgcaagc cggtgacggc     1260
aagctaattc ctgaaagcca gtctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa     1320
gtcgggaatcg ctagtaatcg cggatcagca cgccgcgggtg aatacgttcc cgggccttgt     1380
acacaccgcc cgtcacacca cgagagtttg taacacccga agtcggtgag gtaaccgtaa     1440
ggagccagcc gcctaagggtg ggatagatga ttgggggtg                               1478

```

<210> 14

<211> 1487

<212> ADN

<213> *Eubacterium biforme*

<220>

<221> misc_feature

<222> (31) .. (31)

<223> n e s a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (120) .. (120)

<223> n e s a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (242) .. (242)

<223> n e s a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature
 <222> (341) .. (342)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (579) .. (579)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (928) .. (929)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (933) .. (933)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (968) .. (968)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1229) .. (1229)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1385) .. (1385)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 14

caaatggaga gtttgatcct ggctcaggat naacgctggc ggcatgccta atacatgcaa	60
gtcgaacgag aggaaggaaa gcttgctttt ctgaatctag tggcgaacggt gtgagtaacn	120
cgtaggtaac ctgcccattgt gcccgggata acttctggaa acggatgcta aaaccggata	180
ggtagcagac aagcatttga ctgctattaa agtggctaag gccatgaaca tggatggacc	240
tncggtgcat tagctagttg gtgaggtaac ggcccaccaa ggcgacgatg catagccggc	300
ctgagagggc ggacggccac attgggactg agacacggcc nnaactccta cgggaggcag	360
cagtagggaa ttttcgtcaa tggggggaac cctgaacgag caatgccgct tgagtgagga	420
aggtcttcgg atcgtaaagc tctgttgtaa gagaaaaacg acattcatag ggaatgatga	480
gtgagtgatg gtatcttacc agaaagtcac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat	540
acgtagggtg cgagcggtat ccggaatgat tgggcgtana ggggtgcgtag gtggcagaac	600
aagtctggag taaaagggtat gggctcaacc cgtactggct ctggaaactg ttcagctaga	660
gaacagaaga ggacggcggg actccatgtg tagcggtaaa atgcgtagat atatggaaga	720
acaccggtgg cgaaggcggc cgtctggtct gttgctgaca ctgaagcacg aaagcgtggg	780
gagcaaatag gattagatac cctagtagtc cacgccgtaa acgatgagaa ctaggtgttg	840
ggggaataac tcagtgcgcg agttaacgca ataagttctc cgccgggga gtatgcacgc	900
aagtgtgaaa ctcaaaggaa ttgacggng ccngcacaag cgggtggagta tgtggtttaa	960
ttcgaagnaa cgcgaagaac cttaccaggc cttgacatcc cttgcagagr tatagagata	1020
tatccgaggt taacaaggag acagggtgtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat	1080
gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttgtgatat gttactaaca ttgagttgag	1140
gactcatatc agactgccgg tgataaaccg gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca	1200
tgccccttat ggccgggct acacacgtnc tacaatggcg tctacaaaga gcggcaagcc	1260
tgtgaaggca agcgaatctc ataaaggacg tctcagttcg gattgaagtc tgcaaccgca	1320
cttcatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttctc	1380
gggcnttgta cacaccgcc gtcaaaccat gggagttggt aatgcccgaa gccgggtggca	1440
taacctttcg aggagtgagc cgtcgaaggc aggaccgatg actgggg	1487

<210> 15

<211> 1439

<212> ADN

<213> *Acidaminococcus intestini*

<400> 15

goggagactt atttcggtaa gttcttagtg gogaacgggt gagtaacgcg tgggcaacct	60
gccctccagt tggggacaac attccgaaag ggatgctaata accgaatgtg ctccctctctc	120
cgcatggagg agggaggaaa gatggcctct gottgcaagc tatcgctgga agatgggccc	180
gcgtctgatt agctagttgg tggggtaacg gtcaccaag gcgatgatca gtagccggtc	240
tgagaggatg aacggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc	300
agtggggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgcccgtg gagtgatgaa	360
ggtcttcgga ttgtaaaact ctgttgtag ggacgaaagc accgtgttcg aacaggatcat	420
ggtgttgacg gtacctaacg aggaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat	480
acgtagggtg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gagcatgtag gcgggctttt	540
aagtctgacg tgaaaatgcg gggcttaacc ccgtatggcg ttggatactg gaagtcttga	600
gtgcaggaga ggaaagggga attcccagtg tagcggtgaa atgcgtagat attgggagga	660
acaccagtgg cgaaggcgcc tttctggact gtgtctgacg ctgagatgcg aaagccaggg	720
tagcaaacgg gattagatac cccggtagtc ctggccgtaa acgatggata ctaggtgtag	780
gaggtatcga ccccttctgt gccggagtta acgcaataag tatcccgccct ggggactacg	840
atcgcaagat tgaaactcaa aggaattgac gggggcccg cacaagcggtg gagtatgtgg	900
tttaattcga cgcaacgcga agaacttac caaggcttga cattgagtga aagacctaga	960
gatagggtccc tcccttcggg gacacgaaaa cagggtggtgc atggctgtcg tcagctcgtg	1020
tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacg agcgcaaccc ctatcctatg ttaccagcgc	1080
gtaatggcgg ggactcatag gagactgcc aaggataactt ggaggaaggc ggggatgacg	1140
tcaagtcac atgcccctta tgtcttgggc tacacacgta ctacaatggt cggcaacaaa	1200
gggcagcgaa accgcgaggt ggagcaaatc ccagaaaccc gacccagtt cggatcgtag	1260
gctgcaaccc gcctacagtg aagttggaat cgctagtaat cgcaggtcag catactgcgg	1320
tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg ccggtcacac cagcaaagtt ggtaacaccc	1380
gaagccgggtg agataacctt ttaggagtc gctgtctaag gtggggccga tgattgggg	1439

<210> 16

<211> 1493

<212> ADN

<213> *Clostridium glycyrrhizinilyticum*

<220>

<221> misc_feature

<222> (207) .. (207)

ES 2 943 714 T3

<223> n es a, c, g o t

<400> 16

agagtttgat cctgggtcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac	60
gaagcacttt accggatttc ttcggaatga aagttttgtg actgagtggc ggacgggtga	120
gtaacgcgtg ggtaacctgc ctcatcacagg gggataacag ttagaaatga ctgctaatac	180
cgcataagac cacaggaccg catggtnccg tggtaaaaac tccggtggta tgagatggac	240
ccgcgtctga ttagctagtt ggtaaggtaa cggcttacca aggcgacgat cagtagccga	300
cctgagaggg tgaccggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca	360
gcagtgggga atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgacgccgc gtgagcgtatg	420
aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc agggaagaat taggacggta cctgactaag	480
aagcacccgc taaatacgtg ccagcagccg cggtaatacg tatggtgcaa gcgttatccg	540
gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gagaggcaag tctgatgtga aaacccgggg	600
ctcaaccccg ggactgcatt ggaaactggt tttctagagt gtcggagagg taagtggaat	660
tcctagtgtg gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt	720
actggacgat gactgacgtt gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc	780
tggtagtcca cgcctgaaac gatgactgct aggtgtcggg aggcgaaagcc tttcggtgcc	840
gcagcaaacg caataagcag tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga aactcaaagg	900
aattgacggg gacccgcaca agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga	960
accttacctg cccttgacat ccggctgacc ggcgagtaat gtcgcctttc cttcgggaca	1020
gccgagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gtcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc	1080
cgcacagagc gcaaccctta tctttagtag ccagcatttc ggatgggcac tctagagaga	1140
ctgccaggga taacctggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatggg	1200
cagggctaca cacgtgctac aatggcgtaa acaaaggag gcaagcctgc gaggggtgagc	1260
aaatcccaaa aataacgtct cagttcggat tgtagtctgc aactcgacta catgaagctg	1320
gaatcgctag taatcgcgaa tcagaatgtc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtagac	1380
accgcccgtc acaccatggg agttggtaac gcccgaaagtc agtgacccaa ccgtaaggag	1440
ggagctgccg aagggtggac cgataactgg ggtgaagtcg taacaaggta acc	1493

<210> 17

<211> 1553

<212> ADN

<213> *Desulfosporosinus lacus*

<400> 17

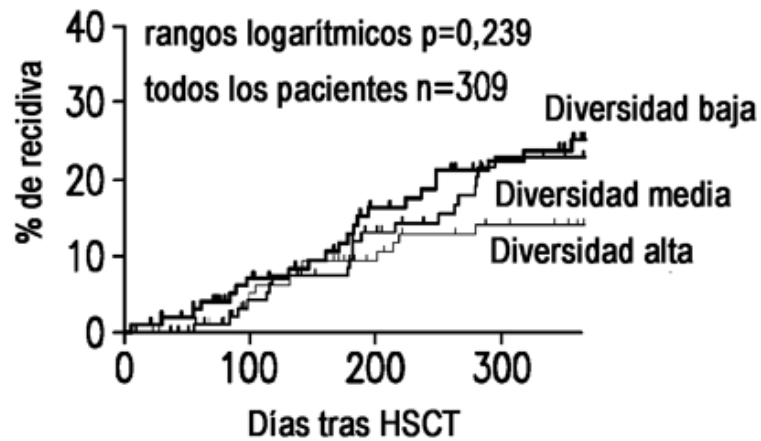
gatcctggct caggacgaac gctggcggcg tgccatacac atgcaagtcg aacggagaat	60
ttcaataagt ttacttagag aagtttttag tggcggacgg gtgagtaacg cgtgggtaac	120
ctaccataa agccgggaca acccttgga aagagggcta ataccgata atctttgatg	180
ttggcatcaa ggtaaagga aaggtggcct ctgaagatgc taccgattat ggatggaccc	240
gcgtctgatt agctagttgg tggggtaaag gcctaccaag gcgacgatca gtagccggcc	300
tgagaggggtg aacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc	360
agtggggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gtatgatgaa	420
ggtcttcgga ttgtaaagta ctgtctttgg ggaagaatga ctgatttgaa aatattgagt	480
cagtatgacg gtacccaagg aggaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat	540
acgtaggggg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gggcgcgtag gccgattttt	600
aagtctggtg tgaaagatca gggctcaacc ctgagagtgc atcggaaact ggagatcttg	660
aggacaggag aggaaagtgg aattccacgt gtagcggtag aatgcgtaga tatgtggagg	720
aacaccagtg gcgaaggcga ctttctggac tgtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg	780
ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacgctgta aacgatgagt gctaggtgta	840
gagggtatcg accccttctg tgccgcagtt aacacaataa gcactccgcc tggggagtac	900
ggccgcaagg ttgaaactca aaggaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg	960
gtttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatccacag aatcctaagg	1020
aaacttggga gtgcccttcg gggagctgtg agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc	1080
gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccctgtgtt tagttgctaa	1140
cgcgtaatgg cgagcactct agacagactg ccggtgataa accggaggaa ggtggggatg	1200
acgtcaaata atcatgcccc ttatgtcttg ggctacacac gtgctacaat ggccggtaca	1260
gacggaagcg aagccgcgag gtgaagccaa tccgagaaag ccggtctcag ttcggattgc	1320
aggctgcaac tcgcctgcat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcaggtca gcatactgcg	1380
gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgaaagt ctgcaacacc	1440
cgaagccggg gaggtaaccc gaaagggagc tagccgtcga aggtggggcc gatgattggg	1500
gtgaagtctg aacaaggtag ccgtatcgga aggtgcggct ggatcacctc ctt	1553

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar un sujeto que tiene riesgo de recidiva de cáncer, que comprende detectar un nivel de una o más bacterias o esporas
 - a) que comprenden una secuencia de ADNr 16S que tiene al menos el 95% de identidad con una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1; o
 - b) que comprenden una secuencia de ADNr 16S expuesta en SEQ ID NO: 1, o comprenden una secuencia de ADNr 16S que tiene aproximadamente el 97% de identidad una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1; o
 - c) que comprenden *Eubacterium limosum*,
- en una muestra de microbiota intestinal obtenida del sujeto;
- comparar el nivel de la una o más bacterias o esporas de las mismas en la muestra de microbiota intestinal del sujeto con el nivel de la una o más bacterias o esporas de las mismas en una muestra de microbiota intestinal de referencia; y
- diagnosticar que el sujeto tiene riesgo de recidiva de cáncer cuando el nivel de la una o más bacterias o esporas de las mismas en la muestra de microbiota intestinal es menor que el nivel de la una o más bacterias o esporas de las mismas en la muestra de microbiota intestinal de referencia.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el sujeto ha tenido un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), en el que el trasplante de células madre hematopoyéticas es opcionalmente un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico (alo-HSCT), y en el que el alo-HSCT es opcionalmente un alo-HSCT repleto de células T.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además recomendar la administración de una terapia contra el cáncer al sujeto al que se le ha diagnosticado que tiene riesgo de recidiva de cáncer,
- en el que la terapia contra el cáncer comprende opcionalmente cirugía; radioterapia; una quimioterapia; una inmunoterapia; una terapia con células madre; una terapia celular; bacterias probióticas, levaduras probióticas, o una combinación de las mismas; un prebiótico; un posbiótico; un antibiótico; o una combinación de los mismos, y opcionalmente, en el que las bacterias probióticas comprenden una o más bacterias o esporas que:
 - a) comprenden una secuencia de ADNr 16S que tiene al menos el 95% de identidad con una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1; o
 - b) comprenden una secuencia de ADNr 16S expuesta en SEQ ID NO: 1, o comprenden una secuencia de ADNr 16S que tiene aproximadamente el 97% de identidad con una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1; o
 - c) comprenden *Eubacterium limosum*.

La diversidad global no predice la recidiva al año

Simpson inverso por puntos de inflexión de terciles



Índice de diversidad de Simpson recíproco, por terciles (intervalo de 1,02-27)

FIG. 1

Algunas bacterias están asociadas con la recidiva;
 otras bacterias están asociadas con la ausencia de recidiva

Asociación de los taxones bacterianos con la recidiva
 mediante regresión univariante de Cox

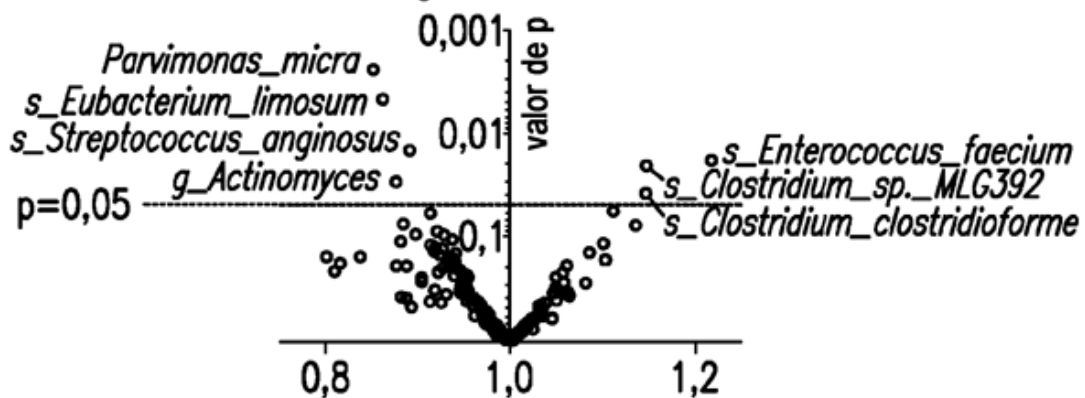
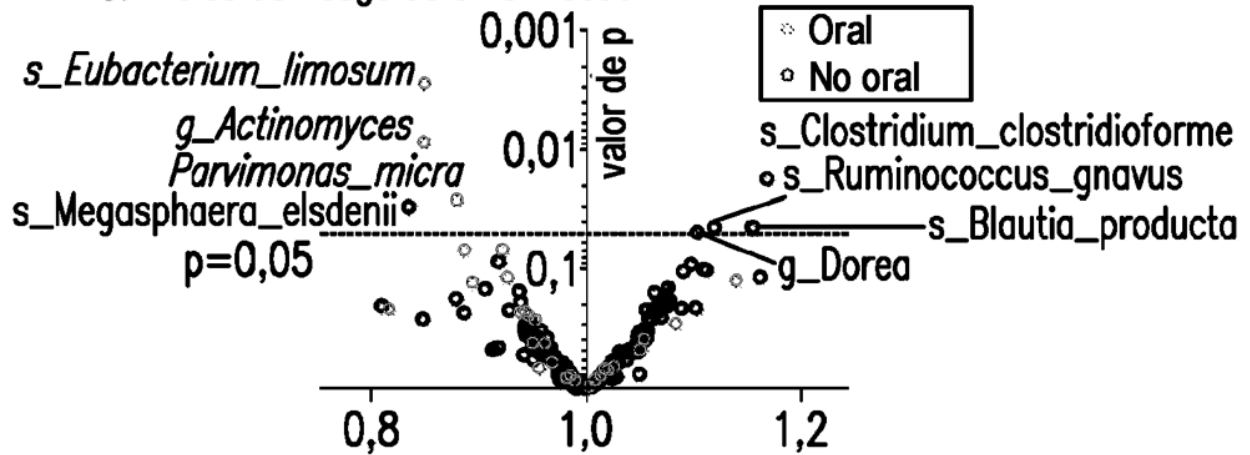


FIG. 2

La abundancia bacteriana predice la recidiva después de ajustes multivariantes para factores de riesgos

Modelo de regresión de Cox ajustado para

1. intensidad de acondicionamiento
2. fuente de injerto (de cordón frente a de adulto no modificado/repleto de células T)
3. índice de riesgo de enfermedad

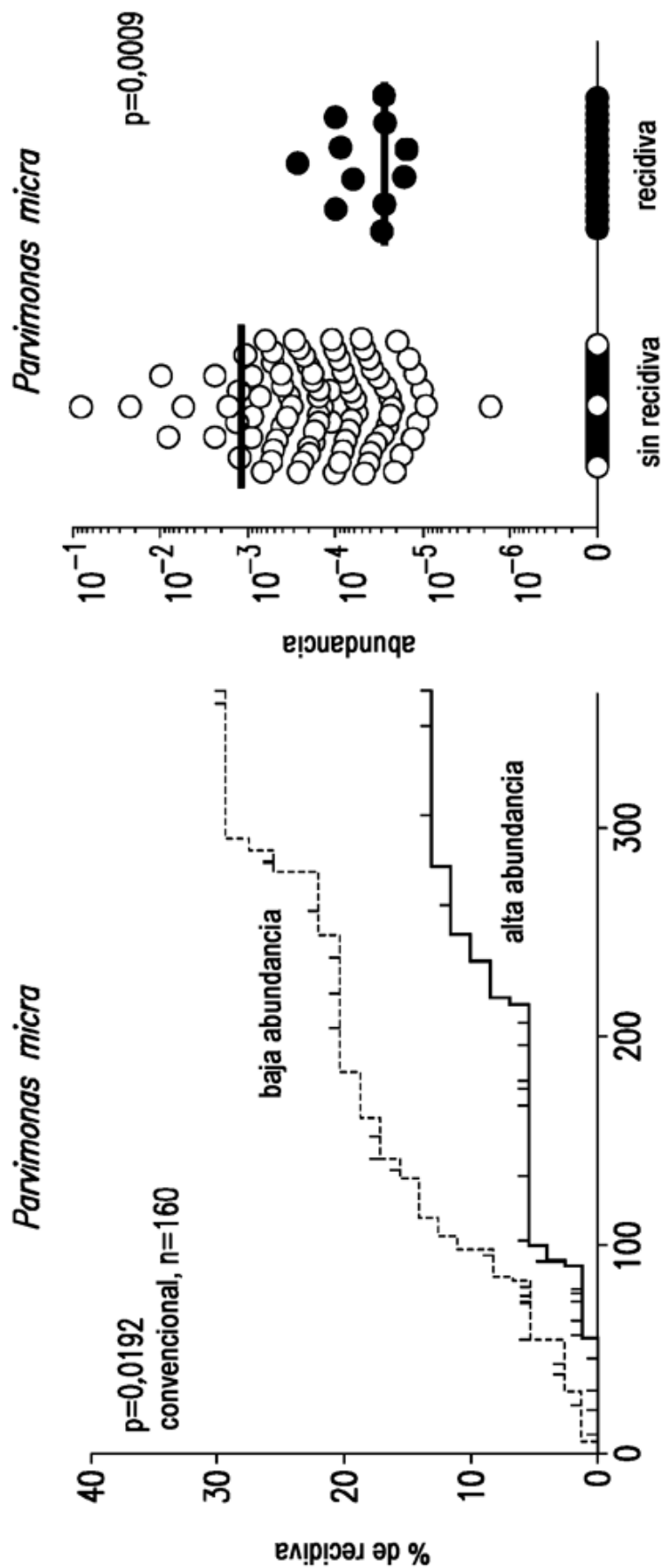


Razón de riesgos instantáneos para la recidiva al año

Índice de riesgo de enfermedad refinado. Armand et al. *Blood* 2014

FIG.3

Parvimonas micra es un biomarcador candidato para la protección contra la recidiva



Dias tras HSCT

Dominio: *Bacteria*
Filo: *Firmicutes*
Clase: *Clostridia*
Orden: *Clostridiales*
Familia: *Peptostreptococcaceae*
Género: *Parvimonas*
Especie: *micra*

FIG. 4B

FIG. 4A

La mejor capacidad discriminatoria de *Parvimonas* es después de injertos no de cordón convencionales (repletos de células T)

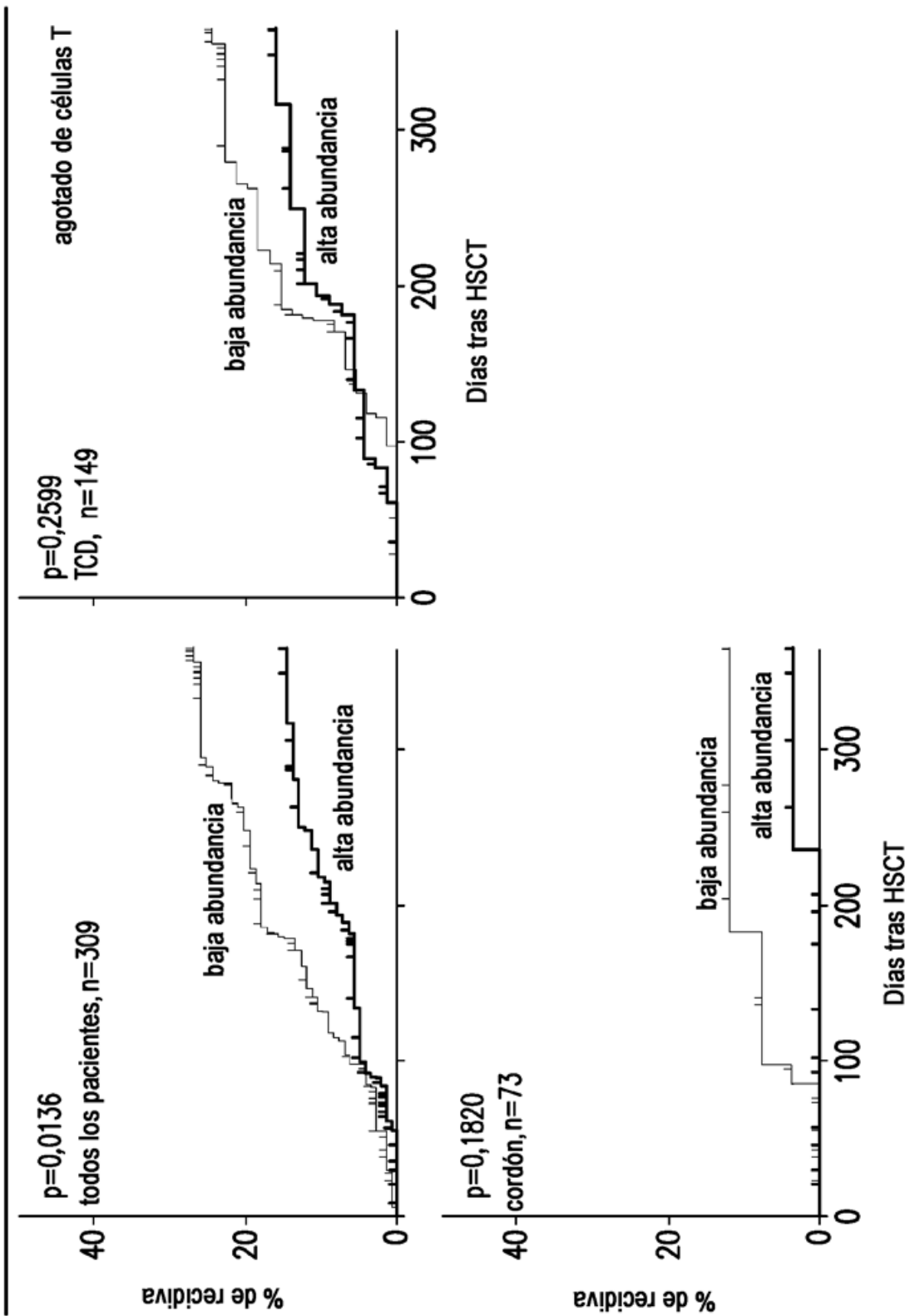


FIG. 5

La mejor capacidad discriminatoria de *Parvimonas* es después de regímenes de acondicionamiento de alta intensidad

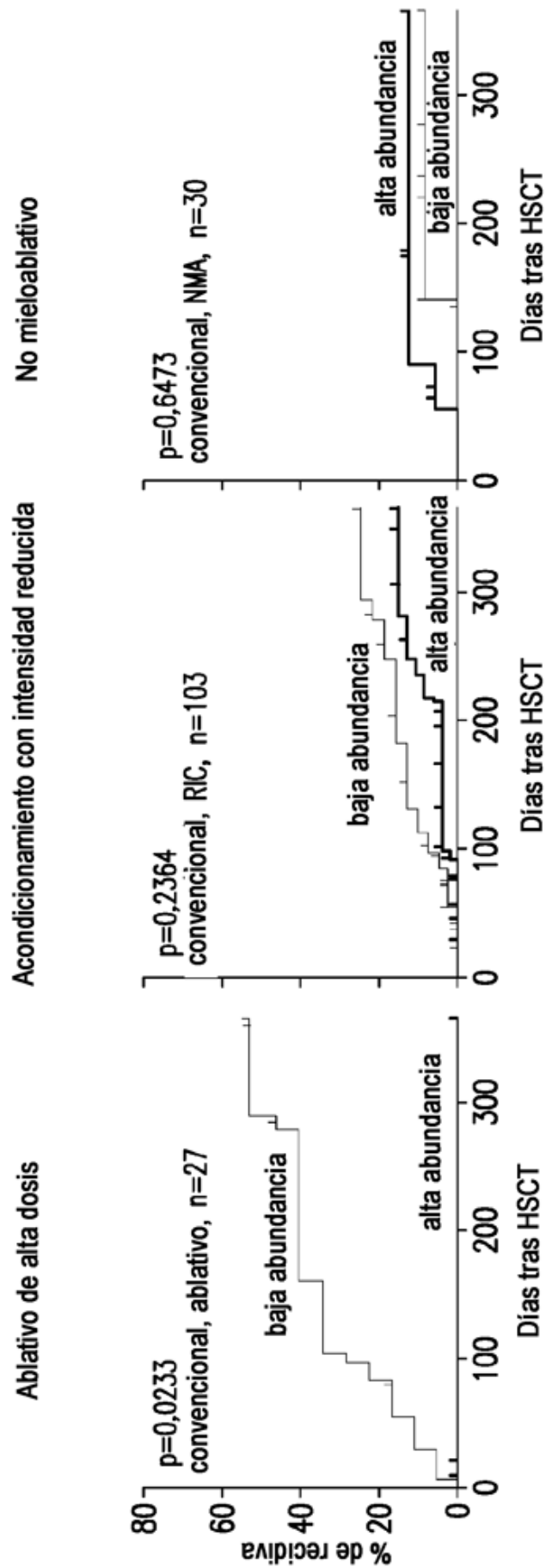


FIG. 6

La abundancia de *Parvimonas* y *Strep. anginosus* predice menos recidiva;
la abundancia de *Enterococcus* predice más recidiva

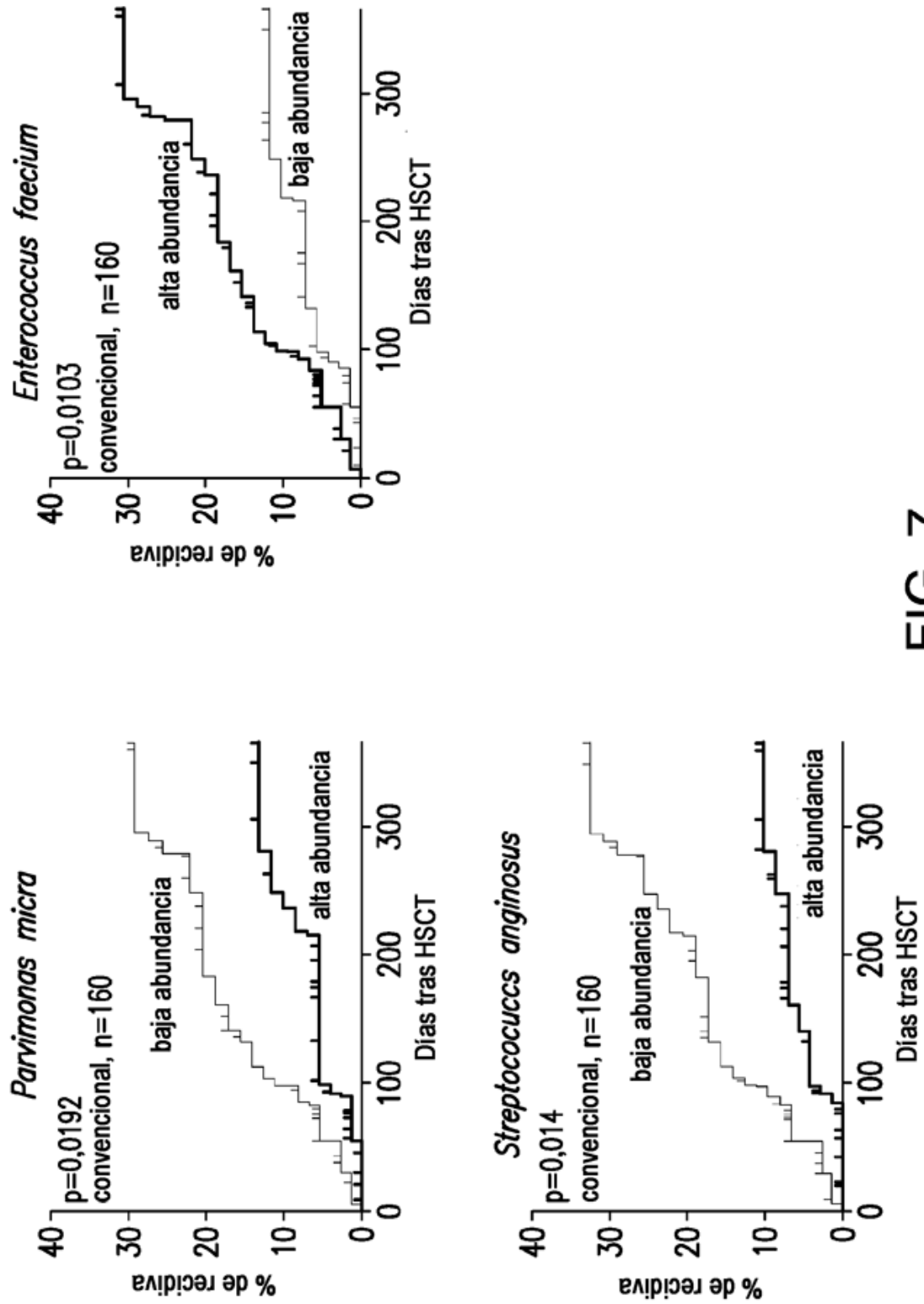


FIG. 7

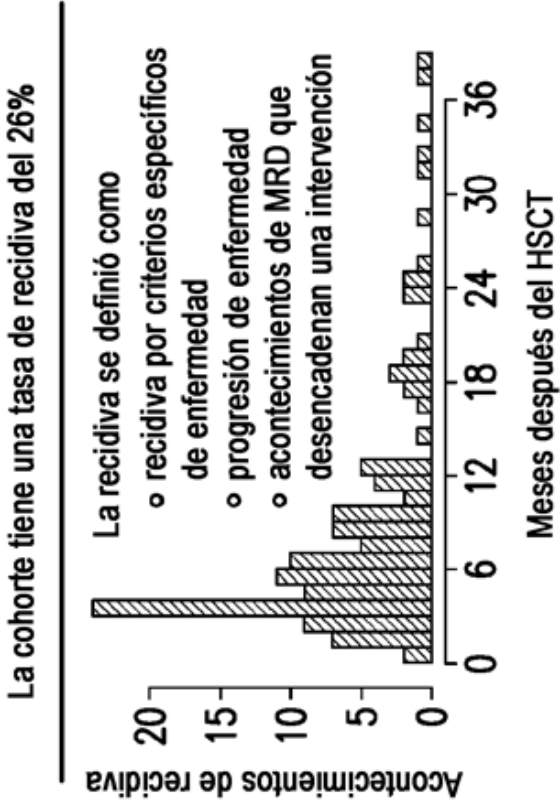
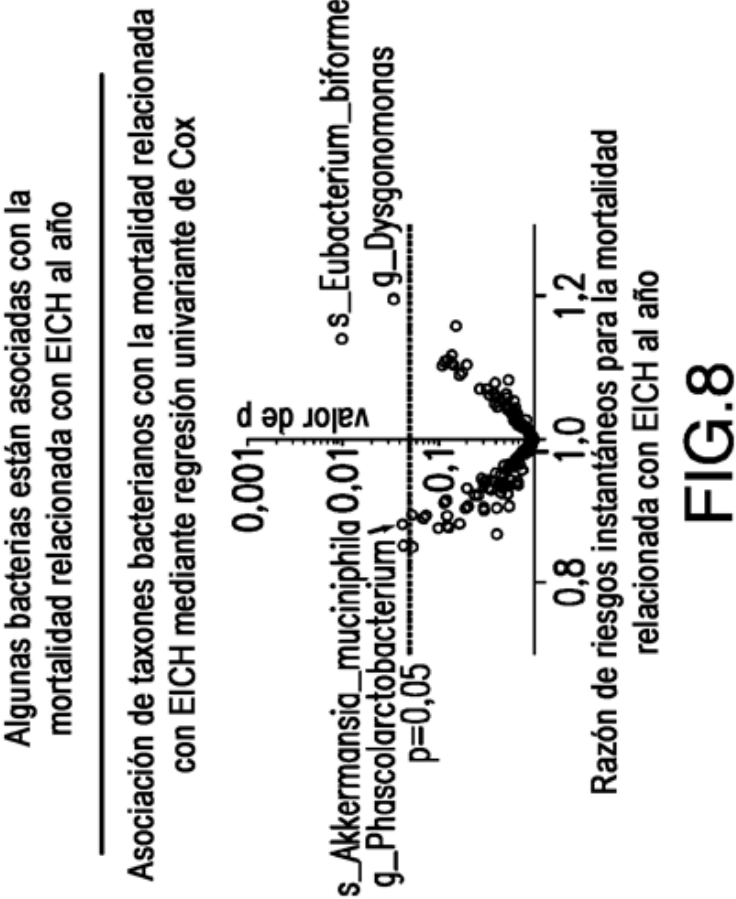


FIG. 9

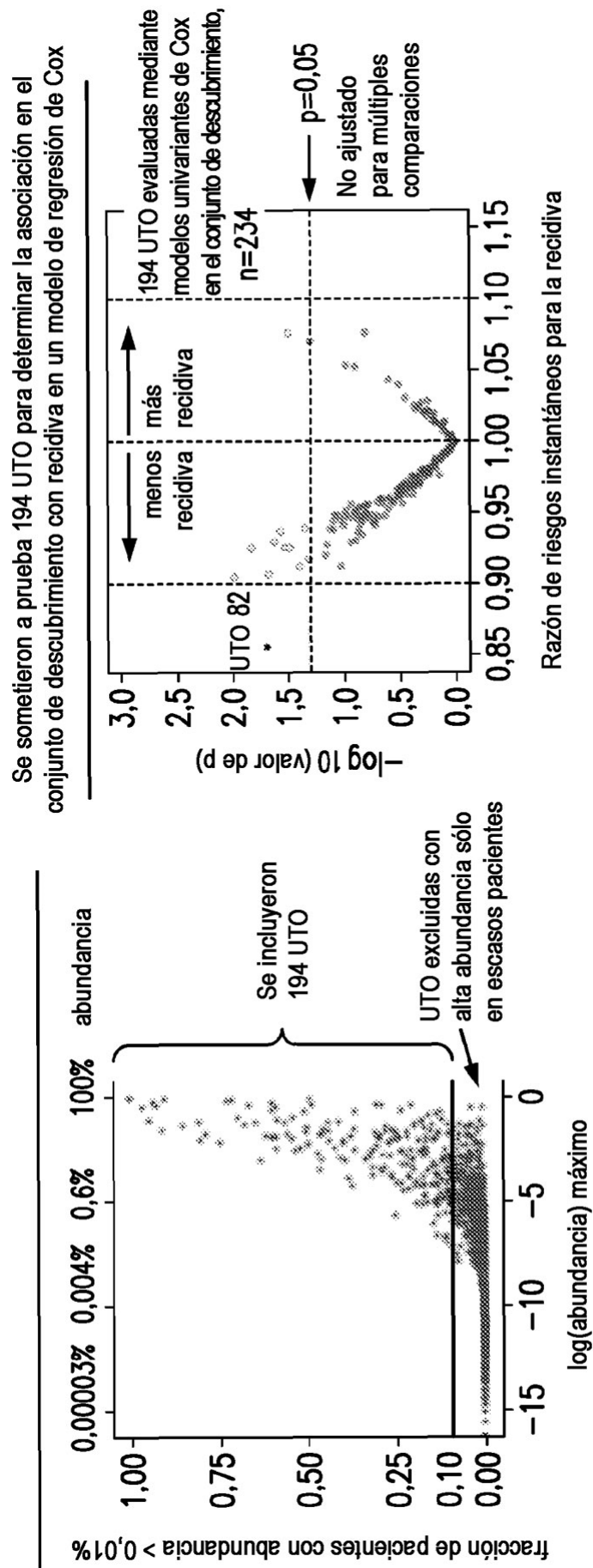
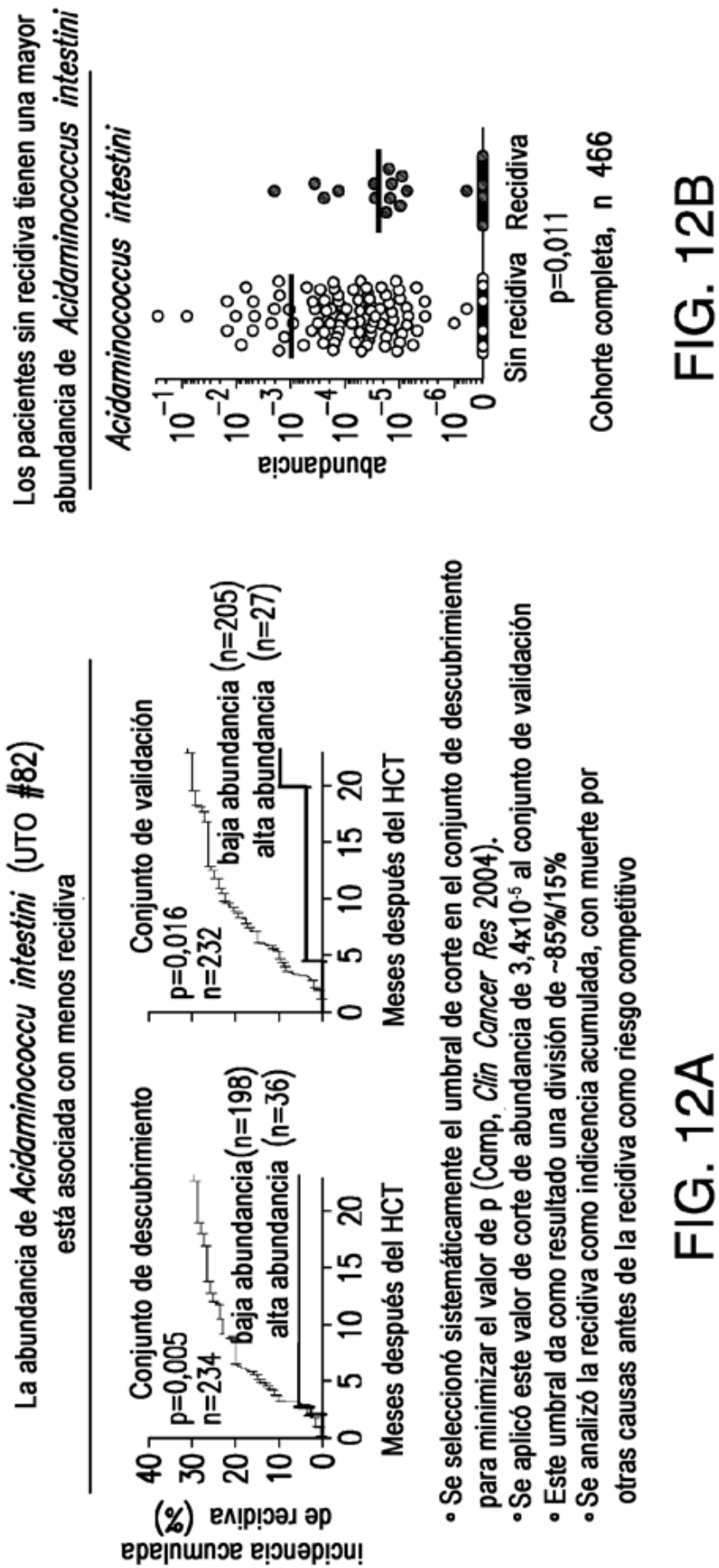


FIG. 11

FIG. 10



- Se seleccionó sistemáticamente el umbral de corte en el conjunto de descubrimiento para minimizar el valor de p (Camp, *Clin Cancer Res* 2004).
- Se aplicó este valor de corte de abundancia de $3,4 \times 10^{-5}$ al conjunto de validación
- Este umbral da como resultado una división de ~85%/15%
- Se analizó la recidiva como incidencia acumulada, con muerte por otras causas antes de la recidiva como riesgo competitivo

FIG. 12B

Acidaminococcus intestini está asociada con
menos recidiva después del ajuste multivariante

Acidaminococcus intestini

Variable	HR	IC del 95% inferior	IC del 95% superior	valor de p
Sin ajustar	0,899	0,829	0,974	0,010
Intensidad de acondicionamiento	0,903	0,833	0,980	0,015
Fuente de injerto	0,896	0,827	0,972	0,008
Índice de riesgo de enfermedad	0,902	0,832	0,979	0,013
Los 3: DRI, intensidad y fuente	0,899	0,828	0,975	0,010

Índice de riesgo de enfermedad refinado

Predictor	HR	IC del 95% inferior	IC del 95% superior	valor de p
DRI	0,51	0,38	0,70	0,00002

HR—Razón de riesgos instantáneos

Cohortes de descubrimiento y de validación combinadas (n=466)
Intensidad de acondicionamiento (Bacigalupo, *BBMT* 2009)
Fuente de injerto (agotado de células T, cordón, PBSC/BM no modificadas)
Índice de riesgo de enfermedad refinado (Armand *Blood* 2014)

FIG. 13

La asociación de *Acidaminococcus intestini* con menos
recidiva está impulsada principalmente por trasplantes repletos de células T

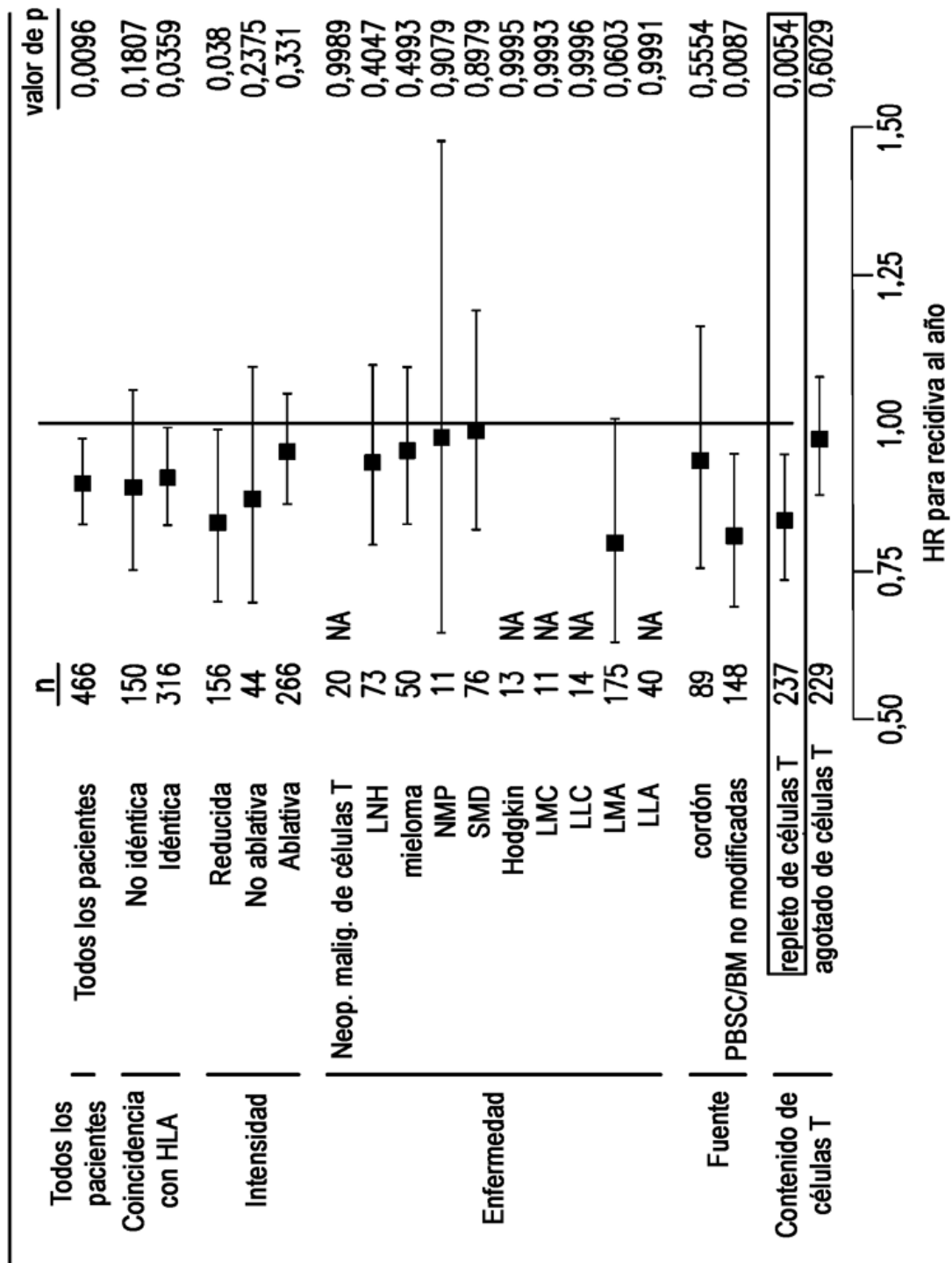


FIG. 14A

La asociación inversa de *Acidaminococcus intestini*
con recidiva está impulsada principalmente por trasplantes repletos de células T

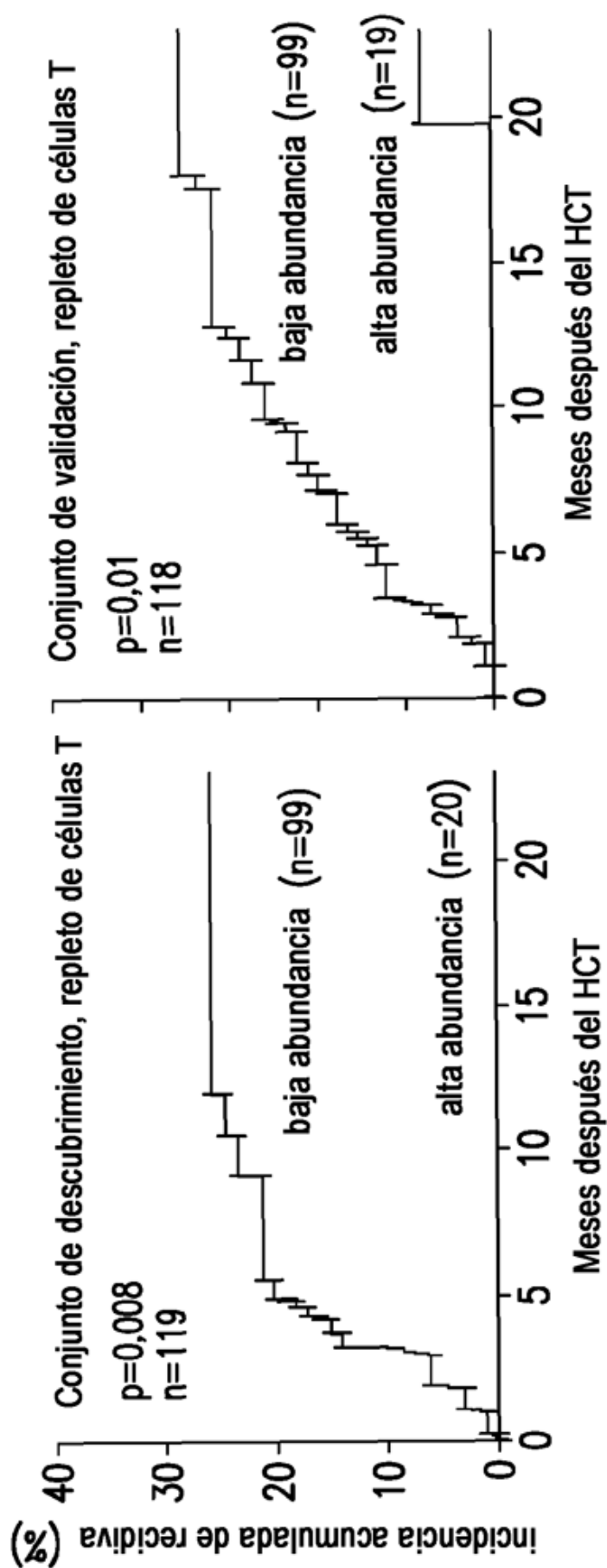


FIG. 14 B

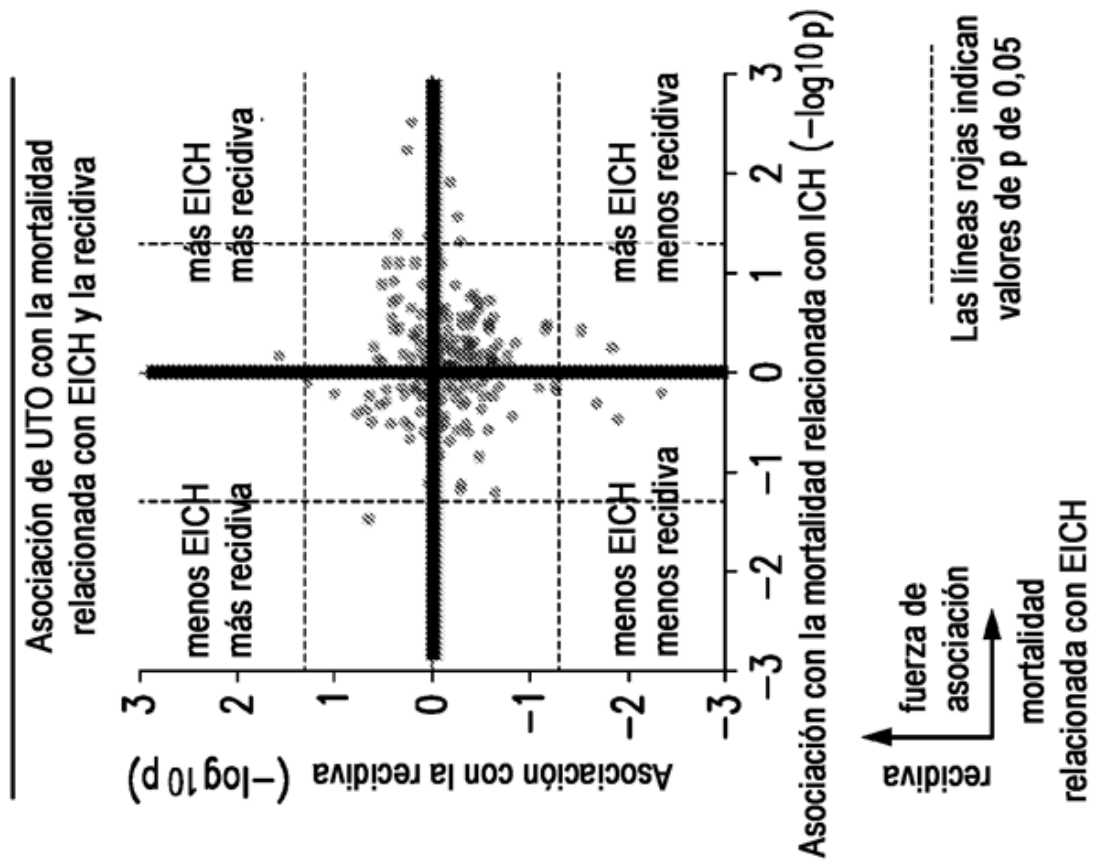


FIG. 15A

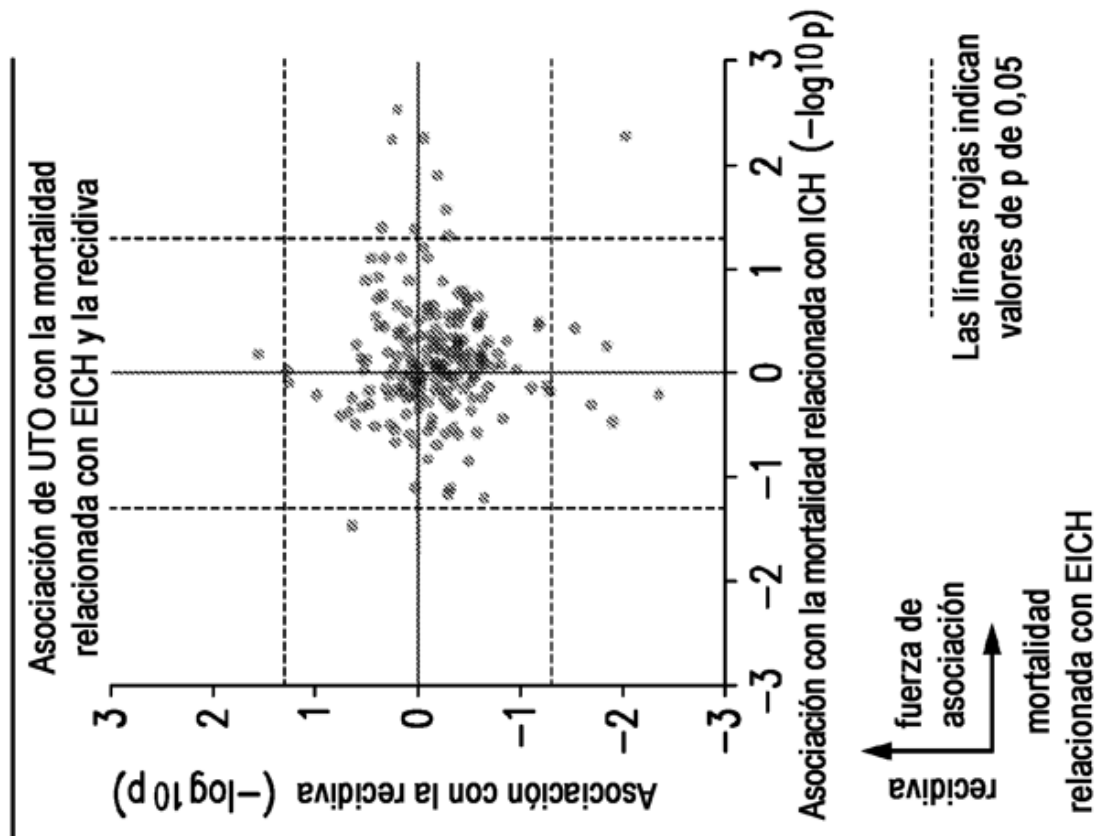


FIG. 15B

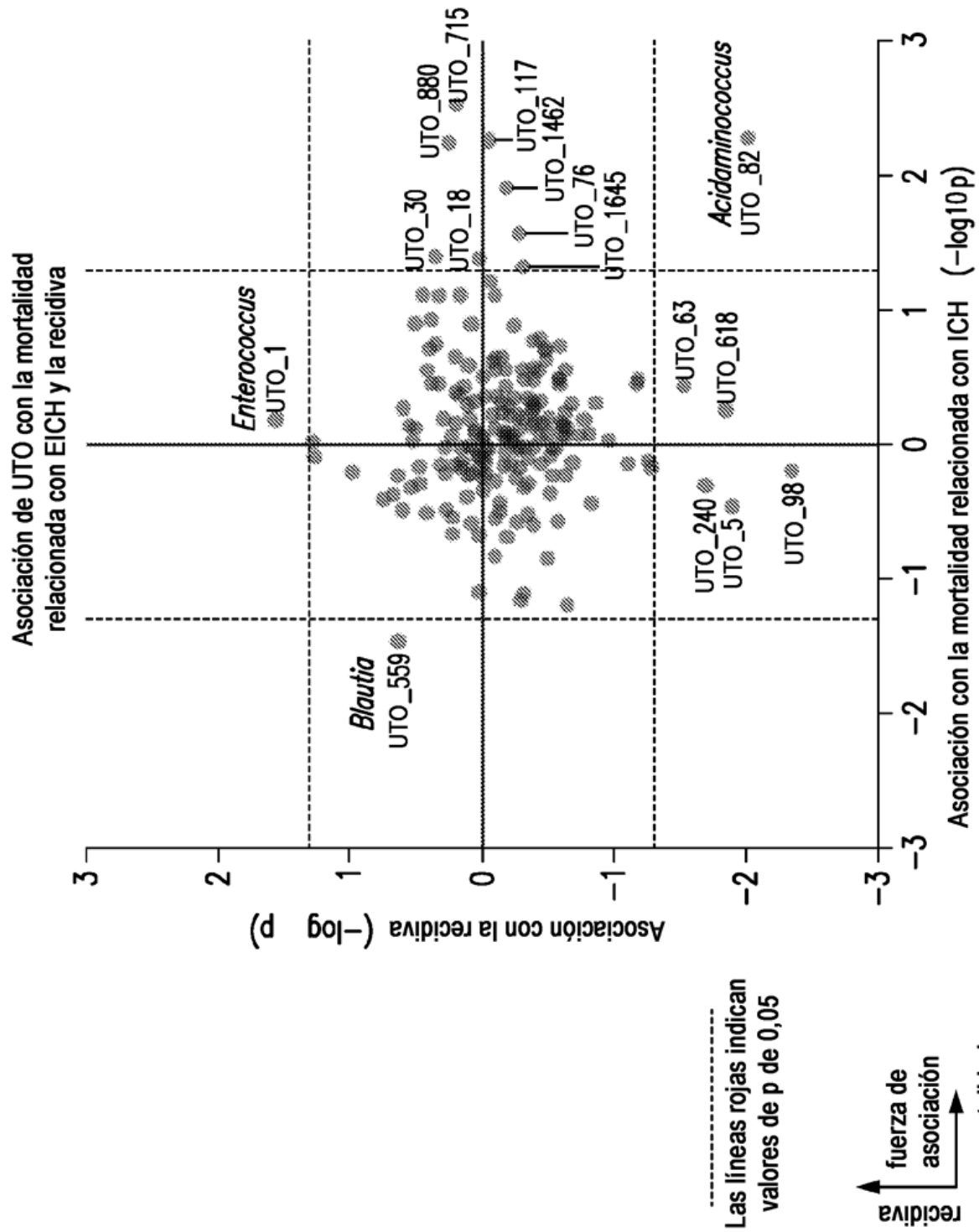


FIG. 16

Desenlaces por abundancia de *Acidaminococcus*

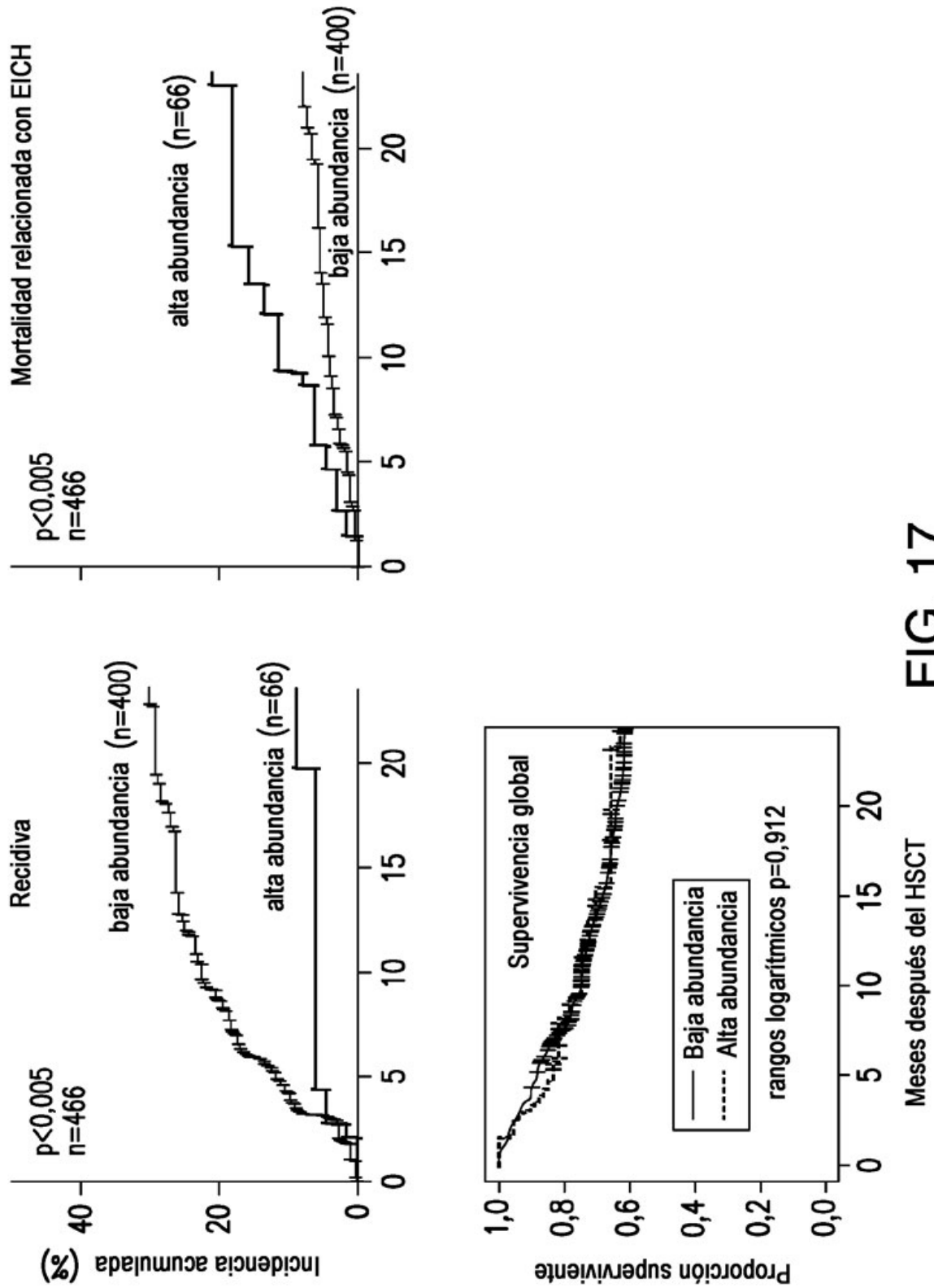


FIG. 17

Quando no había ninguna muestra disponible en los periodos flaqueantes ($n=121$, 22,4%).

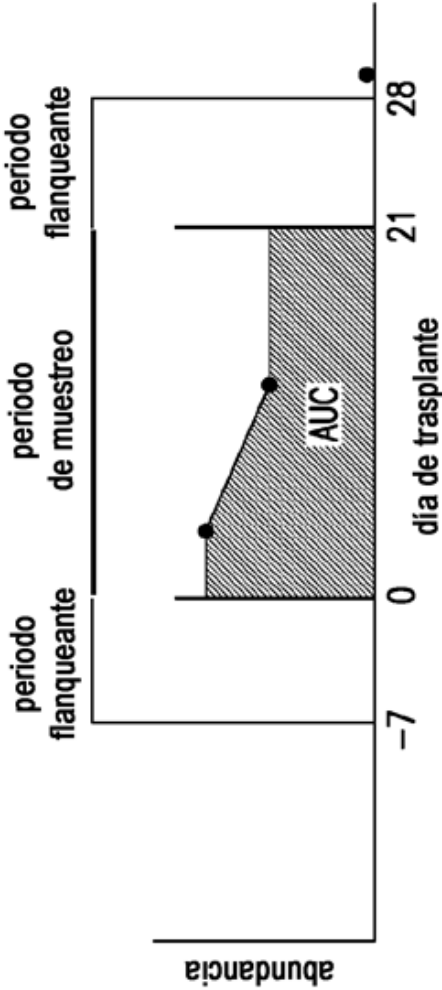


FIG. 18A

Quando había al menos una muestra disponible en los periodos flaqueantes ($n=420$, 77,6%).

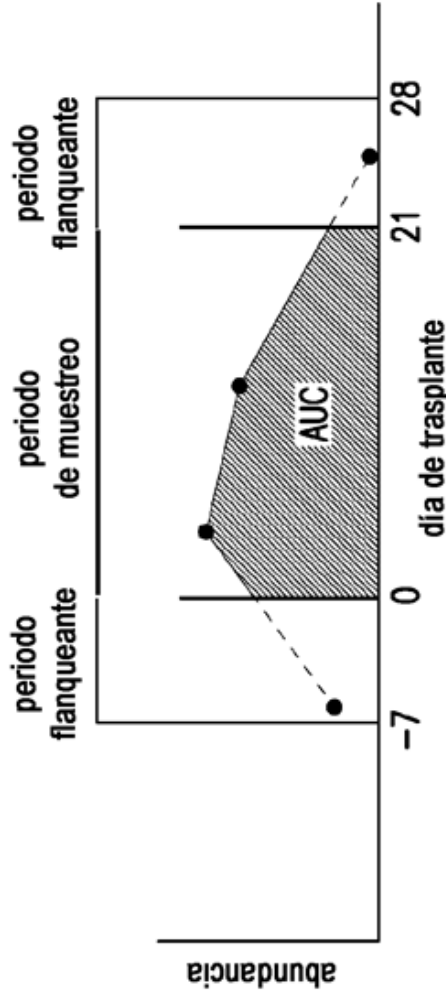


FIG. 18B

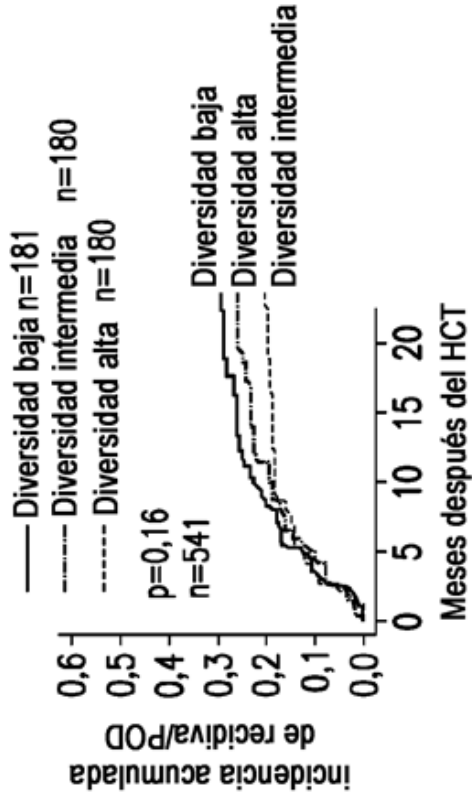


FIG. 19

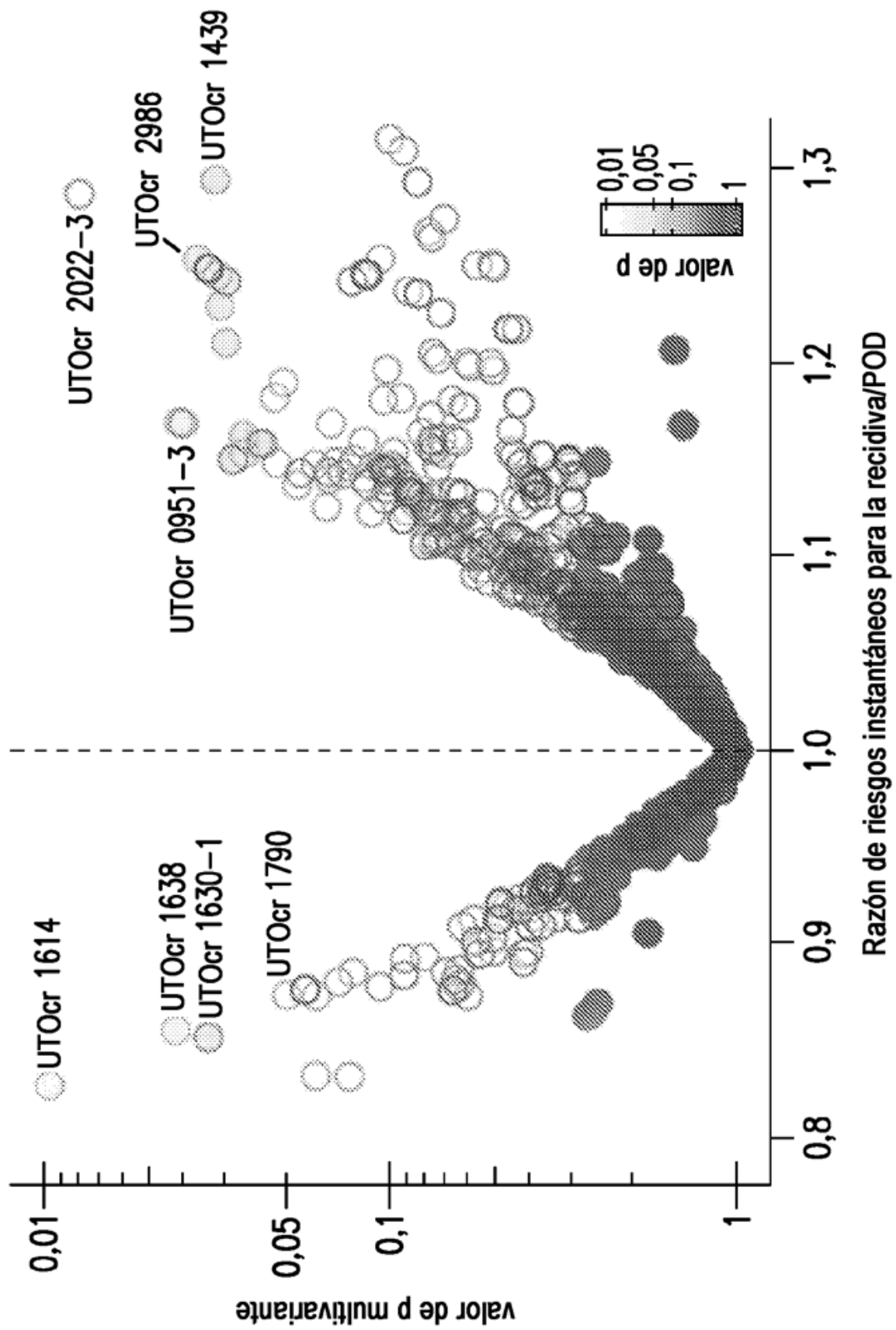


FIG. 20A

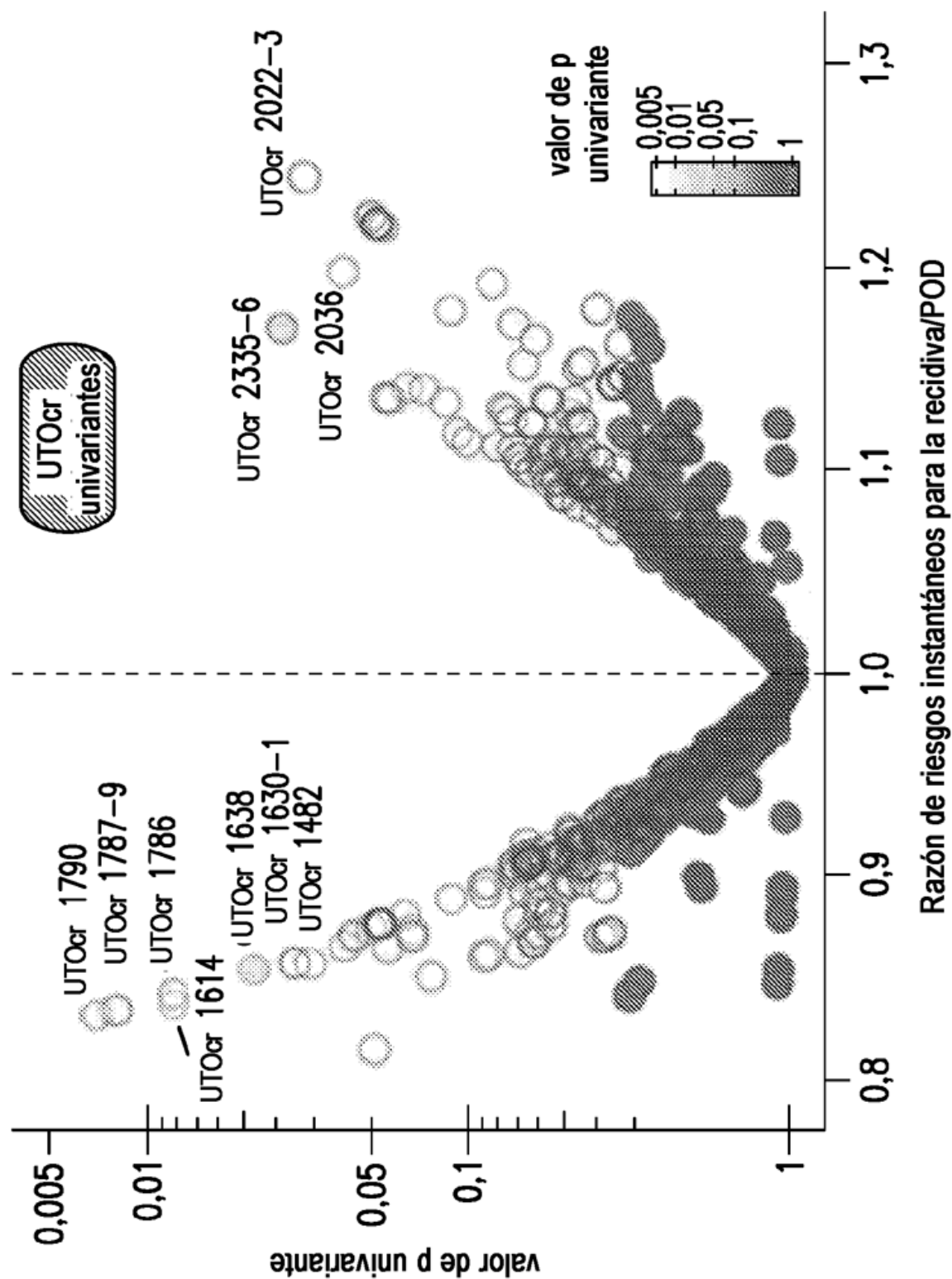


FIG. 20B

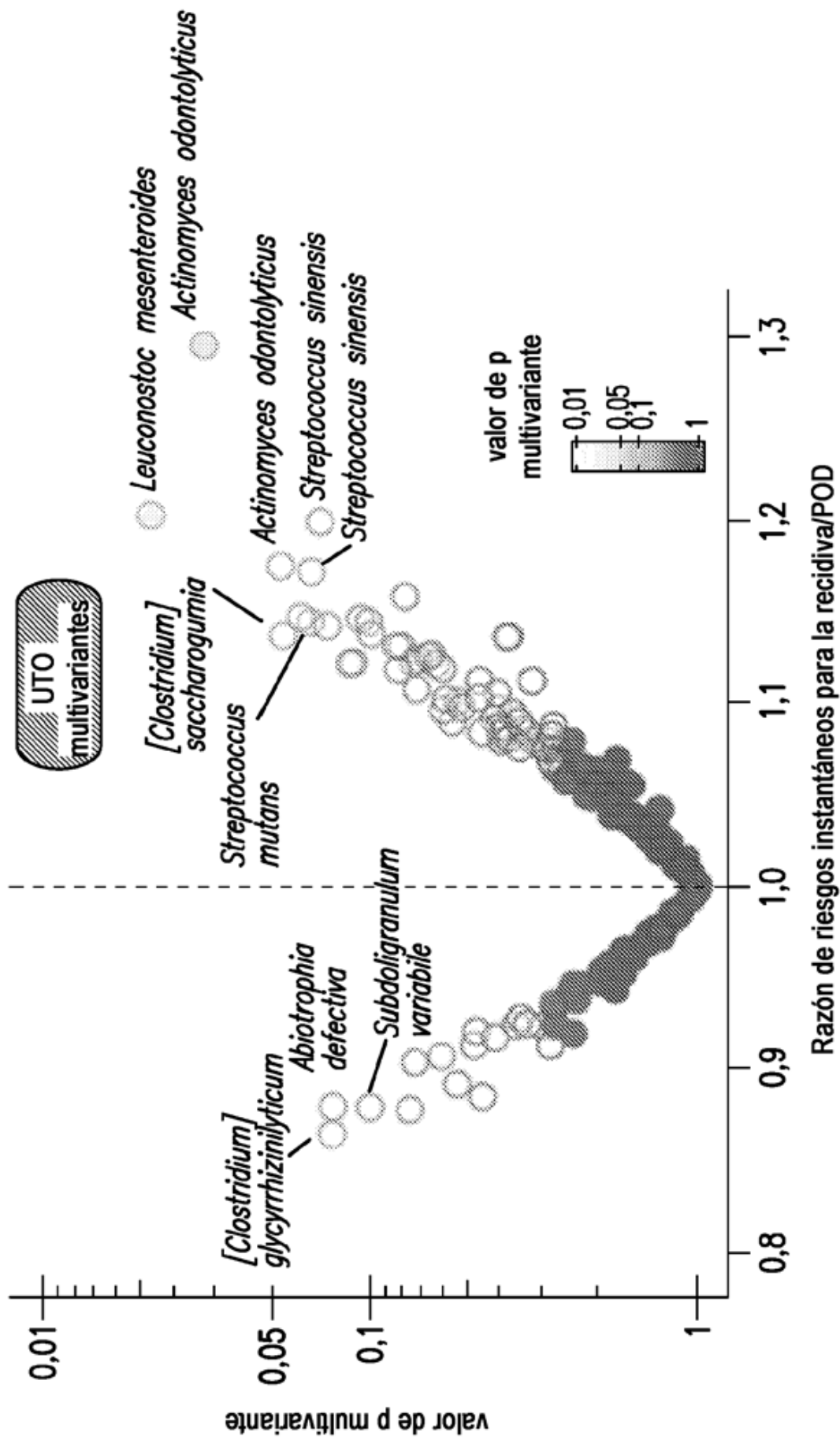


FIG. 20C

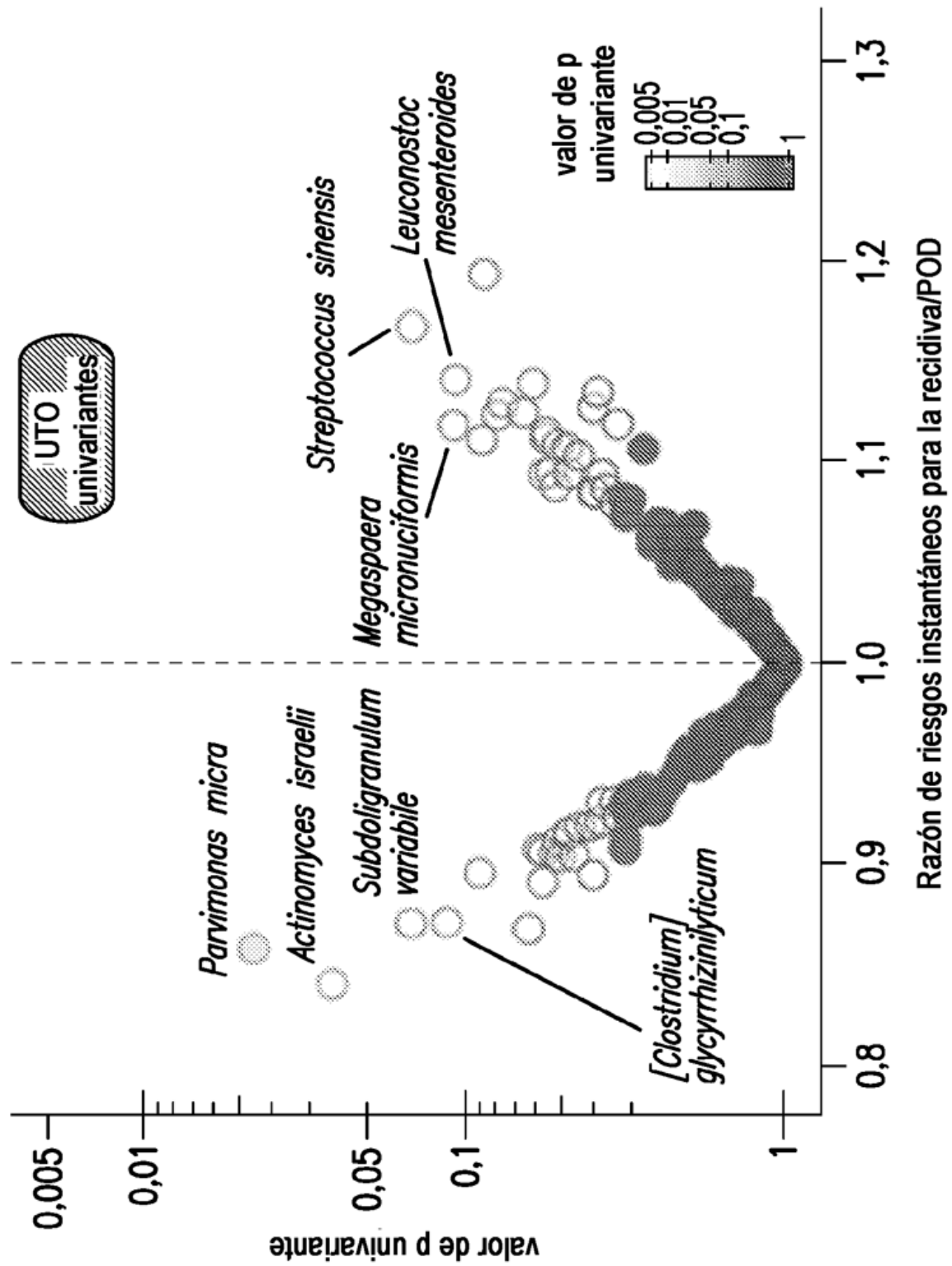


FIG. 20D

Taxón	multivariante		univariante		Especies miembro seleccionadas
	valor de p	HR	valor de p	HR	
UTOcr 1614	0,01	0,83	0,01	0,84	<i>Eubacterium limosum</i> , <i>Peptococcus niger</i> , <i>Anaerofustis stercoarhominis</i> , <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
UTOcr 2022	0,01	1,29	0,03	1,24	<i>Streptococcus sinensis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. dentisani</i>
UTOcr 2023	0,01	1,29	0,03	1,25	<i>Streptococcus sinensis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. dentisani</i>
UTOcr 1638	0,02	0,86	0,02	0,85	<i>Eubacterium limosum</i> , <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
UTOcr 0951	0,02	1,17	0,05	1,14	<i>Leptotrichia hongkongensis</i> , <i>L. trevisanii</i> , <i>L. wadei</i> , <i>L. buccalis</i> , <i>L. hofstadii</i>
UTOcr 0953	0,02	1,17	0,05	1,14	<i>Leptotrichia hongkongensis</i> , <i>L. trevisanii</i> , <i>L. wadei</i> , <i>L. buccalis</i> , <i>L. hofstadii</i>
UTOcr 0952	0,03	1,17	0,06	1,14	<i>Leptotrichia hongkongensis</i> , <i>L. trevisanii</i> , <i>L. wadei</i> , <i>L. buccalis</i> , <i>L. hofstadii</i>
UTOcr 2986	0,03	1,25	0,05	1,23	<i>Flavonifractor plautii</i> , <i>Oscillibacter ruminantium</i> , <i>Eubacterium desmolans</i>
UTOcr 3010	0,03	1,25	0,05	1,22	<i>Flavonifractor plautii</i> , <i>Oscillibacter ruminantium</i> , <i>Eubacterium desmolans</i>
UTOcr 2987	0,03	1,25	0,05	1,22	<i>Flavonifractor plautii</i> , <i>Oscillibacter ruminantium</i> , <i>Eubacterium desmolans</i>

FIG. 21

Cohorte combinada	Univariante		Multivariante I		Multivariante II		Multivariante III	
	HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log. transformada HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log presente/ausente HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log agrup. de abundancia HR (IC del 95%)	valor de p
n=541								
UTOcr 1614, logarítmicamente transformada	0,83(0,75-0,92)	<0,001	0,84(0,76-0,93)	<0,001				
UTO 1614, presente	0,51(0,36-0,73)	<0,001			0,54(0,38-0,78)	<0,001		
UTOcr 1614, agrup. de abundancia		0,001						0,004
Ausente	(referencia)						(referencia)	
Presente, tercil 1	0,63(0,41-0,98)						0,64(0,42-0,99)	
Presente, tercil 2	0,51(0,32-0,81)						0,56(0,35-0,89)	
Presente, tercil 3	0,4(0,25-0,66)						0,42(0,26-0,69)	
Intensidad		0,27				0,66		0,77
Mieloablative	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Intensidad reducida	0,8 (0,54-1,19)		0,94(0,53-1,65)		0,92(0,52-1,61)		0,96(0,54-1,69)	
No mieloablative	0,67 (0,37-1,19)		0,75(0,35-1,61)		0,7(0,33-1,5)		0,76(0,35-1,64)	
Fuente		0,004		<0,001		0,001		0,001
No modificado	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Sangre de cordón	0,34(0,18-0,65)		0,32(0,16-0,63)		0,33(0,17-0,65)		0,32(0,16-0,64)	
TCD	0,75(0,53-1,07)		0,6(0,37-0,97)		0,59(0,36-0,96)		0,6(0,37-0,98)	
DRI		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001
Bajo	0,61(0,32-1,18)		0,61(0,29-1,26)		0,61(0,29-1,25)		0,61(0,29-1,26)	
Intermedio	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Alto	2,05(1,43-2,93)		1,91(1,33-2,74)		1,89(1,32-2,72)		1,89(1,32-2,72)	

FIG. 22A

Cohorte de descubrimiento	Univariante		Multivariante I		Multivariante II		Multivariante III	
	HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log. transformada HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log presente/ausente HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log agrup. de abundancia HR (IC del 95%)	valor de p
n=271								
UTOcr 1614, logarítmicamente transformada	0,84(0,73-0,96)	0,01	0,83(0,71-0,96)	0,01				
UTO 1614, presente	0,49(0,3-0,82)	0,006			0,46(0,27-0,78)	0,004		
UTOcr 1614, agrup. de abundancia		0,03						0,03
Ausente	(referencia)						(referencia)	
Presente, tercil 1	0,59(0,32-1,1)						0,53(0,28-1)	
Presente, tercil 2	0,55(0,3-1,03)						0,51(0,27-0,98)	
Presente, tercil 3	0,38(0,2-0,72)						0,37(0,19-0,72)	
Intensidad		0,30		0,53		0,44		0,57
Mioloablata	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Intensidad reducida	0,73(0,4-1,32)		0,69(0,31-1,54)		0,66(0,3-1,47)		0,7(0,31-1,57)	
No mioloablata	0,63(0,32-1,24)		0,63(0,25-1,57)		0,58(0,23-1,45)		0,64(0,25-1,62)	
Fuente		0,04		0,03		0,04		0,04
No modificado	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Sangre de cordón	0,35(0,15-0,8)		0,41(0,17-0,99)		0,43(0,18-1,05)		0,53(0,28-1,02)	
TCD	0,72(0,45-1,17)		0,52(0,27-1)		0,51(0,27-0,98)		0,43(0,17-1,05)	
DRI		<0,001		0,005		0,004		0,004
Bajo	0,55(0,23-1,29)		0,52(0,2-1,33)		0,52(0,2-1,35)		0,51(0,19-1,31)	
Intermedio	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Alto	2,19(1,35-3,55)		2,02(1,23-3,33)		2,07(1,22-3,42)		2,07(1,25-3,44)	

FIG. 22B

Cohorte de validación	Univariante		Multivariante I		Multivariante II		Multivariante III	
	HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log. transformada HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log presente/ausente HR (IC del 95%)	valor de p	UTOcr log agrup. de abundancia HR (IC del 95%)	valor de p
n=270								
UTOcr 1614, logarítmicamente transformada	0,82(0,71–0,95)	0,009	0,82(0,7–0,96)	0,01				
UTO 1614, presente	0,52(0,31–0,87)	0,01			0,54(0,31–0,92)	0,03		
UTOcr 1614, agrup. de abundancia		0,05						0,09
Ausente	(referencia)						(referencia)	
Presente, tercil 1	0,68(0,37–1,25)						0,67(0,36–1,26)	
Presente, tercil 2	0,43(0,21–0,89)						0,48(0,23–1,01)	
Presente, tercil 3	0,43(0,2–0,91)						0,4(0,18–0,88)	
Intensidad		0,79		0,71		0,72		0,66
Mieloablative	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Intensidad reducida	0,87(0,51–1,49)		1,36(0,61–3,04)		1,33(0,6–2,99)		1,41(0,63–3,18)	
No mieloablative	0,72(0,22–2,34)		1,03(0,25–4,24)		0,95(0,23–3,87)		1,02(0,25–4,21)	
Fuente		0,10		0,03		0,03		0,03
No modificado	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Sangre de cordón	0,32(0,11–0,91)		0,23(0,07–0,69)		0,24(0,08–0,72)		0,23(0,07–0,69)	
TCD	0,79(0,47–1,32)		0,76(0,37–1,56)		0,75(0,37–1,56)		0,76(0,37–1,58)	
DRI		0,03		0,07		0,08		0,09
Bajo	0,73(0,26–2,04)		0,76(0,24–2,36)		0,7(0,23–2,16)		0,79(0,25–2,49)	
Intermedio	(referencia)		(referencia)		(referencia)		(referencia)	
Alto	1,91(1,13–3,25)		1,81(1,06–3,11)		1,78(1,04–3,05)		1,79(1,04–3,08)	

FIG. 22C

UTOcr 1614

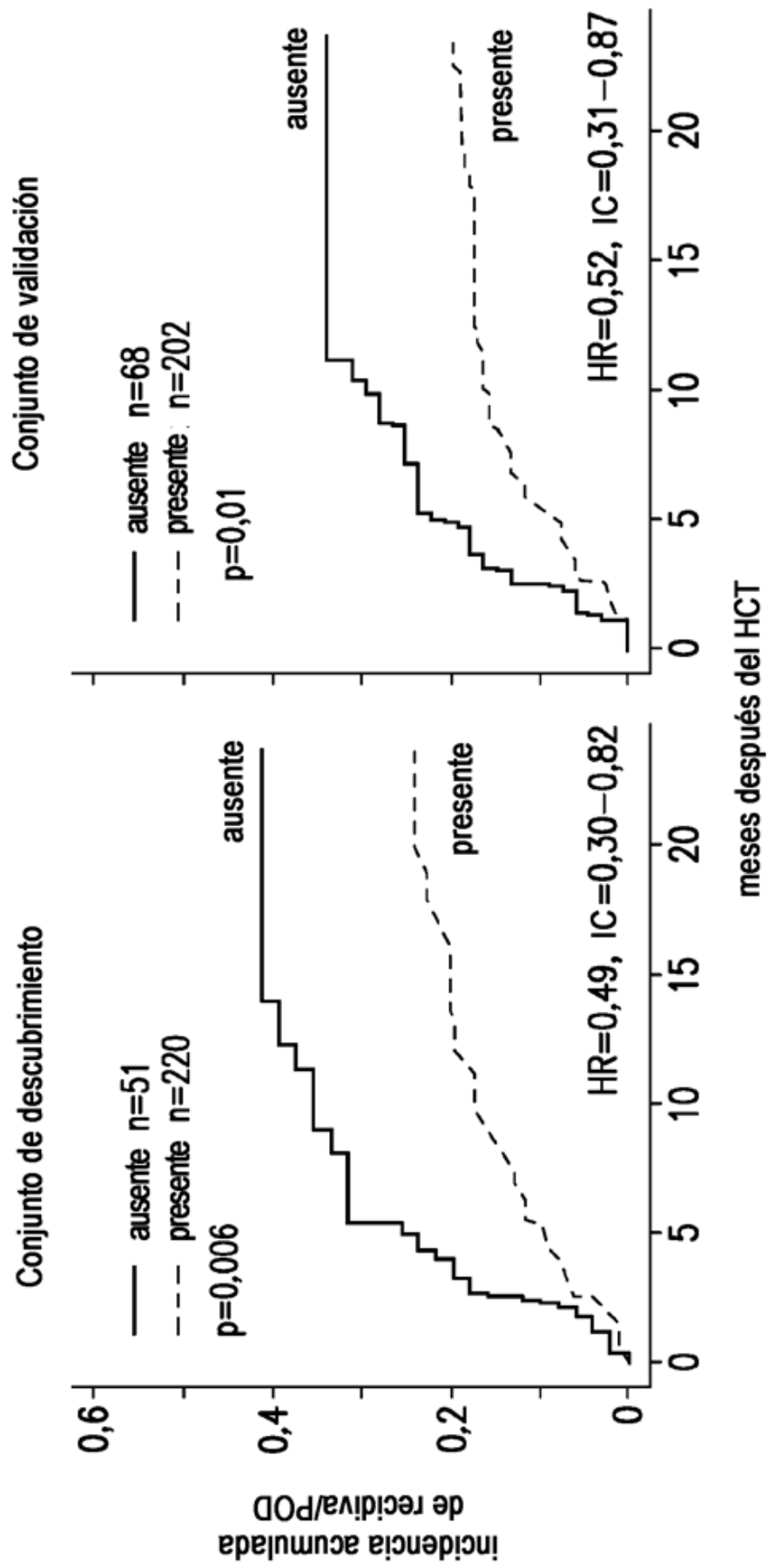
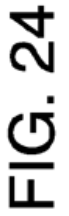


FIG. 23



valor de p (Cox univariante)			
			
	<0,001	<0,005	<0,05
Filo	Clase	Orden	Familia
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae
Armatimonadetes	Armatimonadia	Armatimonadales	Armatimonadaceae

Círculos que superponen el árbol:
el color indica la significación estadística
de la asociación con menos recidiva

Círculos a la derecha:
el tamaño es proporcional a la abundancia media
de cada UTO en la cohorte completa;
cada especie tiene un color diferente

FIG. 24 Continuación

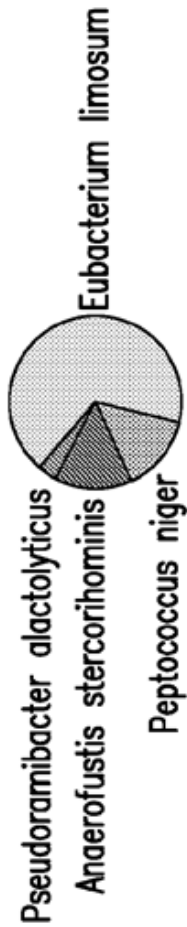


FIG. 25

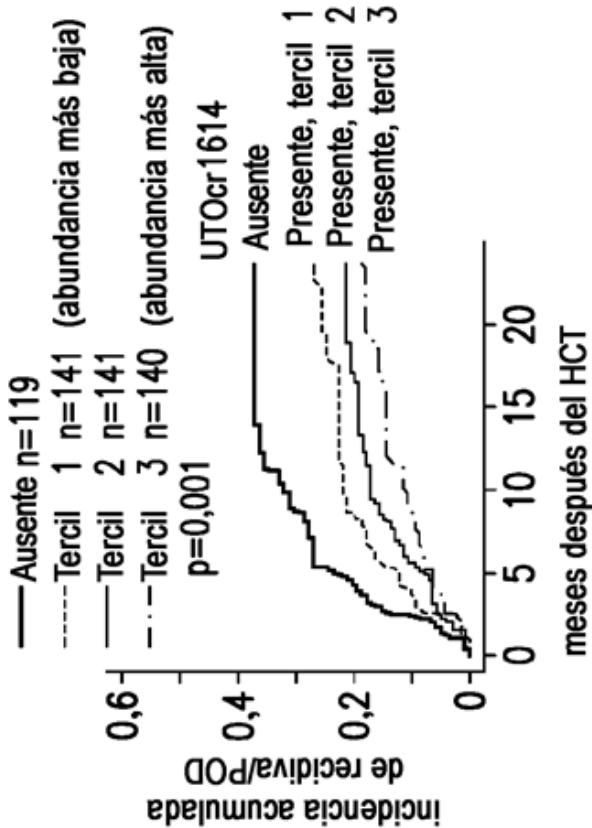


FIG. 26A

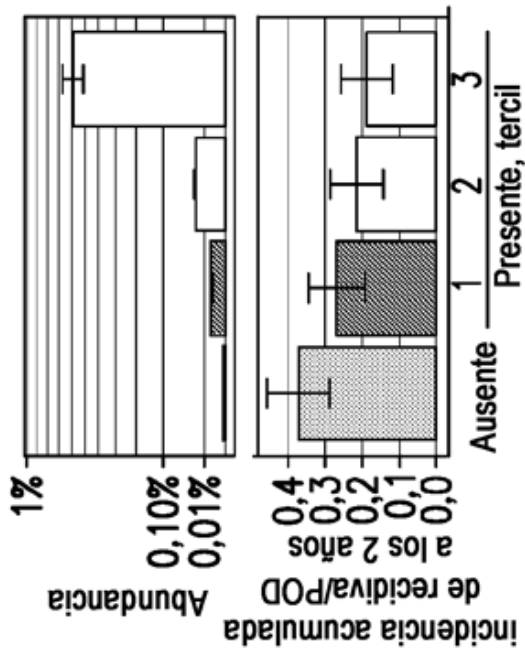


FIG. 26B

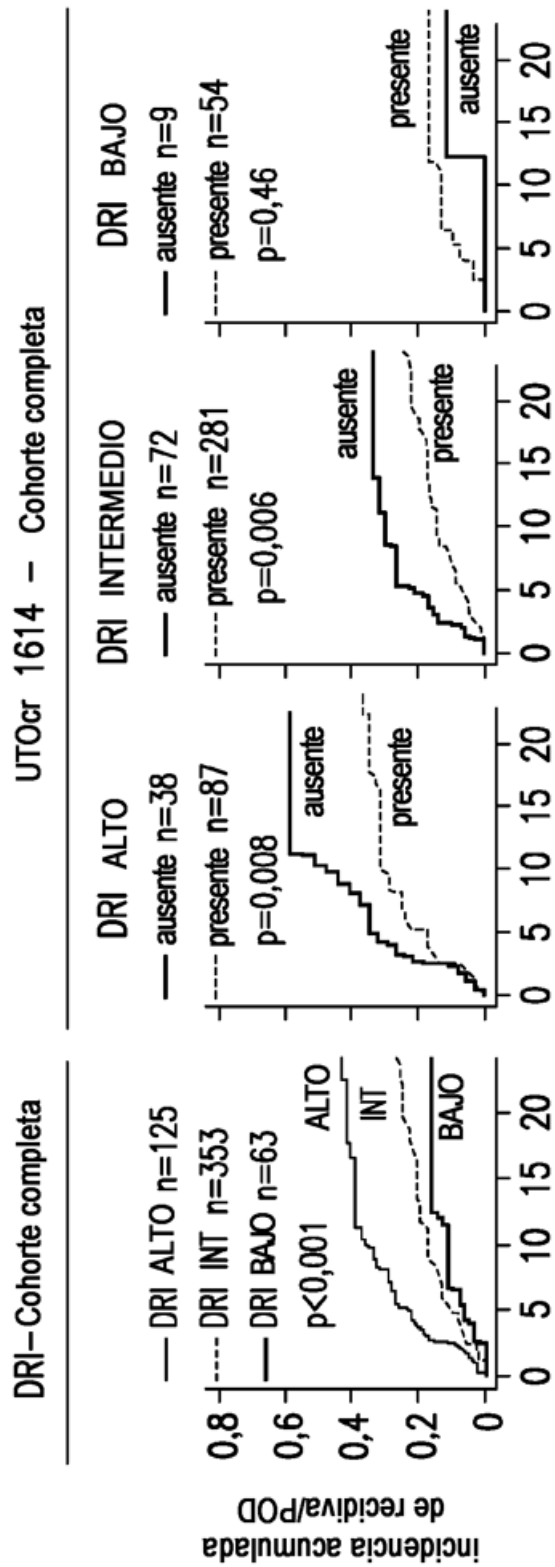


FIG. 27

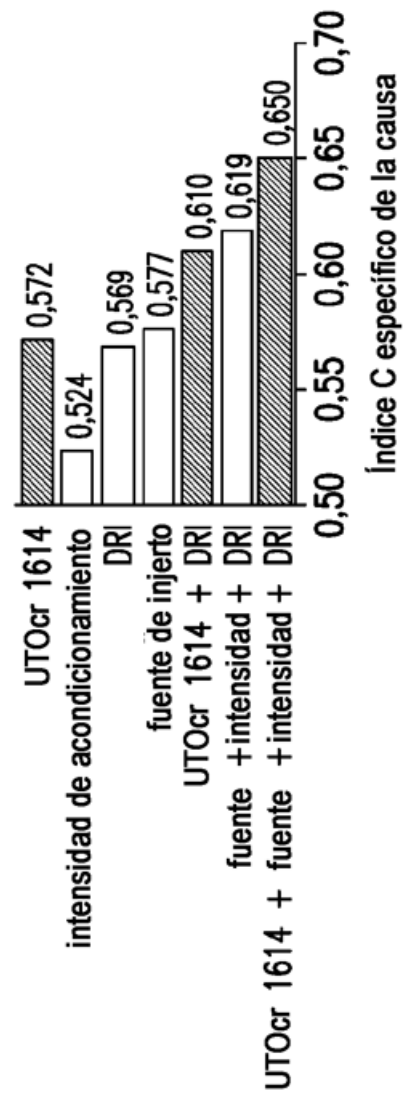


FIG. 28

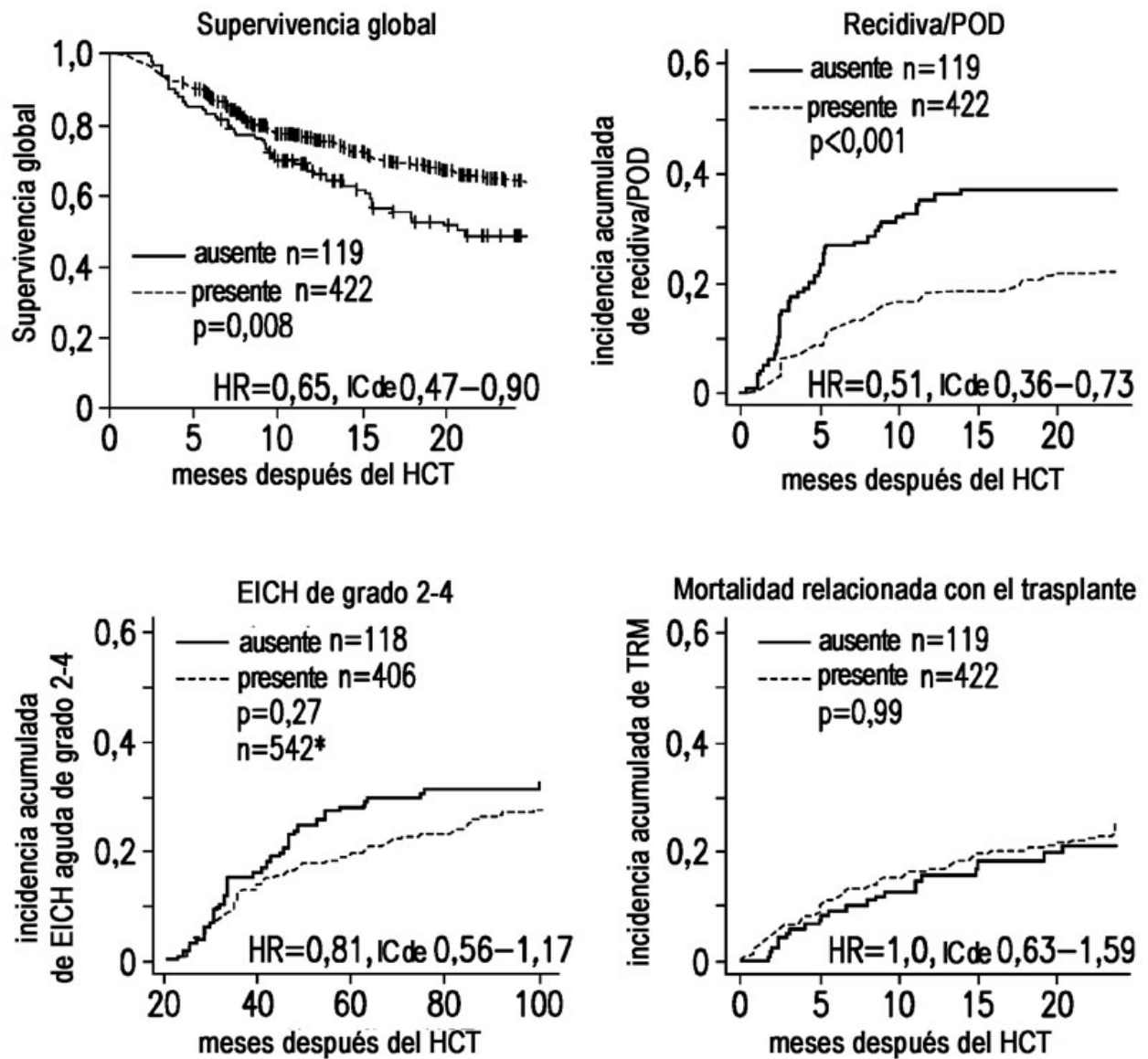
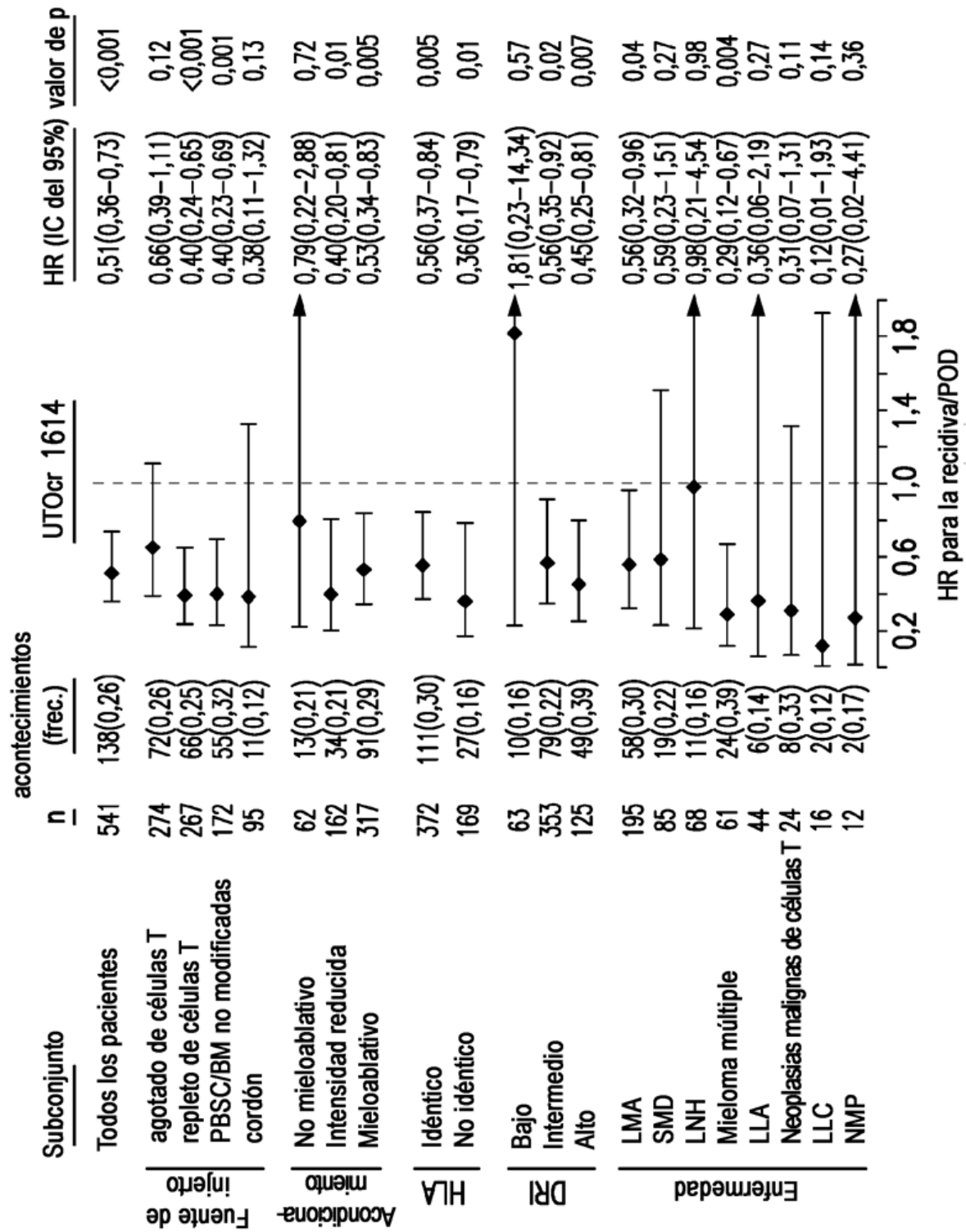


FIG. 29



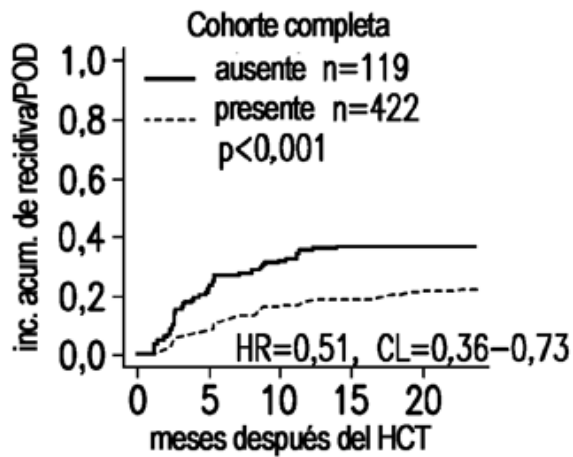


FIG. 31A

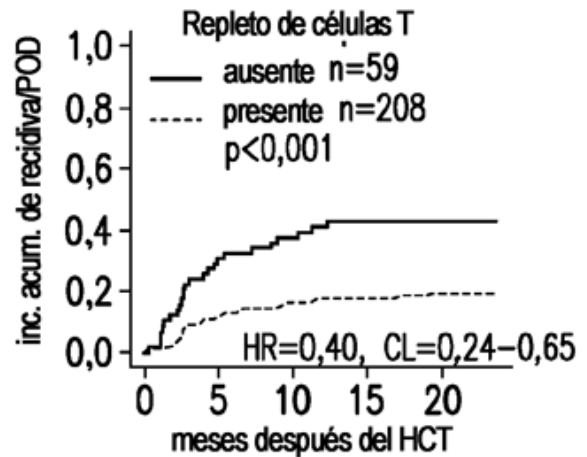


FIG. 31B

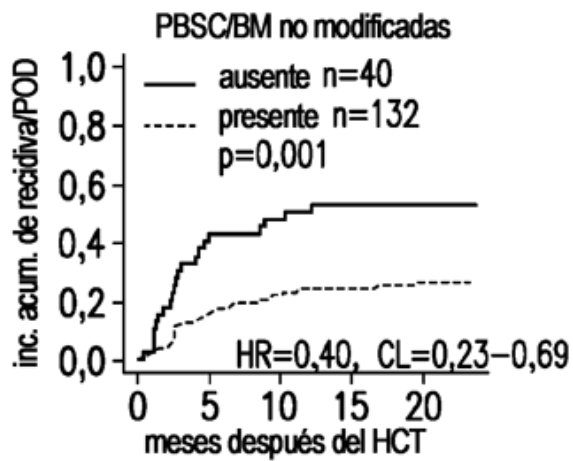


FIG. 31C

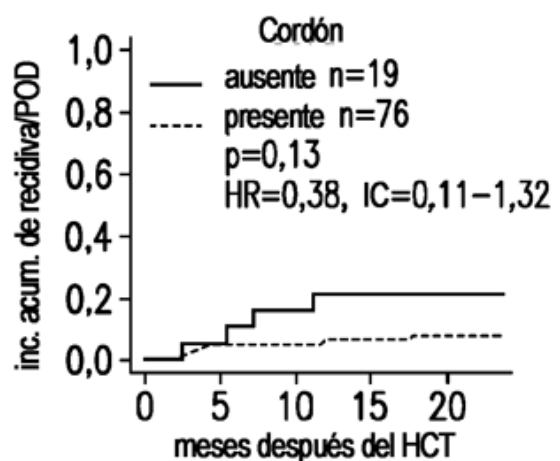


FIG. 31D

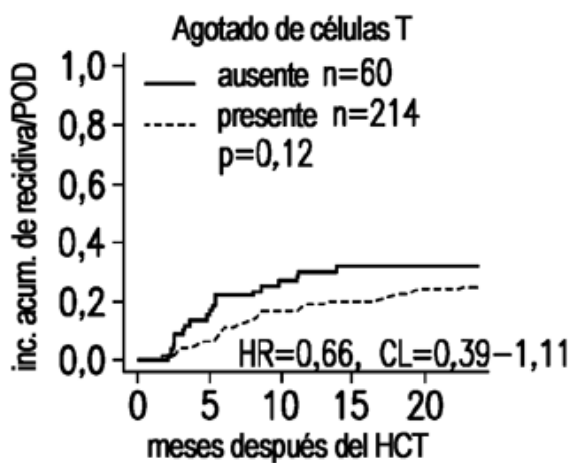


FIG. 31E

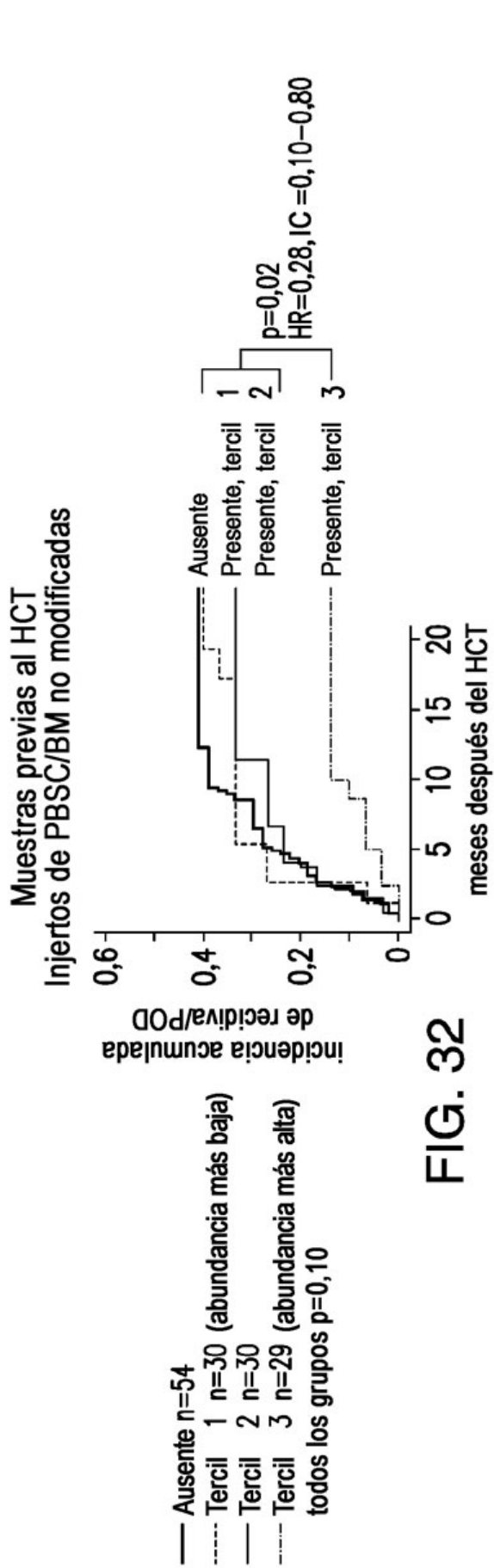


FIG. 32

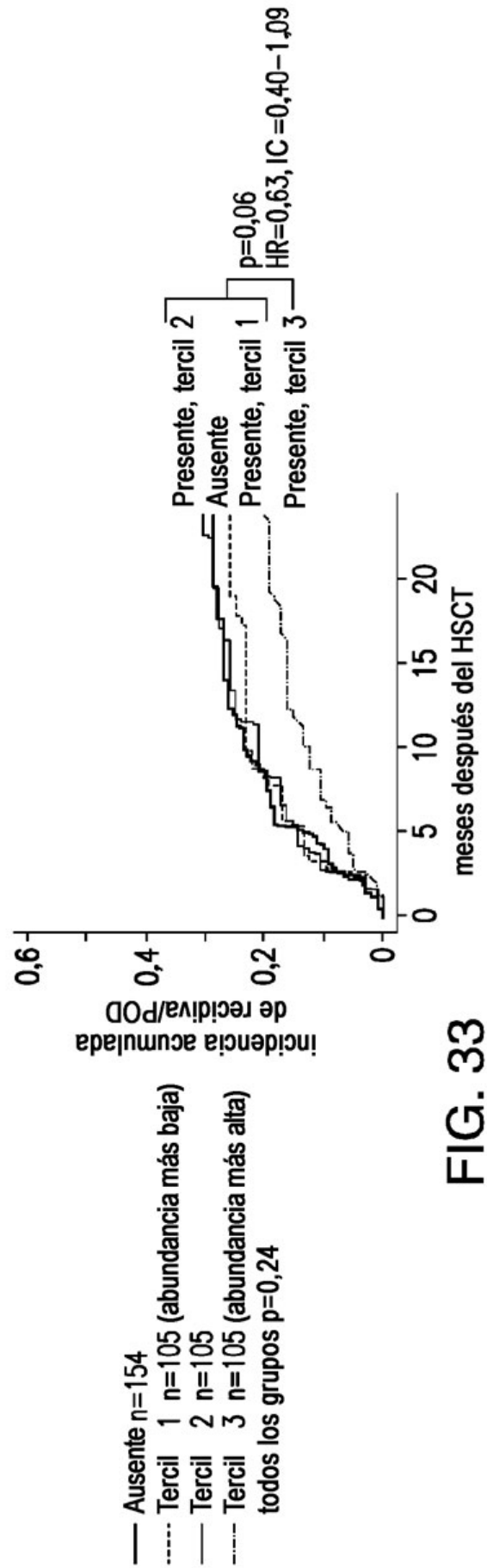


FIG. 33

Agrupamiento de abundancia	mínimo	media	mediana	máximo	n
Ausente	0	0	0	0	119
Presente, tercil 1	1,69E-07	4,16E-05	4,21E-05	9,33E-05	141
Presente, tercil 2	9,46E-05	2,22E-04	1,76E-04	5,22E-04	141
Presente, tercil 3	5,34E-04	5,79E-03	1,85E-03	8,00E-02	140
Abundancia de UTOcr 1614 usada en el análisis de muestras posteriores al trasplante (Figuras 26B, C)					
Agrupamiento de abundancia	mínimo	media	mediana	máximo	n
Ausente	0	0	0	0	154
Presente, tercil 1	2,14E-05	1,23E-04	1,13E-04	2,45E-04	105
Presente, tercil 2	2,46E-04	7,04E-04	6,28E-04	1,50E-03	105
Presente, tercil 3	1,53E-03	2,51E-02	1,51E-02	3,46E-01	105
Abundancia de UTOcr 1614 usada en el análisis de muestras previas al trasplante (Figura 33)					
Agrupamiento de abundancia	mínimo	media	mediana	máximo	n
Ausente	0	0	0	0	54
Presente, tercil 1	2,21E-05	1,47E-04	1,16E-04	3,80E-04	30
Presente, tercil 2	3,96E-04	8,88E-04	7,80E-04	1,57E-03	30
Presente, tercil 3	1,59E-03	1,85E-02	9,33E-03	6,59E-02	29
Abundancia de UTOcr 1614 usada en el análisis de muestras previas al trasplante de receptores de injertos de BM/PBSC (Figura 32)					

FIG. 34