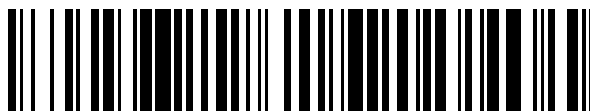


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 282**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/IB2014/066249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14812648 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3071709**

54 Título: **Composición de microbiota, como marcador de sensibilidad a la quimioterapia y uso de moduladores microbianos (prebióticos, probióticos o simbióticos) para mejorar la eficacia de un tratamiento contra el cáncer**

30 Prioridad:

**21.11.2013 EP 13306597
21.11.2013 US 201361907076 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (25.0%)
39, rue Camille Desmoulins
94800 Villejuif, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (25.0%);
UNIVERSITÉ PARIS-SUD (25.0%) y
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ZITVOGEL, LAURENCE;
GOMPERTS BONECA, IVO;
LEPAGE, PATRICIA;
VIAUD, SOPHIE y
DAILLIERE, ROMAIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 764 282 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

Composición de microbiota, como marcador de sensibilidad a la quimioterapia y uso de moduladores microbianos (prebióticos, probióticos o simbióticos) para mejorar la eficacia de un tratamiento contra el cáncer

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo del tratamiento anticanceroso. En particular, la presente invención se refiere al papel de la microbiota en la eficacia de los tratamientos contra el cáncer y proporciona procedimientos para
10 determinar si es probable que un paciente se beneficie de un tratamiento contra el cáncer, así como a probióticos para mejorar la eficacia de dicho tratamiento en pacientes que los necesitan.

ANTECEDENTES Y TÉCNICA ANTERIOR

15 Los tratamientos convencionales contra el cáncer incluyen una combinación de tratamientos con quimioterapia, cirugía, terapia hormonal y / o radioterapia para erradicar las células neoplásicas en un paciente. La quimioterapia contra el cáncer se basa en el uso de fármacos que matan las células en replicación, con suerte más rápido que los agentes que matan las células normales del paciente. La cirugía se utiliza para reducir el volumen del tumor, pero tiene poco impacto una vez que el cáncer ha hecho metástasis. La radiación es efectiva solo en un área localizada.
20 Todos estos enfoques presentan importantes inconvenientes y riesgos adicionales, como el aumento de la susceptibilidad a las infecciones.

Otro enfoque de la terapia contra el cáncer es abordar el sistema inmunológico (inmunoterapia) en lugar de o además de abordar el propio tumor.

25

Sin embargo, a pesar de los avances en la detección y el tratamiento, muchos protocolos terapéuticos hacen solo una pequeña contribución a las tasas de supervivencia, lo que cuestiona la rentabilidad y el impacto en la calidad de vida de dichos tratamientos.

30 Recientemente, se ha descrito la importante contribución del sistema inmunitario innato y adaptativo a los efectos antitumorales de los tratamientos contra el cáncer basados en la quimioterapia convencional y la radioterapia (Kroemer y col., 2013; Zitvogel y col., 2008).

Ahora se reconoce que las bacterias comensales intestinales influyen profundamente en la inmunidad de los
35 mamíferos (Hooper y col., 2011). La disbiosis intestinal, que constituye un desequilibrio en el ecosistema bacteriano, puede llevar a una representación excesiva de algunas bacterias capaces de promover la carcinogénesis de colon favoreciendo la inflamación crónica o la inmunosupresión local (Grivennikov y col., 2012; Wu y col., 2009). Sin embargo, se desconocen los efectos de la disbiosis microbiana en los cánceres no gastrointestinales.

40 Los quimioterapéuticos anticancerosos a menudo causan mucositis (una lesión debilitante de la barrera mucosa asociada con la translocación bacteriana) y neutropenia, dos complicaciones que requieren tratamiento con antibióticos, que a su vez pueden causar disbiosis (Ubeda y col., 2010; van Vliet y col., 2010).

Por lo tanto, existe una necesidad imperiosa de desarrollar mejores tratamientos para el cáncer que favorezcan una
45 interacción constructiva, si no una sinergia, entre tratamientos como la quimioterapia y / o la radiación y la inmunidad.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En este contexto, los autores de la invención observaron que la ciclofosfamida (CTX) altera la composición de la
50 microbiota del intestino delgado en ratones y provoca la translocación de especies seleccionadas de bacterias Gram+ en órganos linfoides secundarios. Aquí, estas bacterias estimulan la generación de un subconjunto específico de células "patógenas" T cooperadoras 17 (pTh17) y las respuestas inmunitarias Th1 de memoria. Los autores de la invención también demostraron que los ratones u hospedadores libres de gérmenes tratados con antibióticos que matan a las bacterias Gram+ mostraban respuestas reducidas de pTh17 y quimiorresistencia relativa a CTX a
55 menos que se transfirieran de forma adoptiva con células pTh17. Además, la disbiosis interfirió en la actividad de otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer (como las antraciclinas y el oxaliplatino). Estos resultados revelan un papel crucial de la microbiota intestinal en la configuración de la respuesta inmune contra el cáncer. Estos resultados, así como otros resultados relacionados con la interacción entre la microbiota intestinal y los tratamientos antineoplásicos, se muestran en varias publicaciones recientes (Dzutsev y col., 2014; Viaud y col., Cancer Res.,
60 2014; Viaud y col., Cell Death Differ., 2014 y Viaud y col., Oncoimmunology, 2014).

La presente invención proporciona una composición probiótica que puede usarse como adyuvante para un

tratamiento antineoplásico administrado a un paciente con cáncer, donde dicha composición probiótica comprende bacterias seleccionadas de entre *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii*, bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella*, *Holdemania* y mezclas de las mismas.

5 Otro aspecto es el uso de una combinación de un agente quimioterapéutico y de una composición antibiótica que disminuye la proporción de firmicutes / bacteroidetes o aumenta específicamente las SFB y / o la *Porphyromonadaceae* y / o disminuye el grupo IV de *Clostridium* en la microbiota intestinal de un individuo cuando se administra a dicho individuo, para tratar a un paciente que tiene un cáncer.

10 La descripción también se refiere al uso de una composición antibiótica como las descritas anteriormente, para modular la microbiota intestinal de un paciente para potenciar los efectos anticancerosos de un agente quimioterapéutico administrado a dicho paciente.

Una composición inmunogénica que comprende fragmentos de bacterias seleccionadas de entre el grupo que
15 consiste en *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii*, *Enterococcus faecalis*, bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella*, *Holdemania* y mezclas de las mismas también es parte de la presente invención, así como su uso como adyuvante para un tratamiento antineoplásico administrado a un paciente con cáncer.

La descripción se refiere además a las composiciones celulares y su uso en la transferencia de células adoptivas en
20 combinación con un agente quimioterapéutico. Una primera composición celular comprende células presentadoras de antígeno (CPA) que se han pulsado *ex vivo* con una composición probiótica o con una composición inmunogénica como se describe anteriormente, y una segunda composición celular comprende células T de memoria obtenidas mediante un procedimiento que comprende células T de contacto *ex vivo* de un paciente con cáncer con una primera composición celular como se definió anteriormente.

25 La descripción también proporciona un procedimiento *in vitro* para identificar a un paciente que probablemente sea un buen respondedor a una quimioterapia, que comprende determinar la funcionalidad de TLR 4, NOD1 y NOD2 en dicho paciente, donde si dicho paciente carece de un TLR 4 y / o NOD1 y / o NOD2 funcional, el paciente se identifica como un buen respondedor a una quimioterapia.

30 La descripción también proporciona un procedimiento para determinar *in vitro* si un paciente con cáncer puede beneficiarse de un tratamiento antineoplásico, que comprende las siguientes etapas:

(i) de una muestra biológica apropiada de dicho paciente, por ejemplo, obtenida de una biopsia de duodeno o
35 mucosa de íleon o de una muestra fecal del paciente, que determina la abundancia relativa de bacterias «desfavorables» en el contexto específico del tratamiento del cáncer, por ejemplo, bacterias de un grupo que comprende o consiste en las especies *Parabacteroides distasonis* y *Faecalibacterium prausnitzii* y los géneros *Gemmiger*, *Alistipes* y *Clostridium* grupo IV en la microbiota intestinal de dicho paciente;

40 (ii) determinar la presencia o ausencia de una disbiosis intestinal; donde una disbiosis intestinal con una representación excesiva de bacterias «desfavorables» indica que el paciente no responderá bien al tratamiento antineoplásico.

La descripción también proporciona un procedimiento para determinar *in vitro* si se debe continuar o detener un
45 tratamiento antineoplásico para un paciente con cáncer, que comprende las siguientes etapas:

(i) de una muestra biológica de dicho paciente, como una muestra de sangre obtenida de 3 a 9 semanas, preferentemente de 6 a 9 semanas después del inicio de dicho tratamiento antineoplásico, analizar la respuesta de las células T CD4⁺ de memoria dirigida contra al menos una especie comensal de bacterias, por ejemplo, contra la *L.*
50 *johnsonii*, *E. hirae* y / o *E. Faecalis*;

(ii) para cada especie comensal con respecto a la cual se analiza la respuesta de las células T CD4⁺, clasificando la respuesta en una de las siguientes categorías:

- respuesta de las células T CD4⁺ sin memoria;

55 - respuesta de memoria de un fenotipo Th10;

- respuesta de memoria de un fenotipo Th1,

60 donde sí se observa una respuesta de memoria de un fenotipo Th1 para al menos una especie comensal, el tratamiento antineoplásico continúa y, en ausencia de dicha respuesta, el tratamiento antineoplásico se detiene.

La clasificación de la respuesta se puede realizar, por ejemplo, comparando la secreción de citoquinas antes y después del tratamiento en ensayos de reestimulación *ex vivo*.

La presente descripción también se refiere a un procedimiento para determinar *in vitro* los efectos biológicos de un tratamiento antineoplásico neoadyuvante que se ha administrado a un paciente, que comprende las siguientes etapas:

- (i) de una muestra biológica apropiada de dicho paciente, por ejemplo, obtenida de una biopsia de duodeno o mucosa del íleon del paciente, determinando la abundancia relativa de bacterias de un primer grupo que comprende géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en dicha microbiota;
- (ii) a partir de la misma muestra biológica, determinar la abundancia relativa de bacterias de un segundo grupo que comprende *Parabacteroides distasonis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Gemmiger*, *Alistipes* y *Clostridium* grupo IV en dicha microbiota intestinal;
- (iii) calcular la relación entre la abundancia de bacterias del primer grupo y la abundancia de bacterias del segundo grupo,

donde si dicha relación está por encima de un umbral predeterminado, el resultado indica que el tratamiento antineoplásico neoadyuvante indujo una respuesta inmune local y sistémica T-bet/Th1.

- Otro objeto de la presente invención es una cepa bacteriana probiótica seleccionada de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (especialmente la cepa CNCM I-4823), *Enterococcus hirae* (especialmente la cepa CNCM 1-4815) y *Enterococcus faecalis*, para su uso en combinación con un agente antineoplásico para inducir una respuesta inmune sistémica y local de T-bet/Th1, así como una composición que comprende el mismo.
- La descripción también se refiere a la transferencia de células adoptivas de una célula obtenida estimulando células T CD4+ sin tratamiento previo de un paciente con cáncer en presencia de una mezcla de IL-1 β , IL-6 e IL23, en dicho paciente con cáncer, en combinación con un tratamiento antineoplásico, para el tratamiento del cáncer.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

- Figura 1: La ciclofosfamida altera la integridad de la mucosa intestinal.**
(A-B). Tinción con hematoxilina-eosina del epitelio del intestino delgado a las 48 h posteriores a la terapia con NaCl (Co) o CTX o doxorubicina (Doxo) en ratones sin tratamiento previo C57BL/6 (A). El número de focos inflamatorios representados / mm (B, panel izquierdo, indicado con una punta de flecha en A), el espesor de la lámina propia que refleja el edema (B, panel central, indicado con # en A) y la longitud reducida de las vellosidades (B, panel derecho, indicado con una punta de flecha en A) se midieron en 5 íleones sobre 100 vellosidades / íleon de ratones tratados con CTX o Doxo. **(C).** En los ratones tratados con vehículo y CTX o Doxo (paneles de la izquierda) se muestra una microfotografía representativa de una vellosidad ileal que contiene las típicas células caliciformes que contienen mucina. El número de células caliciformes / vellosidades se enumeró en el panel derecho para ambos agentes quimioterapéuticos. **(D).** La tinción específica de las células de Paneth se muestra en dos microfotografías de inmunofluorescencia representativas (D, paneles de la izquierda). La cuantificación de las células de Paneth se realizó midiendo el área promedio de los grupos de lisozima positiva en 6 íleones recolectados de ratones tratados con NaCl (Co) o CTX a las 24-48 horas. **(E).** Análisis cuantitativo de PCR (qPCR) de los niveles de transcripción de lisozima M y RegIII γ en células de lámina propia de duodeno e íleon de ratones tratados con CTX a las 18 horas. Media \pm SEM de deltaCT normalizado de 3-4 ratones / grupo concatenados a partir de tres experimentos independientes. **(F).** Ensayos de permeabilidad intestinal *in vivo* que miden 4 kDa de acumulación de plasma de isotiocianato de fluoresceína (FITC) - dextrano a las 18 horas después de CTX en dos dosis. Gráfico que muestra todos los datos de cuatro experimentos independientes, representando cada punto un ratón (n = 13-15). Los datos fueron analizados con la prueba t. *, p < 0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001.

- Figura 2: La ciclofosfamida induce disbiosis microbiana asociada a la mucosa y translocación bacteriana en órganos linfoides secundarios.**

- (A-B).** A las 48 horas posteriores a CTX o Doxo, se cultivaron nódulos linfáticos mesentéricos (mLN) y células de bazo de ratones sin tratamiento previo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y se enumeraron las colonias (A) de cada ratón tratado con NaCl (Co) (n = 10-16), CTX (n = 12-27) o Doxo (n = 3-17) (3-4 experimentos) y se identificaron por espectrometría de masas (B). En los controles de NaCl, los intentos de identificación bacteriana fracasaron y dieron un 67 % *Lactobacillus murinus* (no mostrado). Los datos fueron analizados con la prueba t. **(C).** La composición microbiana (nivel de género) se analizó mediante 454 pirosecuenciaciones del gen 16S rRNA de íleones e intestinos ciegos de ratones sin tratamiento previo y portadores de tumores B16F10. Los análisis de componentes principales (CPA) destacaron la agrupación específica de microbiota de ratones (cada punto representa un ratón) según el tratamiento (NaCl: Co, puntos grises; tratados con CTX, puntos negros). Se aplicó una prueba de clasificación de Monte Carlo para evaluar la importancia de estos agrupamientos. **(D).** Se realizaron

análisis de PCR cuantitativa (qPCR) de varios grupos bacterianos asociados con la mucosa del intestino delgado en ratones portadores de tumores tratados con CTX o NaCl (Co), sin tratamiento previo o MCA205. Se calcularon los valores absolutos para bacterias totales, *Lactobacilos*, *Enterococos* y *Clostridium* grupo IV y se normalizaron por la dilución y peso de la muestra. Las curvas estándar se generaron a partir de diluciones en serie de una concentración conocida de ADN genómico de cada grupo bacteriano y representando los ciclos de umbral (Ct) frente a la cantidad de bacterias (UFC). Los puntos debajo de las líneas de puntos estaban por debajo del umbral de detección. Los datos fueron analizados con el modelo lineal o modelo lineal generalizado. *, $p < 0,5$, **, $p < 0,1$, ***, $p < 0,001$, ns, no significativo.

10 Figura 3: Los efectores pTh17 inducidos por CTX y las respuestas Th1 de memoria dependen de la microbiota intestinal.

(A). Esplenocitos de CTX frente a animales tratados con NaCl criados en condiciones libres de gérmenes (GF) o libres de patógenos específicos (SPF) convencionales (panel izquierdo) y tratados o no con ATB o vancomicina (Vanco) (panel derecho) se entrecruzaron utilizando anti-CD3+anti-CD28 Ab durante 48 h. IL-17 se midió mediante ELISA. Se presentan de dos a 3 experimentos que contienen 2-9 ratones / grupo, donde cada punto representa un ratón. (B). Correlaciones entre la cantidad de grupos bacterianos mucosos específicos y la firma Th17 del bazo. Cada punto representa un ratón sin tumor (puntos redondos), un melanoma B16F10 (puntos en forma de rombos) o un sarcoma MCA205 (puntos cuadrados), puntos abiertos que ilustran ratones tratados con NaCl y puntos completos que indican los animales tratados con CTX. (C). Los análisis intracelulares de esplenocitos recopilados de ratones no portadores de tumores después de 7 días de tratamiento con NaCl o CTX, bajo régimen de ATB o agua como control. Medios±SEM de porcentajes de células IFN γ ⁺ Th17, células T-bet⁺ entre células ROR γ ⁺ CD4⁺ T y células CXCR3⁺ entre células CCR6⁺CD4⁺ T en 2 a 8 experimentos independientes, donde cada punto representa un ratón. (D) Tinción intracelular de los esplenocitos totales recogidos 7 días después del tratamiento con CTX de ratones sin tratamiento previo reconstituidos oralmente con las especies bacterianas indicadas después del tratamiento con ATB. (E). 7 días después del tratamiento con CTX o NaCl (Co), las células esplénicas T CD4⁺ fueron reestimuladas ex vivo con células dendríticas de la médula ósea (BM-DC) cargadas con cantidades decrecientes de bacterias durante 24 horas. Se muestra la liberación de IFN γ , controlada por ELISA. Se indica el número de ratones respondedores (según el umbral de referencia de NaCl) del número total de ratones analizados (n). Las comparaciones estadísticas se basaron en la prueba t pareada. Los datos se analizaron mediante regresión beta o modelo lineal y análisis de correlación del tau de Kendall modificado. *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$, ns, no significativo.

Figura 4: La vancomicina atenúa la diferenciación de pTh17 inducida por CTX, que es obligatoria para la actividad tumoricida de la quimioterapia.

(A). Después de un tratamiento previo de 3 semanas de duración con ATB de amplio espectro, los ratones DBA2 se inocularon con mastocitomas P815 (día 0), se trataron en el día 6 con CTX (flecha) y se monitorizó el crecimiento del tumor. La cinética del crecimiento del tumor se muestra en la Fig. 13A y los porcentajes de ratones libres de tumor en el sacrificio se representan para dos experimentos de 11-14 ratones / grupo. (B). El sarcoma MCA205 se inoculó en el día 0 en ratones libres de patógenos específicos (SPF) o libres de gérmenes (GF) que se mono-asociaron opcionalmente con bacterias filamentosas segmentadas (SFB), se trataron con CTX (flecha) y se controlaron las cinéticas de crecimiento (medios±SEM). Se muestra un experimento representativo (n = 5-8 ratones / grupo) de dos a tres para ratones GF y dos experimentos agrupados (n = 14 ratones / grupo) para ratones SPF (C). Después de 3 semanas de acondicionamiento con vancomicina o colistina, los ratones C57BL/6 se inocularon con sarcomas MCA205 (día 0), se trataron en el día 12-15 con CTX (flecha) y se monitorizó el crecimiento del tumor. Se muestran los datos concatenados (n = 15-20 ratones / grupo) de dos experimentos independientes para el tratamiento con colistina y un experimento representativo (n = 6 ratones / grupo) para el tratamiento con vancomicina. (D). Ratones KP de ocho semanas de edad (*Kras*^{LSL-G12D/WT}; *p53*^{F1^x/F1^x}) recibieron un adenovirus que expresaba la recombinasa Cre (AdCre) por instilación intranasal para iniciar un adenocarcinoma de pulmón (d0). La vancomicina se inició para un subgrupo de ratones ("Quimio + Vanco") en d77 posterior a AdCre. Una semana después del inicio de la vancomicina, la quimioterapia basada en CTX se aplicó inmunoprecipitación a ratones que solo recibieron quimioterapia ("Quimio") o los que recibieron en paralelo vancomicina ("Quimio + Vanco"). Los ratones recibieron quimioterapia en d84, d91 y d98. Un grupo de control se dejó sin tratar ("Co"). Los datos muestran la evolución de los volúmenes totales de tumores de pulmón (media ± SEM) evaluados por imágenes no invasivas entre d73 y d100 en 6-12 ratones / grupo. (E). Como en la Fig. 3C, se determinó el número de células pTh17 en bazo de ratones no tratados o tratados con vancomicina que tenían tumores MCA205 establecidos (15-17 días), 7 días después del tratamiento con CTX. Cada punto representa un ratón de 2 experimentos agrupados. (F). Se realizaron análisis de citometría de flujo de células CD3⁺ y CD4⁺IFN γ ⁺ T mediante el paso de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) vivos en CD45⁺ extraídos de tumores MCA205 establecidos a partir del día 18 (8 días después de CTX) en ratones tratados con vancomicina y agua. Cada punto representa un ratón de hasta 4 experimentos agrupados. (G). Los tumores MCA205 establecidos en ratones WT tratados previamente durante 3 semanas con agua o vancomicina se inyectaron con CTX (flecha) y se monitorizó el crecimiento del tumor. En el día 7 posterior al CTX, se inyectaron por

vía intravenosa 3 millones de células Th17 o pTh17 CD4⁺ T generadas *ex vivo*. Se agruparon hasta tres experimentos que comprendían de 2 a 10 ratones / grupo. Los datos fueron analizados con la prueba t, el modelo lineal o el modelo lineal generalizado. *, $p < 0,5$, **, $p < 0,1$, ***, $p < 0,001$, ns, no significativo.

5 Figura 5: Falta de disbiosis a las 24 o 48 h posterior a CTX.

(A). Composición general de la microbiota intestinal según se evaluó mediante 454 pirosecuenciaciones de alto rendimiento del gen 16S rRNA en diversos puntos temporales (0, 24, 48 horas después de CTX). Cada columna representa datos de una microbiota de la mucosa del intestino delgado de un ratón, t0 (antes de la inyección de CTX), t24 y t48 (24 y 48 horas después de CTX). Se indica el gradiente positivo de representatividad de distintos géneros (mapa de calor de la transformación Log₁₀). Análisis estadísticos: ns entre t0 y t24 o t48 horas. (B-C). Ejemplo detallado de los datos de pirosecuenciación para *Clostridium* sp. clon 40 y para *L. reuteri*. Análisis de qPCR de cantidades extraordinarias de *Lactobacilos* como se detalla en Materiales y procedimientos.

15 **Figura 6: Distribución de géneros bacterianos en el íleon de ratones tratados con CTX.** Mapa de calor de la transformación Log₁₀ de la abundancia relativa del género en el intestino delgado de NaCl (Co) y animales tratados con CTX. Antes de la terapia con CTX, los tumores se inocularon en un subgrupo de animales (TB+). Sólo se presentan los géneros bacterianos que representan más del 0,05 % de la microbiota total. La transformación log₁₀ aplicada en los datos de abundancia relativa se ha explicado en la sección de Materiales y procedimientos de la microbiota. No se ha aplicado ningún procedimiento de agrupamiento específico para la construcción del mapa de calor. Se calculó el delta promedio de porcentajes entre Co y CTX para cada género para reordenar los géneros bacterianos.

La CTX indujo una reducción de grupos bacterianos de filo de *Firmicutes* repartidos en cuatro géneros y grupos (*Clostridium* grupo XIVa, *Roseburia*, *Lachnospiraceae* sin clasificar, *Coprococcus*, Tabla 2) en la mucosa de animales tratados con CTX. La CTX también se asoció con una reducción en la proporción de filos de *Espiroquetas* ($p = 0,016$), en particular el género *Treponema* (0,025 % en NaCl frente al 0 % en el grupo de CTX; $p = 0,016$). A nivel de especies, algunas bacterias estaban se representaron en exceso (como la *Lactobacillus reuteri*) o se representaron en defecto (como la *Clostridium* sp. clon 40 y varios otros productores de butirato de la familia de las *Lachnospiraceae* y de *Clostridium* grupo XIVa) posterior a la CTX (Fig. 2B). La bacteria filamentososa segmentada X77814 (SFB) no reveló un enriquecimiento constante en ratones tratados con CTX en comparación con los controles (7,95 % de SFB en CTX frente al 0,83 % en controles de vehículo, $p = 0,08$, Tabla 2). Prueba de Wilcoxon: *, $p < 0,05$ en Co frente al CTX en grupos TB⁺, ‡, $p < 0,05$ en Co frente a la CTX en grupos TB⁺.

Figura 7: Pérdida de CD103⁺CD11b⁺ y células Th17 en la lámina propia duodenal y polarización Th1 de esplenocitos en correlación con especies bacterianas del intestino delgado.

(A). Subconjuntos de células dendríticas (DC) en LP del intestino delgado. Análisis de citometría de flujo y cuantificación de varios subconjuntos de DC que residen en LP de intestino grueso en el día 0, día 3 y día 7 después de la inyección de CTX. El gráfico muestra las medias + SEM de los porcentajes de DC en 7 ratones / punto temporal en dos experimentos concatenados. Los subconjuntos de DC de intestino grueso no se vieron afectados por CTX (no se muestra). Los datos fueron analizados con la prueba t de Mann Whitney. (B-C). Modulaciones de células Th17 siete días después del CTX. (B) Análisis de citometría de flujo de linfocitos separados del LP de duodeno e íleon, recolectados de ratones tratados con NaCl frente a los tratados con CTX. Los gráficos representan los datos concatenados de ocho experimentos independientes, donde cada punto representa un experimento. Las comparaciones estadísticas se basaron en la prueba de Wilcoxon. (C). Panel izquierdo: una imagen de micrografía de la tinción de inmunofluorescencia del íleon en NaCl frente a ratones tratados con CTX. Células $\gamma\delta$ TCR⁺ se tiñeron en verde (Alexa Fluor 488) utilizando un Ab anti- $\gamma\delta$ TCR y células CD3⁺ T se tiñeron en azul (Alexa Fluor 647) utilizando Ab anti-CD3. Panel derecho: dos investigadores independientes realizaron la enumeración de células positivas en 100 vellosidades en tres íleones. (D). Polarización Th1 de esplenocitos en el día 7 después de la inyección de CTX. Los esplenocitos de los animales tratados con CTX frente a NaCl criados en condiciones de GF o SPF convencionales (panel izquierdo) y tratados o no con ATB o vancomicina (panel derecho) se entrecruzaron utilizando Ab anti-CD3±anti-CD28 durante 48 h. Los niveles de IFN γ se monitorizaron en sobrenadantes de 48 horas mediante ELISA. Se presentan tres experimentos que contienen de 2 a 9 ratones / grupo, donde cada punto representa un ratón. Los datos de (C) y (D) fueron analizados con la prueba t. (E). Igual que en la Fig. 3C, pero se analizaron las correlaciones entre cada grupo bacteriano y el perfil secretor de IFN γ como se muestra en la Fig. 6 (C) en portadores de tumores sin tratamiento previo, B16F10 o MCA205. (F). Análisis representativo de la citometría de flujo del diagrama de puntos de células pTh17 esplénicas como se enumera en la Fig. 3C en el día 7 después de la CTX. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ns, no significativo.

Figura 8: La doxorrubicina no logró inducir células pTh17 en el bazo y no requiere comensales intestinales para reducir el crecimiento del tumor.

(A-B). Fallo de la doxorubicina (Doxo) en la inducción de la IL-17 esplénica que produce células CD4⁺ T. La Doxo se inyectó por inmunoprecipitación en ratones según las dosis indicadas (A) o según una dosis fija de 50 µl a 2 mM (siendo 3 mg / kg para un ratón que pesa 20 g) (B), y los esplenocitos se recuperaron 7 días después para evaluar la producción de IL-17 en respuesta a 48 horas de reticulación anti-CD3 / anti-CD28 (A, B) o se determinó la frecuencia de células con un fenotipo CD4⁺T-bet⁺RORγt⁺ mediante citometría de flujo (B). La ciclofosfamida (CTX) utilizada a una dosis de 100 mg / kg se usó como control positivo. Opcionalmente, las células T reguladoras se agotaron mediante inyecciones (250 µg, 1 y 3 días antes de la administración de Doxo) de Ab anti-CD25 y se usó como control un Ab de control irrelevante de isotipo correspondiente. (C). Efectos antitumorales de la doxorubicina contra MCA205 establecido en ratones libres de patógenos específicos (SPF), tratados con antibióticos (ATB) y libres de gérmenes. La cinética del crecimiento del tumor (tamaño medio ± SEM) se representa en 2 a 3 experimentos combinados que incluyen de 4 a 6 animales / grupo. Los datos fueron analizados con la prueba t, el modelo lineal o el modelo lineal generalizado. *, p < 0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001, ns, no significativo.

Figura 9: Eficacia del amplio espectro de ATB en el agotamiento bacteriano de las heces de ratones sin tratamiento previo o portadores de tumores.

Se recolectaron heces frescas de ratones que se dejaron sin tratar o se trataron con ATB de amplio espectro en varios puntos temporales y se colocaron en placas de agar sangre para condiciones aeróbicas y anaeróbicas, así como en placas de agar DCO (BioMérieux) para el crecimiento específico de enterococos. Después de 48 h de cultivo, se enumeraron las colonias aisladas. Todos los ratones de cada experimento distinto han sido monitoreados y calificados de esta manera. Se muestra un seguimiento representativo.

Figura 10: La diferenciación de pTh17 inducida por CTX depende de Myd88 pero no de Nod1/2.

(A). Análisis de citometría de flujo de linfocitos recogidos de NaCl frente a WT tratados con CTX (como en la Fig. 3C) o *Nod2*^{-/-} frente a ratones *Myd88*^{-/-} reestimulados 4 horas con PMA / ionomicina (utilizando tinciones intracelulares y extracelulares con Ac anti-CD3, CD8, IFNγ e IL-17). La gráfica muestra los porcentajes medios de células positivas IFNγ⁺ entre células IL-17⁺CD4⁺ T de dos experimentos independientes, donde cada punto representa un ratón. (B). *Nod1* y *Nod2* son prescindibles para la reducción del crecimiento tumoral inducido por CTX. Los tumores MCA205 se establecieron en ratones WT o *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} antes de la administración, en los días 5 y 12, de CTX. La cinética de crecimiento tumoral (medias ± SEM) se monitorizó en 5 animales / grupo. Dos experimentos independientes dieron resultados similares. Los datos fueron analizados con la prueba t, el modelo lineal o el modelo lineal generalizado. ***, p < 0,001, ns, no significativo.

Figura 11: Inmunización contra bacterias comensales posterior a la CTX.

(A-C). *Recuperación de células CBir Tg T en ratones congénicos después de CTX.* Un millón de células B6.CD45.1⁺ CBir1 TCR Tg CD4⁺ T sin tratamiento previo se transfirieron de forma adoptiva por vía intravenosa en ratones congénicos receptores WT CD45.2 sin tratamiento previo que se trataron, un día después, con NaCl o CTX y se sacrificaron 7 días después para el análisis FACS de los esplenocitos y para la reestimulación *ex vivo* con péptidos específicos de CBir1. La selección de células CD45.1 permitió analizar los porcentajes de recuperación o proliferación de células CBir1 Tg T (A, media ± SEM para 5 animales) y analizar la producción de IL-17 e IFNγ utilizando tinción intracelular después de 6 h de activación de PMA / ionomicina. Se muestra una gráfica de puntos representativa para un animal en B. Los esplenocitos se reestimularon durante 24 h con el péptido específico de CBir1 o un péptido irrelevante de control. ELISA comercial monitorizó las concentraciones de IFNγ en los sobrenadantes (C). Se realizaron tres experimentos que abarcan 4 a 5 animales / grupo. Prueba t de Mann Whitney: **, p < 0,01.

Figura 12: Bacterias translocadas procesadas y presentadas por células dendríticas conducen a la polarización de células T CD4⁺ sin tratamiento previo *in vitro*. *Diferenciación ex vivo de células Th17/Th1 con bacterias translocadas.* Superposición cruzada entre BMDC cargadas con varias bacterias y CD4⁺T sin tratamiento previo durante 4 días. Monitoreo de las concentraciones de citoquinas IL-17 (izquierda) o IFNγ (derecha) mediante ELISA comercial. Cada punto representa un experimento *in vitro* realizado en pocillos triplicados. Se realizaron y se representan once experimentos, prueba t: *, p < 0,5, **, p < 0,01, ns, no significativo.

Figura 13: La microbiota intestinal afecta la eficacia de la quimioterapia.

(A). *El agotamiento bacteriano por ATB redujo la quimiosensibilidad de los mastocitomas establecidos.* El día 6, ratones DBA2 portadores de P815 tratados previamente o no durante 3 semanas con ATB de amplio espectro se inocularon por inmunoprecipitación con 100 mg / kg de CTX y se monitorizó el crecimiento del tumor hasta el sacrificio. Se muestran las cinéticas de crecimiento para cada ratón individual en agua frente a ratones tratados con ATB en uno de tres experimentos representativos. (B). *La vancomicina redujo la eficacia de CTX frente a los*

sarcomas MCA205. Los ratones C57BL/6 portadores de MCA205 del día 10 tratados previamente o no durante 3 semanas con vancomicina se inocularon por inmunoprecipitación con 100 mg / kg de CTX y las superficies tumorales, así como las tasas de rechazo del tumor se monitorizaron durante un mes. Se muestran las cinéticas de crecimiento para cada ratón individual en agua frente a ratones tratados con vancomicina en uno de dos experimentos representativos, mientras que los porcentajes de ratones libres de tumor se indican entre paréntesis.

Figura 14: *Parabacteroides distasonis* y quimiorresistencia.

- (A). La monoasociación con *Parabacteroides distasonis* indujo la quimiorresistencia de los sarcomas establecidos. Los ratones criados convencionalmente se trataron durante 2 semanas con antibióticos de amplio espectro (ATB), se inocularon con MCA205 durante 7 días y luego se trataron con doxorrubicina. En este experimento particular, las heces fueron contaminadas por una sola especie bacteriana identificada como *P. distasonis* mediante el sistema automatizado VITEK® y MALDI-TOF. La cinética de crecimiento tumoral (media \pm SEM) reveló que el ATB combinado con contaminación por *P. distasonis* indujo un estado de quimiorresistencia al cáncer *in vivo* (n = 4-5 ratones / grupo) (B). Los ratones criados convencionalmente se trataron durante 3-4 semanas con ATB, se implantaron 4 días con MCA205 y luego se inocularon por vía oral con *P. distasonis* que monocolonizó las heces. En el día 6 después de la inoculación del tumor, los ratones se trataron con doxorrubicina. Se monitorizó la cinética de crecimiento tumoral entre ratones tratados con ATB reconstituido o no reconstituido de *P. distasonis* después de la doxorrubicina (media \pm SEM) en 8-12 ratones / grupo. Los datos fueron analizados con el modelo lineal o modelo lineal generalizado. *p < 0,05, ***p < 0,001.

Figura 15: Perfil transcripcional de Th17 y pTh17 generadas *ex vivo* en comparación con las células CD4⁺ T esplénicas inducidas por CTX.

- Las células T sin tratamiento previo se estimularon con anticuerpos unidos a la placa frente a los Ac anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia (Th0) o presencia de IL-1 β recombinante de ratón (10 ng / ml) + IL-6 (10 ng / ml) + IL-23 (20 ng / ml) (como para las células "pTh17") o con rTGF- β (2,5 ng / ml) + IL-6 (como para las células "Th17"). Se muestra el perfil transcripcional de células Th17, pTh17 generadas *in vitro* (A), así como células CD4⁺ T derivadas esplénicas generadas *ex vivo* recopiladas después de NaCl o CTX (B). La RT-PCR cuantitativa se realizó con sondas específicas que detectaban factores de transcripción y citoquinas que definían la polarización de Th1 frente a Th17.

Figura 16: Microbiota microbiana resistente a la vancomicina.

- Los comensales fecales de los portadores de tumores que se dejaron sin tratar o se trataron con vancomicina se colocaron en placas, se enumeraron e identificaron como se especifica en Materiales y procedimientos para analizar el número de colonias resistentes. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes realizados en dos instalaciones animales diferentes (CGFL, Dijon frente a IGR, Villejuif).

- Figura 17. Los antibióticos afectan la acumulación inducida por quimioterapia de linfocitos infiltrantes de tumores $\gamma\delta$ T17.** Los sarcomas MCA205 se trataron con quimioterapia el día 10 y se recolectaron el día 18 para realizar un fenotipo de citometría de flujo de células T $\gamma\delta$ infiltrantes de tumores que producen IL-17. Los porcentajes de TCR $\gamma\delta$ IL-17⁺ entre leucocitos vivos CD45⁺ se representan en cada grupo tratado o no con vancomicina o ATB de amplio espectro. Cada grupo contenía de 6 a 21 ratones. Prueba t' de Student: **, p < 0,01, ***, p < 0,001.

- Figura 18: Las respuestas inmunes celulares primarias Th1 y Tc1 contra OVA de pollo no se ven afectadas por el régimen de antibióticos en ratones sin tratamiento previo de tipo salvaje.** Los ratones C57B1/6 se trataron previamente durante 8-10 días con diversos regímenes de antibióticos, incluidos antibióticos de amplio espectro (ATB), colistina (Coli) o vancomicina (Vanco), controlados mediante el cultivo de heces en distintos momentos y luego se inmunizaron en la almohadilla plantar con 1 mg de OVA mezclado con 50 μ g de Poli (I:C) tres días después de la administración de CTX por inmunoprecipitación. En el día 5 después de la vacuna, los ganglios linfáticos de drenaje poplíteo e inguinal se recolectaron y se reestimularon con proteína OVA (panel izquierdo) o péptidos SIINFEKL (panel derecho) a 1 mg y 10 μ g / ml, respectivamente. La liberación de IFN γ se controló a las 72 horas en los sobrenadantes mediante ELISA. Cada punto representa un ratón, y la media de pocillos triplicados de reestimulación *in vitro*. Los análisis estadísticos se realizaron en una prueba t pareada en comparación con o frente a la reestimulación sin antígeno para capturar las respuestas de efector / memoria específicas de Ag. **, p < 0,01, ***, p < 0,001, ns: no significativo.

- Figura 19: Tratamiento de ratones KP portadores de adenocarcinoma de pulmón mediante quimioterapia.** Ratones KP de ocho semanas de edad (*Kras*^{LSL-G12D/WT}; *p53*^{F1⁺/F1⁺}) recibieron un adenovirus que expresaba la recombinasa Cre (Ad-cre) por instilación intranasal para iniciar el adenocarcinoma de pulmón (d0). Los ratones se dejaron sin tratar («Co») o recibieron quimioterapia (d84, d91 y d98) en ausencia («Quimio») o la presencia de 0,25 mg / ml de vancomicina («Quimio + Vanco») (mezclada con agua potable en d77 posterior a Ad-cre y hasta el final

del experimento; el agua que contiene antibióticos se reemplazó cada dos semanas). **A.** Los volúmenes tumorales se cuantificaron en d73 y 100 (equivalente de quimioterapia 'previa' y 'posterior') en ratones anestesiados mediante imagenología no invasiva como se describió anteriormente (Cortez-Retamozo y col., Immunity, 2012). Los datos muestran cambios absolutos en los volúmenes totales de tumores de pulmón (media \pm SEM) entre los dos momentos. Es de destacar que los antibióticos no tuvieron un impacto en la progresión natural de esta enfermedad (no se muestra). **B.** La relación CD8/Treg se determinó mediante mediciones de citometría de flujo en muestras de tejido pulmonar disociado derivadas de los grupos respectivos. También se investigó un grupo de ratones libres de tumor («Sin tumor»). $n \geq 6$ ratones por cada grupo; *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ (prueba t bilateral no asociada de dos colas).

Figura 20: Las respuestas inmunitarias Th1 y Th10 inducidas por CTX dirigidas contra bacterias comensales en pacientes con cáncer.

Ensayos de reestimulación *ex vivo* mediante monocitos autólogos de pacientes cargados con bacterias definidas durante 3 horas, neutralizados con antibióticos, y luego cultivados en GM-CSF+IL-4 (para diferenciarlos en DC) e incubados durante 3 días con células CD4⁺CD45RO⁺ T (en una relación de 1:2) purificadas a partir de sangre autóloga en varios momentos (Día 0: antes de CTX, Día 12-46: después de CTX, NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas). **A.** Se monitorizó la liberación de citoquinas (IFN γ , TNF, IL-10) mediante ELISA. Los números (A, panel izquierdo) y los porcentajes (A, panel derecho) de pacientes que muestran al menos un aumento de 2 veces la secreción de IFN γ entre los momentos anteriores y posteriores a la CTX. **B.** Ejemplificación de 3 casos con una respuesta inmune de Th1 en desarrollo; paciente 3 que desarrolla una fuerte inmunidad de Th1 provocada contra *L. johnsonii* + *E. hirae*. **C.** Un caso con una fuerte inmunidad de Th1 contra *E. faecalis*. **D.** Dos casos con respuestas específicas de Th1/TH10 contrastantes. B-D muestran los niveles de citoquinas en las 40 h de sobrenadantes de 250,000 células CD4⁺ T de memoria para cada paciente individual antes y después de la administración de CTX.

Figura 21: Análisis de componentes principales en los niveles de aislamiento del íleon de todos los pacientes después de la pirosecuenciación de 16SrRNA, comparando controles (sin quimioterapia) frente a la quimioterapia neoadyuvante posterior.

Figura 22: Análisis de grupos aleatorios: principales géneros discriminitorios entre pacientes que reciben quimioterapia o no y que tienen un cáncer de colon.

Análisis de 6 pacientes en quimioterapia neoadyuvante a base de oxaliplatino y 7 pacientes antes de la terapia.

Figura 23: Géneros principales que son significativamente diferentes entre controles (sin quimioterapia) versus quimioterapia neoadyuvante posterior.

Figura 24: Distribución de lactobacilos, Bifidobacterium y Clostridium grupo IV. En el íleon entre los pacientes con cáncer de colon tratados o no con quimioterapia.

Figura 25: Respuestas inmunitarias de TH1 y pTH17 después de mono-asociación con *E. hirae*. Los ratones C57BL/6 fueron tratados con vancomicina, estreptomina, ampicilina y colistina (régimen de ATB de amplio espectro) durante 14 días, seguido de una inyección por inmunoprecipitación de 100 mg / kg de CTX en el día 15 y alimentación oral con 10⁹ bacterias (como se ilustra en el gráfico) en el día 16 antes de los análisis de citometría de flujo de los esplenocitos en el día 22. A-C. Análisis citométrico de flujo de células pTH17. Células CD4⁺ T que expresan o coexpresan IFN γ e IL-17 (panel izquierdo) o CXCR3 y CCR6 (panel derecho) en la selección de esplenocitos vivos. Datos concatenados de 3 experimentos individuales que incluyen 5 ratones / grupo. Análisis estadísticos de Anova: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 26: Probióticos anticancerosos activos contra MCA205 tratados con CTX. Los ratones C57BL/6 fueron tratados con vancomicina, estreptomina, ampicilina y colistina (régimen de ATB de amplio espectro) durante 14 días y luego se inocularon sc. con sarcoma MCA205, luego se trataron con una inyección por *i.p.* de 100 mg / kg de CTX el día 21 y alimentación oral con 10⁹ bacterias (como se ilustra en el gráfico) el día 22. La cinética del crecimiento tumoral se monitorizó cada dos semanas durante 1 mes. A. Entorno experimental. B. Crecimiento tumoral para los grupos de control positivo (CTX sin ATB) y negativo (CTX con ATB). C-F. Cinética de crecimiento tumoral en presencia de sonda oral con *E. hirae* o *L. johnsonii* o ambos (cóctel). F. Datos concatenados de 3 experimentos individuales que incluyen 5 ratones / grupo. Análisis estadísticos de Anova: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 27: *E. hirae* induce respuestas inmunes antitumorales específicas de OVA. Los ratones C57BL/6 CD45.1⁺ fueron tratados con vancomicina, estreptomina, ampicilina y colistina (régimen ATB de amplio espectro) durante 14 días y luego se inocularon sc con sarcoma MCA205-OVA, luego se trataron con una inyección por

inmunoprecipitación de 100 mg / kg de CTX el día 21 y alimentación oral con 10^9 *E. hirae* (como se ilustra en el gráfico A) el día 22. El día 24, 10^6 células CD45.2⁺OTII T transgénicas se transfirieron iv y los ratones se sacrificaron 8 días después para los análisis de citometría de flujo de linfocitos receptores (CD45.1, B) o donantes (CD45.2) CD4⁺ T. B. Recuentos de esplenocitos (panel izquierdo), determinación de porcentajes de células Ki67 + CD4⁺ T (panel central) y pTH17 en el huésped posterior a la CTX con o sin ATB. C. Recuperación de células T donantes examinadas a través de la expresión de CD45.2+, Ki67+ o CD44+ en el bazo. D. Igual que en C pero en el lecho tumoral enumerando números absolutos. Se muestra un experimento representativo con la prueba t' de Student para análisis estadísticos. *p < 0,05.

- 10 **Figura 28: *E. hirae* induce respuestas inmunes antitumorales específicas de E7.** A. Entorno experimental. Inoculación de TC1 subcutánea en ratones pretratados con ATB de amplio espectro y terapia en el día 7 después de la implantación del tumor utilizando una combinación de SBxT-E7 y CTX (+/- monoasociación con *E. hirae*). B-C. Cinética de crecimiento tumoral representativa y porcentajes de erradicación completa del tumor en dos experimentos. D. Monitoreo del tetrámero D^b _{E739-47} vinculando células CD8⁺T en los bazos. Se presentan los resultados de dos experimentos. Prueba de Anova para análisis estadísticos. *p < 0,05.

- Figura 29: Electroforesis en gel de campo pulsado de una serie de aislamientos de *E. hirae* de diferentes bibliotecas públicas.** Agrupamiento jerárquico no supervisado de las similitudes de secuencia entre estos clones. El clon 13144-13147 se ha aislado en las instalaciones de animales de Gustave Roussy a partir de esplenocitos de ratones después de diferentes tipos de terapias (bloqueo CTLA4, CTX). El único aislamiento que se ha utilizado en lo sucesivo o anteriormente se indica como "13144 Villejuif" en esta figura, y corresponde a la cepa *Enterococcus hirae* depositada el 7 de noviembre de 2013 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, por sus siglas en francés), con el número 1-4815.

- 25 **Figura 30: Inmunogenicidad diferencial de varios aislamientos de *E. hirae* in vivo.** Los ratones C57BL/6 fueron tratados con vancomicina, estreptomycin, ampicilina y colistina (régimen de ATB de amplio espectro) durante 14 días, seguido de una inyección por inmunoprecipitación de 100 mg / kg de CTX en el día 15 y alimentación oral con 10^9 bacterias (clon 708 frente al clon CNCM I-4815) en el día 16 antes de los análisis de citometría de flujo de los esplenocitos en el día 22. Los controles positivos están representados por ratones tratados con CTX sin ATB previo.
- 30 A-C. Análisis citométrico de flujo de células TH1, Tc1 o pTH17. Células CD4⁺ TH1 que expresan IFN γ o CXCR3 (A, panel izquierdo y derecho), CD8⁺ Tc1 que expresan IFN γ (B) o CD4⁺ pTH17 que expresan CXCR3 en la selección de esplenocitos vivos CCR6⁺ CD4⁺ T (C). Datos concatenados de 3 experimentos individuales que incluyen 5 ratones / grupo. Análisis estadísticos de Anova: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

- 35 **Figura 31: La activación de los receptores NOD dificultó la translocación bacteriana y el cebado de las células pTH17 promoviendo la liberación de péptidos antimicrobianos.** A. Enumeración de colonias bacterianas en esplenocitos 48 horas después de la terapia con CTX en varios historiales de ratón. Células esplénicas (panel izquierdo) y LN mesentérico (panel central) recolectados de ratones C57BL/6 WT o NOD1^{-/-} xNOD2^{-/-} se cultivaron en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. El crecimiento bacteriano se enumeró (número de colonias / placa y frecuencias de placas positivas / animal (panel derecho)) y finalmente se caracterizó por espectrometría de masas para la identificación bacteriana. B. Análisis citométrico de flujo de células pTH17. Células CD4⁺ T que coexpresan IFN γ en la selección de esplenocitos IL-17⁺ T vivos en WT frente a ratones deficientes de NOD1 o NOD2. C. Igual que en B. pero el experimento se realizó en animales WT tratados con agonistas NOD (MDP y TriDAP) según el entorno experimental alineado en la parte superior del gráfico. D. Monitoreo por ELISA de lipocalina-2 en las heces de ratones según el entorno experimental alineado en C. Se muestra un experimento representativo para A y D. Los datos concatenados de 2-3 experimentos individuales que incluyen 3 ratones / grupo se representan en B-C. Análisis estadísticos de Anova: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

- Figura 32: LPS desempeña un papel inhibitorio en la capacidad de *E. hirae* + *L. johnsonii* para obtener células pTH17.** A-C. Comparaciones entre un agonista de TLR4 y bacterias Gram positivas para la obtención de células TH1 (A), Tc1 (B) y pTH17 (C) en el bazo. Entorno experimental descrito en la Fig. 25, pero agregando o no la administración oral de LPS en una dosis repetida de 500 ug / ratón dos veces. Análisis citométrico de flujo de células CD4⁺ T coexpresan IFN γ e IL-17 en la selección de esplenocitos vivos. Datos concatenados de 3 experimentos individuales que incluyen 5 ratones / grupo. Análisis estadísticos de Anova: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

- 55 **Figura 33: Eficacia relativa de CTX contra sarcomas que crecen en varios hospedadores deficientes en genes.** Se administró CTX cada 7 días a 100 mg / kg por inmunoprecipitación en ratones deficientes en WT (A), NOD1 (B), NOD2 (C, panel izquierdo), CARD9 (C, panel central), RIP2 (C, panel derecho), NOD1xNOD2 (D, panel izquierdo y panel derecho). Cada gráfico representa las medias de 5 tumores / grupo en una cinética de crecimiento representativa. Prueba t' de Student: *p < 0,05.

Figura 34: Efectos inhibitorios de los agonistas de TLR4 en la actividad probiótica anticancerosa de la

asociación de *E. hirae* + *L. johnsonii*. Los ratones C57BL/6 fueron tratados con vancomicina, estreptomina, ampicilina y colistina (régimen de ATB de amplio espectro) durante 14 días, luego se inocularon sc. con sarcoma MCA205, y luego se trataron con una inyección por inmunoprecipitación de 100 mg / kg de CTX el día 21 (y el día 29) y alimentación oral con LPS (A) 500 ug / ratón o 10^9 bacterias (*E. coli*) (B) el día 22. La cinética del crecimiento tumoral se monitorizó cada dos semanas durante 1 mes. Se indican los controles positivos (CTX sin ATB) y negativo (PBS en ATB). Mediciones de cinética de crecimiento tumoral / 5 ratones / grupo en presencia de sonda oral con *E. hirae* + *L. johnsonii* +/- *E. coli* o LPS. Se muestra un gráfico representativo en A y B y los datos concatenados para *E. coli*+LPS de 2 experimentos que incluyen 5 ratones / grupo se muestran en C. Prueba t' de Student: *p < 0,05.

- 10 **Figura 35: Análisis de componentes principales de la pirosecuenciación de 16srRNA de amplicones de genes de heces de WT frente a ratones deficientes en NOD1xNOD2 tratados o no con CTX.** A. CPA. Las heces se recolectaron el día 7 después de la inoculación con CTX en portadores no tumorales C57BL/6 sin tratamiento previo. Se han secuenciado heces de 4-5 animales / grupos. El valor p que muestra resultados significativos entre las terapias de PBS y CTX para ratones deficientes en genes se indica en el gráfico. B. Los detalles de las familias representaron en exceso la terapia posterior a la CTX en ratones con KO doble. Análisis de la mayoría de los miembros de la familia en el filo de *Bacteroidetes*. Representación del mapa de calor de la diversidad y las diferencias entre los 4 grupos (panel izquierdo) que resaltan el enriquecimiento en *Porphyromonadaceae* a expensas de *Lachnospiraceae* con terapia de CTX como se muestra en los análisis estadísticos presentados en el panel derecho. C. Detalles de la terapia OTU posterior a la CTX en ratones con doble KO, para *Barnesiella*, *Holdemania* y *Porphyromonas*.

- 25 **Figura 36: Análisis de componentes principales de la pirosecuenciación de 16srRNA de amplicones de genes de biopelículas de intestinos delgados de WT frente a ratones deficientes en NOD1xNOD2 tratados o no con CTX.** A. CPA. Las biopelículas de ileones se recolectaron el día 7 después de la inoculación con CTX en portadores no tumorales C57BL/6 sin tratamiento previo. Se han secuenciado intestinos delgados de 4-5 animales / grupos. El valor p que muestra resultados significativos entre las terapias de PBS y CTX para ratones deficientes en genes se indica en el gráfico. B. Representación del mapa de calor de la diversidad y las diferencias entre los 4 grupos que resaltan el enriquecimiento en *Clostridiaceae* (principalmente *SFB*, Tabla 4) a expensas de *Erysipelotrichaceae* con terapia de CTX como se muestra en los análisis estadísticos presentados en la Tabla 1.

- 30 **Figura 37: Combinación de la *E. hirae* comensal y el patobionte *Clostridium perfringens*.** El mismo entorno experimental que en la Fig. 26, pero *C. perfringens* también ha sido introducido por sonda oral. La cinética del crecimiento tumoral se monitorizó cada dos semanas durante 1 mes. A. Crecimiento tumoral para los dos grupos *E. hirae* frente a *C. perfringens*. B. Cinética de crecimiento tumoral en presencia de sonda oral con *E. hirae*+ *L. plantarum* frente a *E. hirae* + *Clostridium perfringens*. Se muestran dos experimentos que incluyen 5 ratones / grupo. Análisis estadísticos de Anova: *p < 0,05.

- 40 **Figura 38: Las vacunas anticancerosas combinadas con CTX promueven una inmunidad anticancerosa de larga duración que depende de las bacterias Gram negativas intestinales.** A. Entorno experimental. Los ratones C56BL/6 fueron tratados con ATB de amplio espectro (ampicilina, colistina, estreptomina) o vancomicina (que solo mata bacterias Gram +) o colistina (que solo mata bacterias Gram) durante 9 días, recibieron una inyección por inmunoprecipitación de CTX (100 mg / kg), seguido 3 días después de la vacunación con proteína OVA en adyuvantes CpG (o vacunas simuladas). Los ATB se detuvieron después de 20 días y los animales se dejaron sin tratar bajo observación durante 1 mes. En el día 50, todos los ratones se volvieron a someter a una dosis letal 10 veces mayor que la MTD de células tumorales MC38-OVA^{dim} sc. B. Los animales se puntuaron en función del crecimiento tumoral (con respuesta de células T de memoria débil o nula). Los porcentajes de ratones libres de tumor se registraron para 2 experimentos que comprendieron 5 ratones / grupo. *prueba de Anova: p < 0,05.

- 50 **Figura 39: Efectos del régimen de ATB sobre la eficacia de la CTX.** Régimen de ATB distinto (Zhang Y y col. Toxicology and Applied Pharmacology 277 (2014) 138-145) se administraron durante 15 días antes de la inoculación del tumor y la terapia con CTX cada 13 días. El crecimiento tumoral se monitorizó con un calibrador dos veces por semana. Los protocolos informaron que la reducción de *Firmicutes*, más específicamente *Clostridia* disminuyendo en caso necesario la relación de *Firmicutes/Bacteroides* (como la combinación de neomicina + cefalotina o vancomicina + imipenem) (panel C-D) podría mejorar los efectos antitumorales inducidos por CTX mientras que la ciprofloxacina (que, en contraste, indujo una marcada supresión de *Bacteroidetes*) no fue eficiente (panel B). Es de destacar que la combinación de neomicina + cefalotina podría aumentar la representatividad de *SFB* mientras que vanco + imipenem aumentaba la de *Porphyromonas*. Cada experimento contiene varios grupos de 5 ratones. *Prueba de Anova: *p < 0,05.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

En el presente documento, se utilizan las siguientes definiciones generales:

Microbiota intestinal

La "microbiota intestinal" (antes llamada flora intestinal o microflora) designa la población de microorganismos que viven en el intestino de cualquier organismo perteneciente al reino animal (humano, animal, insecto, etc.). Si bien cada individuo tiene una composición de microbiota única (más del 50 % de una población muestreada comparte entre 60 y 80 especies bacterianas en un total de 400-500 especies bacterianas diferentes / individuo), siempre cumple funciones fisiológicas principales similares y tiene un impacto directo en la salud del individuo:

- contribuye a la digestión de ciertos alimentos que el estómago y el intestino delgado no pueden digerir (principalmente fibras no digeribles);
 - contribuye a la producción de algunas vitaminas (B y K);
 - protege contra las agresiones de otros microorganismos, manteniendo la integridad de la mucosa intestinal;
 - desempeña un papel importante en el desarrollo de un sistema inmunológico adecuado;
- Una microbiota intestinal saludable, diversa y equilibrada es clave para asegurar un funcionamiento intestinal adecuado.

Teniendo en cuenta el importante papel que desempeña la microbiota intestinal en el funcionamiento normal del cuerpo y las diferentes funciones que cumple, hoy en día se considera como un "órgano". Sin embargo, es un órgano "adquirido", ya que los bebés nacen estériles; es decir, la colonización del intestino comienza inmediatamente después del nacimiento y evoluciona posteriormente.

El desarrollo de la microbiota intestinal comienza al nacer. Estéril dentro del útero, el tracto digestivo del recién nacido es colonizado rápidamente por microorganismos de la madre (vaginal, piel, mama, etc.), el entorno donde tiene lugar el parto, el aire, etc. Desde el tercer día, la composición de la microbiota intestinal depende directamente de cómo se alimenta al bebé: la microbiota intestinal de los bebés amamantados, por ejemplo, está dominada principalmente por *Bifidobacterias*, en comparación con los bebés alimentados con fórmulas infantiles.

La composición de la microbiota intestinal evoluciona a lo largo de toda la vida, desde el nacimiento hasta la vejez, y es el resultado de diferentes influencias ambientales. El equilibrio de la microbiota intestinal puede verse afectado durante el procedimiento de envejecimiento y, en consecuencia, los ancianos tienen una microbiota sustancialmente diferente a la de los adultos más jóvenes.

Si bien la composición general de la microbiota intestinal dominante es similar en la mayoría de las personas sanas (4 filos principales, es decir, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria), la composición a nivel de las especies es altamente personalizada y está determinada en gran medida por la genética, el medio ambiente y la dieta de los individuos. La composición de la microbiota intestinal se puede acostumbrar a los componentes dietéticos, ya sea temporal o permanentemente. Los japoneses, por ejemplo, pueden digerir algas (parte de su dieta diaria) gracias a las enzimas específicas que su microbiota ha adquirido de las bacterias marinas.

Disbiosis

Aunque puede adaptarse al cambio y tiene una alta capacidad de resiliencia, puede surgir una pérdida de equilibrio en la composición de la microbiota intestinal en algunas situaciones específicas. Esto se denomina "disbiosis", un desequilibrio entre bacterias potencialmente "perjudiciales" y "beneficiosas" conocidas en el intestino o cualquier desviación de lo que se considera una microbiota "saludable" en términos de la composición y diversidad de los principales grupos bacterianos. La disbiosis puede estar relacionada con problemas de salud como trastornos funcionales del intestino, enfermedades inflamatorias del intestino, alergias, obesidad y diabetes. También puede ser la consecuencia de un tratamiento, como un tratamiento citotóxico o un tratamiento con antibióticos.

Una disbiosis específica se puede resaltar dependiendo de la condición patógena. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria crónica del intestino, presentan una microbiota con porcentajes reducidos y diversidad de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, y en su mayoría del grupo *Clostridium leptum* (grupo IV) (Manichanh y col., 2006; Sokol y col., 2006). En general, se pueden observar porcentajes reducidos de bacterias de la familia Lachnospiraceae. Además, la microbiota asociada a la mucosa de estos pacientes se agota en bacterias de géneros del *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* con respecto a mayores niveles de bacterias potencialmente patógenas, como cepas específicas de *Escherichia coli* con fenotipos adherentes e invasivos (AIEC) (Darfeuille-Michaud y col. 2011, 2004; Joossens y col., 2011).

Por el contrario, los pacientes con obesidad y trastornos metabólicos tienen una mayor proporción de bacterias que pertenecen al filo Firmicutes y niveles más bajos de *Escherichia coli* en sus heces (Ley y col., 2005; Turnbaugh y col., 2009). Un aumento en proporciones de *E. coli* en estos pacientes se ha asociado con la pérdida de peso después de

la cirugía bariátrica y niveles más bajos de leptina sérica (Furet y col., 2010).

En pacientes con cáncer colorrectal (CCR), sin embargo, la disbiosis microbiana intestinal se relaciona con el enriquecimiento en especies bacterianas del género de *Bacteroides* y una disminución de las especies pertenecientes a los géneros de *Faecalibacterium* y *Roseburia* (Sobhani y col., 2011; Wu y col., 2013). Específicamente, se observó que el *Fusobacterium* y los géneros del *Campylobacter* aumentaron constantemente tanto en las heces como en la mucosa de los pacientes con CCR.

En el contexto del cáncer, las bacterias "beneficiosas" o "favorables" son esencialmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y las bacterias "perjudiciales" o "desfavorables" son esencialmente las especies *Parabacteroides distasonis* y *Faecalibacterium prausnitzii*, los géneros *Gemmiger*, *Alistipes* y *Clostridium* grupo IV. (*Grupo Clostridium leptum*).

Tratamientos antineoplásicos.

Los "tratamientos antineoplásicos" en el presente documento designan cualquier tratamiento para el cáncer, excepto la cirugía. Incluyen quimioterapia, terapias hormonales y biológicas y radioterapia.

Quimioterapia

La "quimioterapia" se define en el presente documento como el tratamiento del cáncer con uno o más "agentes quimioterapéuticos". Los agentes quimioterapéuticos son moléculas químicas que actúan matando las células que se dividen rápidamente, una de las propiedades principales de la mayoría de las células cancerosas. Existen varias categorías de agentes químicos:

- agentes alquilantes (definidos más detalladamente a continuación);
- venenos del huso como mebendazol, colchicina;
- inhibidores mitóticos (incluidos los taxanos (paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®)) y alcaloides de la vinca (*por ejemplo*: vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina)),
- antibióticos citotóxicos / antitumorales: como las antraciclinas (*por ejemplo*: doxorubicina, daunorubicina, adriamicina, idarrubicina, epirubicina y mitoxantrona, valrubicina), estreptomicinas (*por ejemplo*: actinomicina, bleomicina, mitomicina, plicamicina)
- anti-metabolitos (como los análogos de pirimidina (*por ejemplo*: análogos de fluoropirimidinas, 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina (FUDR), arabinósido de citosina (citarabina), gemcitabina (Gemzar®), capecitabina; análogos de la purina (*por ejemplo*: azatioprina, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, pentostatina, cladribina, capecitabina, clofarabina); análogos del ácido fólico (*por ejemplo*: metotrexato, ácido fólico, pemetrexed, aminopterina, raltitrexed, trimetoprim, pirimetamina),
- inhibidores de la topoisomerasa (*por ejemplo*: camptotecinas: irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato, tenipósido);
- inhibidores del ADN metiltransferasa: 2'-desoxi-5-azacitidina (DAC), 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, 1-[beta]-D-arabinofuranosil-5-azacitosina, dihidro-5-azacitidina;
- agentes disruptores vasculares, tales como derivados del ácido acético de flavona, ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA) y ácido acético de flavona (FAA);
- también otros fármacos quimioterapéuticos como aprepitant, bortezomib (Velcade®, Millenium Pharmaceuticals), mesilato de imatinib (Gleevec®), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), tamoxifeno, gefitinib, erlotinib, carboxiamidotriazol, efaproxiral, tirapazamina, xcitrina, timalfasina, vinflunina.

Agentes alquilantes

Los "agentes alquilantes" se llaman así debido a su capacidad para alquilar muchas moléculas, incluidas las proteínas, el ARN y el ADN. Esta capacidad de unirse covalentemente al ADN a través de su grupo alquilo es la causa principal de sus efectos anticancerígenos, ya que provoca la apoptosis celular. Los agentes alquilantes son fármacos independientes del ciclo celular, y sus efectos generalmente dependen de la dosis.

Los subtipos de agentes alquilantes son las mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, tetrazinas, aziridinas y agentes alquilantes no convencionales. Las mostazas nitrogenadas incluyen mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida y busulfano. Las nitrosoureas incluyen N-Nitroso-N-metilurea (MNU), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (MeCCNU), fotemustina y estreptozotocina. Las tetrazinas incluyen dacarbazina, mitozolomida y temozolomida. Las aziridinas incluyen tiotepa, micomicina y diaziquona (AZQ). Los agentes alquilantes no convencionales incluyen procarbazona y hexametilmelamina.

A lo largo de la presente solicitud, los "agentes de tipo alquilante", que son fármacos quimioterapéuticos a base de

platino (también denominados "análogos de platino") y actúan de manera similar a los agentes alquilantes, se incluirán en la categoría de "agentes alquilantes". Estos agentes no tienen un grupo alquilo, pero sin embargo dañan el ADN. Se coordinan permanentemente al ADN para interferir en la reparación del ADN. Ejemplos de esta subcategoría de agentes alquilantes como se define en el presente documento son platino, cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino y triplatino tetranitrato.

Terapias biológicas

Las "terapias biológicas" anticancerosas incluyen el uso de organismos vivos, sustancias derivadas de organismos vivos o versiones producidas en el laboratorio de dichas sustancias para tratar el cáncer, atacando directamente las células cancerosas o estimulando el sistema inmunológico del cuerpo para que actúe contra las células cancerosas ("inmunoterapia"). Las terapias biológicas incluyen anticuerpos monoclonales (incluidos los dirigidos a la superficie de las células cancerosas, *por ejemplo*, rituximab y alemtuzumab; Mab anti-CTLA4, como ipilimumab; factores de crecimiento dirigidos, *por ejemplo*: bevacizumab, cetuximab, panitumumab y trastuzumab; Mab anti-PD-1; Mab anti-Tim3; Mab anti-ICOS), inmunoconjugados (por ejemplo: ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetano, ¹³¹I-tositumomab y adotrastuzumab emtansina), citocinas (incluidos los interferones como IFN α ; interleucinas como IL-2, IL-11, G-CSF, GM-CSF), vacunas terapéuticas (por ejemplo: Sipuleucel-T (Provenge®), la bacteria bacilo Calmette-Guérin, virus que eliminan el cáncer, terapia génica y transferencia adoptiva de células T.

20 Prebióticos, probióticos y simbióticos

Los "prebióticos" son ingredientes alimentarios no digeribles que estimulan el crecimiento y / o la actividad de las bacterias en el sistema digestivo en formas que se consideran beneficiosas para la salud. Por lo general, son ingredientes fermentados selectivamente que permiten cambios específicos, tanto en la composición y / o en la actividad de la microbiota intestinal.

Los "probióticos" son microorganismos que han reivindicado beneficios para la salud cuando se consumen. Los probióticos se consumen comúnmente como parte de los alimentos fermentados con cultivos vivos activos especialmente agregados, como en el yogur, el yogur de soja o como suplementos dietéticos. En general, los probióticos ayudan a la microbiota intestinal a mantener (o recuperar) su equilibrio, integridad y diversidad. Los efectos de los probióticos dependen habitualmente de la cepa.

Los "simbióticos" se refieren a los suplementos nutricionales que combinan probióticos y prebióticos en una forma de sinergismo, por lo tanto, simbióticos. El uso de prebióticos y probióticos en combinación a menudo se describe como simbiótico, pero la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) recomienda que el término "simbiótico" se utilice sólo si el beneficio neto para la salud es sinérgico.

Cáncer, tratamiento, etc.

Como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer. En particular, el cáncer puede ser un cáncer sólido o no sólido. Ejemplos no limitativos de cáncer son los carcinomas o adenocarcinomas como el cáncer de mama, próstata, ovario, pulmón, páncreas o colon, sarcomas, linfomas, melanomas, leucemias, cánceres de células germinales y blastomas.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a cualquier reducción o mejora de la progresión, gravedad y / o duración del cáncer, particularmente un tumor sólido; por ejemplo, en un cáncer de mama, reducción de uno o más síntomas del mismo que resulta de la administración de una o más terapias.

Otras definiciones se especificarán a continuación, cuando sea necesario.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición probiótica que comprende bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii*, bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella*, *Holdemania* y mezclas de las mismas, para su uso como adyuvante de un tratamiento antineoplásico administrado a un paciente con cáncer. Según una realización preferida de la composición probiótica de la invención, dicha composición comprende *Enterococcus hirae* y al menos una cepa seleccionada de entre *Porphyromonas*, *Barnesiella* y *Holdemania*. Una cepa preferida de *Enterococcus hirae* para las composiciones anteriores es la cepa depositada el 7 de noviembre de 2013 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, por sus siglas en francés), con el número I-4815. Dicha composición puede comprender ventajosamente además una cepa de *Lactobacillus johnsonii* como la cepa *Lactobacillus johnsonii* LJFS001B, depositada el 15 de noviembre de 2013 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, por sus siglas en francés), con el número I-4823.

Las composiciones probióticas anteriores pueden formularse ventajosamente para administración oral y administrarse como suplementos alimenticios o como alimentos funcionales. El experto en la materia conoce una variedad de fórmulas que pueden abarcar microorganismos vivos o muertos y que pueden presentarse como
 5 complementos alimenticios (por ejemplo, píldoras, tabletas y similares) o como alimentos funcionales como bebidas, yogures fermentados, etc.

Según una realización preferida, la composición probiótica según la invención se administra a un paciente que la necesita después de la administración de un tratamiento antineoplásico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico
 10 tal como ciclofosfamida (CTX) a dicho paciente. Por ejemplo, la composición de probióticos se puede administrar el mismo día que una dosis de CTX o después de algunos días de tratamiento. En el caso de la administración de CTX metronómica, la composición de probióticos se puede administrar diariamente, después de cada ingesta de CTX o incluso al mismo tiempo. Alternativamente, la composición probiótica según la invención se administra a un paciente que la necesita antes de la administración de un tratamiento antineoplásico.

15 Algunos agentes quimioterapéuticos, especialmente CTX, se han descrito como adyuvantes eficaces para las vacunas contra el cáncer. Una aplicación particularmente útil de las composiciones probióticas según la presente invención es su uso en combinación con dicho agente quimioterapéutico, para aumentar adicionalmente la eficacia de la vacunación contra el cáncer.

20 Un procedimiento para tratar a un paciente con cáncer, que comprende administrar una composición bacteriana probiótica tal como se describe anteriormente, antes y / o después de administrar un agente quimioterapéutico, ya sea solo o combinado a una vacuna contra el cáncer, a dicho paciente, también forma parte de la presente invención.

25 Aunque las composiciones anteriores pueden administrarse de manera apropiada a cualquier paciente tratado con las mismas y tratamiento antineoplásico como quimioterapia (solas o en combinación con una vacuna antitumoral), son particularmente útiles para pacientes que tienen una disbiosis con una representación insuficiente de las especies presentes en dicha composición probiótica.

30 Otro aspecto de la presente invención es el uso de una combinación de un agente quimioterapéutico y de una composición antibiótica que disminuye la relación de firmicutes / bacteroidetes o aumenta específicamente la *SFB* y / o la *Porphyromonadaceae* y / o disminuye el *Clostridium* de grupo IV en la microbiota intestinal de un individuo cuando se administra a dicho individuo, para tratar un cáncer. Según una realización particular, la composición antibiótica comprende o consiste en una combinación de vancomicina e imipenem. Según otra realización particular,
 35 la composición antibiótica comprende o consiste en una combinación de neomicina y cefalotina. Ventajosamente, el agente quimioterapéutico usado en combinación con una composición antibiótica como se describe anteriormente es la ciclofosfamida (CTX).

Como se usa en el presente documento, el término "combinación" se refiere al uso de más de un agente (por
 40 ejemplo, vancomicina + imipenem y CTX). El uso del término "combinación" no restringe el orden en que los agentes terapéuticos se administran al paciente, aunque es preferible administrar el cóctel de antibióticos antes o simultáneamente con el agente quimioterapéutico. Por ejemplo, la vancomicina y el imipenem se pueden administrar antes de la CTX (por ejemplo, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4
 45 semanas antes), ya sea puntualmente o varias veces (por ejemplo, cada día), preferentemente durante 3 a 7 días antes de que se administre el tratamiento antineoplásico. Ventajosamente, la composición antibiótica se administra antes de la administración de un fármaco quimioterapéutico, con el fin de modular la microbiota intestinal del paciente para optimizar el efecto de dicho fármaco quimioterapéutico (tal como CTX). Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a un paciente con cáncer, que comprende administrar una
 50 composición antibiótica que disminuye la relación de firmicutes / bacteroidetes, específicamente aumenta la *SFB* y / o la *Porphyromonadaceae* y / o disminuye el *Clostridium* grupo IV en la microbiota intestinal de un individuo cuando se administra a dicho individuo, antes de administrar un fármaco quimioterapéutico (ya sea sólo o en combinación con una vacuna contra el cáncer).

La presente invención también se refiere al uso de una composición antibiótica que disminuye la relación de
 55 firmicutes / bacteroidetes, específicamente aumenta la *SFB* y / o la *Porphyromonadaceae* y / o disminuye el *Clostridium* grupo IV en la microbiota intestinal de un individuo cuando se administra a dicho individuo, como una terapia adyuvante para potenciar los efectos anticancerosos de un agente quimioterapéutico administrado a dicho paciente. De hecho, como se ilustra en la parte experimental a continuación, puede ser útil modular la microbiota intestinal de un paciente, mediante el uso de antibióticos y / o probióticos, para aumentar los efectos anticancerosos
 60 de un agente quimioterapéutico como, por ejemplo, la CTX. Las composiciones antibióticas tales como vancomicina + imipenem y neomicina + cefalotina son particularmente útiles para este objetivo.

Otro objeto de la presente invención es una composición inmunogénica que comprende fragmentos de bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii*, *Enterococcus faecalis*, bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella*, *Holdemania* y mezclas de las mismas para su uso como adyuvante para un tratamiento antineoplásico administrado a un paciente con cáncer. Según una realización preferida, la composición inmunogénica, comprende fragmentos de *Enterococcus hirae*, más preferentemente fragmentos de la cepa CNCM I-4815, junto con fragmentos de al menos una cepa seleccionada de entre el grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Barnesiella* y *Holdemania*.

Las composiciones inmunogénicas según la invención se formulan preferentemente para administración subcutánea o intramuscular. Se pueden administrar ventajosamente antes, al mismo tiempo o después de la administración de un agente quimioterapéutico como la CTX, para inducir una respuesta inmune que tendrá un efecto adyuvante para el tratamiento.

La invención se refiere además a las composiciones celulares y su uso en la transferencia de células adoptivas en combinación con un agente quimioterapéutico. Las técnicas para obtener varios tipos de células inmunes de un paciente y para impulsar y educar *ex vivo* dichas células son bien conocidas por el experto en la materia. Dichas técnicas fueron descritas, entre otros, por Caux y col. (1996), Sallust (1994), Palucka (2013), Vanlint (2014), Arrntzen (2008) y Lesterhuis (2008). Una primera composición celular según la invención es una composición celular que comprende células presentadoras de antígeno (CPA) tales como células dendríticas (DC) que se han impulsado *ex vivo* con una composición probiótica o con una composición inmunogénica como se describió anteriormente. Según una realización preferida, las células presentadoras de antígeno presentes en la composición celular también se han impulsado *ex vivo* con un antígeno tumoral.

Las composiciones celulares según la presente invención son particularmente útiles para tratar un cáncer, combinando la transferencia de células adoptivas con un tratamiento antineoplásico. Dependiendo del contexto clínico, el médico decidirá cómo administrar dicha composición celular. En particular, estas composiciones pueden administrarse mediante inyección intra-nodal, inyección intravenosa o inyección subcutánea.

Según otro procedimiento de transferencia adoptivo de la presente invención, las composiciones de CPA anteriores pueden usarse para "educar" *ex vivo* las células T obtenidas del paciente, antes de volver a inyectar estas células T educadas, especialmente las células T de memoria, en el paciente. Una composición celular que comprende células T de memoria obtenidas por un procedimiento que comprende poner en contacto células T *ex vivo* de un paciente con cáncer con una composición de CPA como se describe anteriormente, es por lo tanto también parte de la presente invención. Dicha composición de células T puede usarse ventajosamente en la transferencia de células adoptivas como adyuvante para potenciar los efectos de un tratamiento antineoplásico tal como una quimioterapia (especialmente la administración de CTX), administrada sola o en combinación con una vacunación antitumoral. En cuanto a las células dendríticas, las células T pueden administrarse mediante inyección intra-nodal, inyección intravenosa o inyección subcutánea, según el contexto clínico.

La descripción también se refiere a un procedimiento para obtener *ex vivo* células T capaces de mejorar la actividad anticancerosa de un fármaco quimioterapéutico, que comprende expandir *ex vivo* una línea de células T policlonales o células T autólogas en masa con células dendríticas (DC) que presentan péptidos de *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii*, bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella* y / o *Holdemania*.

Otro aspecto de la descripción es un procedimiento *in vitro* para identificar a un paciente que probablemente sea un buen respondedor a una quimioterapia, que comprende determinar la funcionalidad de TLR 4, NOD1 y NOD2 en dicho paciente, donde si dicho paciente carece de un TLR 4 funcional y / o NOD1 / CARD4 (rs2006847, rs2066844, rs2066845, rs2066842, ND(1)+32656, rs2075820,...) y / o NOD2 / CARD15 (como p.R702W, p.G908R, p.Leu1007fsX1008), el paciente se identifica como un buen respondedor a la quimioterapia (todo excepto antraciclinas y oxaplatino y radioterapia). Se han identificado dos polimorfismos de nucleótido único (SNP) - Asp299Gly y Thr399Ile - dentro del gen que codifica TLR4. Estos SNP están presentes en aproximadamente el 10 % de los individuos blancos, y se ha descubierto que se relacionan positivamente con varias enfermedades infecciosas. En una realización particular de este procedimiento, la presencia o ausencia de uno o ambos de estos SNP se determina, por ejemplo, por PCR o por cualquier otro procedimiento conocido por el experto en la materia.

Según otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para determinar *in vitro* si un paciente con cáncer puede beneficiarse de un tratamiento antineoplásico, que comprende las siguientes etapas:

(i) a partir de una muestra biológica apropiada de dicho paciente, determinar la abundancia relativa de bacterias "desfavorables" en el contexto específico del cáncer y la quimioterapia, por ejemplo, bacterias de un grupo que comprende o consiste en las especies *Parabacteroides distasonis* y *Faecalibacterium prausnitzii*, bacterias de los géneros *Gemmiger*, *Alistipes* y *Clostridium* grupo IV (grupo *Clostridium leptum*; como se describe en la descripción

taxonómica de las bacterias *Clostridium* por Collins y col.) en la microbiota intestinal de dicho paciente. Opcionalmente, en la misma muestra biológica, la abundancia relativa de bacterias "favorables" en el contexto específico del cáncer y la quimioterapia, por ejemplo, las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, también se determina, por ejemplo, si se observa una relación menor de Firmicutes / Bacteroidales, también se

- 5 determina la presencia de bacterias de la familia *Porphyromonadaceae*, *SFB*,...;
(ii) determinar la presencia o ausencia de una disbiosis intestinal;

donde una disbiosis intestinal con una representación excesiva de bacterias "desfavorables" de los taxones mencionados en la etapa (i) indica que el paciente no será un buen respondedor al tratamiento antineoplásico.

10

En lo que precede, la "abundancia relativa" se define como el número de bacterias de un nivel taxonómico particular (de filo a especie) como un porcentaje del número total de bacterias en la muestra biológica. Esta abundancia relativa se puede evaluar, por ejemplo, midiendo el porcentaje de secuencias del gen 16S rRNA presentes en la muestra que se asignan a estas bacterias. Puede medirse mediante cualquier técnica apropiada conocida por el

15

experto en la materia, como la 454 pirosecuenciación y la PCR cuantitativa de estos marcadores genéticos de 16S rRNA bacterianos específicos, como se describe en la parte experimental a continuación o la PCR cuantitativa de cualquier gen específico para un grupo bacteriano.

En el presente documento, un "buen respondedor a un tratamiento", también llamado paciente "respondedor" o

20

"sensible" o, en otras palabras, un paciente que "se beneficia de" este tratamiento, se refiere a un paciente que está afectado por un cáncer y que muestra o mostrará un alivio clínicamente significativo en el cáncer después de recibir este tratamiento. Los datos clínicos de la enfermedad se pueden evaluar según los estándares reconocidos en la técnica, como los criterios de respuesta relacionada con el sistema inmunitario (irRC), los criterios de la OMS o RECIST.

25

Según una realización particular, la muestra biológica es una biopelícula de una biopsia (preferentemente de una biopsia grande) de duodeno o mucosa de íleon obtenida del paciente. Por ejemplo, esta biopsia se puede haber obtenido durante una cirugía específica en cánceres de páncreas, estómago, vías biliares o colon.

30

Según otra realización, que se refiere a cualquier tipo de cáncer, la muestra biológica es una muestra de heces obtenidas del paciente. Esta muestra puede haberse recolectado en el momento del diagnóstico, por ejemplo, o en cualquier momento antes de decidir el inicio del tratamiento.

Cuando se observa una disbiosis intestinal con una representación excesiva de bacterias "desfavorables" como se

35

definió anteriormente, esto muestra que el paciente necesita un tratamiento para equilibrar la microbiota intestinal antes de comenzar el tratamiento antineoplásico o como adyuvante de dicho tratamiento (por ejemplo: administración de prebióticos o probióticos antes / al comenzar una quimioterapia). Por lo tanto, se puede tomar la decisión de adaptar el régimen del paciente (proporcionando prebióticos o probióticos) durante un período de tiempo (por ejemplo, unas pocas semanas) antes de comenzar el tratamiento antineoplásico.

40

Según otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para determinar *in vitro* si se debe continuar o detener un tratamiento antineoplásico para un paciente con cáncer, que comprende las siguientes etapas:

(i) de una muestra biológica de dicho paciente, obtenida al menos 3 semanas después del inicio del tratamiento antineoplásico, preferentemente 6-9 semanas después del inicio del tratamiento antineoplásico (correspondiente a tres ciclos de quimioterapia), analizar la respuesta de las células CD4⁺ T de memoria dirigida contra al menos una especie comensal de bacterias (preferentemente al menos 2 y más preferentemente al menos 3, 4 o más comensales);

45

(ii) para cada especie comensal con respecto a la cual se analiza la respuesta de las células CD4⁺ T, clasificar la

50

respuesta en una de las siguientes categorías:

- respuesta de las células CD4⁺ T sin memoria;
- respuesta de memoria de un fenotipo Th10:Tr1/Treg;
- respuesta de memoria de un fenotipo Th1,

55

donde sí se observa una respuesta de memoria de un fenotipo Th1 para al menos una especie comensal, el tratamiento antineoplásico continúa y, en ausencia de dicha respuesta, el tratamiento antineoplásico se detiene o se compensa con probióticos adecuados (véase a continuación).

60

Este ensayo farmacodinámico es particularmente útil para predecir, después de 3-9 semanas de quimioterapia (1-3 ciclos de quimioterapia), preferentemente después de 6-9 semanas (2-3 ciclos) de quimioterapia, si esta quimioterapia es probable que active una respuesta inmune adyuvante y un beneficio clínico.

Para clasificar las respuestas, las secreciones de IL-2, TNF α , IFN γ e IL-10 se miden en ensayos de reestimulación *ex vivo*. En una realización preferida, se realiza un primer ensayo antes del inicio del tratamiento, con el fin de comparar el perfil de secreción de citoquinas después de unas pocas semanas de tratamiento con el tratamiento

5 previo observado. Estos ensayos pueden realizarse, por ejemplo, utilizando monocitos autólogos de pacientes cargados con bacterias definidas e incubados con células CD4⁺CD45RO⁺ T purificadas a partir de sangre autóloga. La respuesta se clasificará en la tercera categoría (favorable) si es de un fenotipo Th1, es decir, si la reestimulación desencadena una secreción significativa de IL-2, TNF α e IFN γ , y una baja secreción de IL-10, especialmente cuando se comparan los resultados obtenidos después del tratamiento previo. Típicamente, para un paciente que tiene una

10 respuesta del fenotipo Th1, se observa un aumento de la secreción de IFN γ al menos 2 veces después del tratamiento (en comparación con el tratamiento previo). La primera categoría (respuesta de células CD4⁺ T sin memoria) corresponde a la ausencia de una secreción significativa de citoquinas en los ensayos de reestimulación posteriores al tratamiento, mientras que la segunda categoría corresponde a una respuesta donde la secreción de IL-10 en un ensayo posterior a la reestimulación es superior a la observada antes del tratamiento.

15 Según una realización particular del procedimiento anterior, se analizan las respuestas de células CD4⁺ T de memoria dirigidas contra al menos dos especies seleccionadas de entre *Lactobacillus johnsonii*, *Enterococcus hirae* y *Enterococcus faecalis*. Preferentemente, se evalúan las respuestas dirigidas contra 2 de estos, y más preferentemente contra todos estos.

20 Un aspecto particularmente ventajoso de este procedimiento farmacodinámico es que puede realizarse usando una muestra de sangre. Por supuesto, se puede hacer para pacientes con cualquier tipo de cáncer.

Según un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para determinar *in vitro* los efectos biológicos de un tratamiento antineoplásico neoadyuvante que se ha administrado a un paciente, que comprende las siguientes etapas:

25

(i) de una muestra biológica apropiada de dicho paciente, determinar la abundancia relativa de bacterias "favorables" en dicha microbiota;

30 (ii) a partir de la misma muestra biológica, determinar la abundancia relativa de bacterias "desfavorables" en dicha microbiota intestinal;

(iii) calcular la relación entre la abundancia de bacterias favorables y la abundancia de bacterias desfavorables,

donde si dicha relación está por encima de un umbral predeterminado, el resultado indica que el tratamiento antineoplásico neoadyuvante indujo una respuesta inmune local y sistémica T-bet/Th1.

35

Para realizar el procedimiento anterior, las bacterias «favorables» pueden ser aquellas de un grupo que comprende o consiste en los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y las bacterias «desfavorables» pueden ser aquellas de un grupo que comprende o consiste en las especies *Parabacteroides distasonis* y *Faecalibacterium prausnitzii* y los

40 géneros *Gemmiger*, *Alistipes* y *Clostridium* grupo IV (grupo *Clostridium leptum*).

El experto en la materia determinará el umbral apropiado dependiendo de la técnica que se utiliza para determinar la abundancia relativa de bacterias de cada grupo (por ejemplo, pirosecuenciación o PCR cuantitativa) y dependiendo de la definición de cada grupo de pacientes. De hecho, no se puede determinar un umbral único para todos los

45 pacientes con cáncer y se debe apreciar la proporción teniendo en cuenta varios factores, incluidos la salud del paciente y los hábitos alimentarios.

Para realizar el procedimiento anterior, la muestra biológica es preferentemente una biopelícula de una biopsia (preferentemente de una biopsia grande) de duodeno o mucosa de ileon obtenida del paciente. Por ejemplo, esta

50 biopsia se puede haber obtenido durante una cirugía específica en cánceres de páncreas, estómago, vías biliares o colon.

Es importante destacar que los procedimientos descritos anteriormente se pueden realizar para pronosticar o diagnosticar la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer a cualquier tratamiento antineoplásico como se definió anteriormente, incluidas las quimioterapias, terapias biológicas, radioterapias, terapias hormonales, *etc.* En particular, estos procedimientos pueden usarse ventajosamente para evaluar el beneficio (potencial), para un paciente con cáncer, de una quimioterapia, más particularmente con un agente alquilante o una sal de platino como cualquiera de los citados anteriormente y / o una vacuna antitumoral. Los datos experimentales a continuación describen claramente el papel de la microbiota en la respuesta inmune inducida por la ciclofosfamida (Ejemplos 1, 3

55 y 4), doxorubicina (véase al menos la Fig. 14) y oxaliplatino (Ejemplo 2). Curiosamente, los ejemplos 3 a 5 muestran que los resultados obtenidos en ratones pueden extrapolarse a los humanos. Los datos experimentales muestran que una microbiota «beneficiosa» también tiene un impacto positivo en la eficacia de un tratamiento con

60

antraciclinas (Fig. 8) y, obviamente, si las especies de bacterias que tienen un papel inmunomodulador, como *Faecalibacterium prausnitzii*, son demasiado abundantes en la microbiota intestinal, estas bacterias tendrán un impacto negativo en la eficacia del fármaco.

- 5 La presente invención también se refiere a una cepa bacteriana probiótica seleccionada de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii*, *Enterococcus hirae* y *Enterococcus faecalis*, para su uso en combinación con un agente antineoplásico para inducir una respuesta inmune local y sistémica T-bet/Th1, para tratar un cáncer.

Ejemplos de probióticos según la presente invención son la cepa de *Lactobacillus johnsonii* LJFS001B, depositada el
 10 15 de noviembre de 2013 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) con el número I-4823 y la cepa del *Enterococcus hirae* EHFS001, depositada el 7 de noviembre de 2013 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) con el número I-4815.

Según una realización preferida, la cepa bacteriana según la invención es para administración oral. El experto en la
 15 materia conoce una variedad de fórmulas que pueden abarcar microorganismos vivos o muertos y que pueden presentarse como complementos alimenticios (por ejemplo, píldoras, tabletas y similares) o como alimentos funcionales como bebidas, yogures fermentados, etc.

La presente invención también se refiere al uso de dichos probióticos, en combinación con un tratamiento
 20 antineoplásico, para tratar a un paciente con cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término «en combinación» se refiere al uso de más de un agente (por ejemplo, una cepa probiótica y un fármaco quimioterapéutico). El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que se administran las terapias al paciente, aunque es preferible administrar la cepa probiótica antes o
 25 simultáneamente con el tratamiento antineoplásico. Por ejemplo, la cepa probiótica se puede administrar antes del agente antineoplásico (por ejemplo, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), ya sea puntualmente o varias veces (por ejemplo, cada día) antes de administrar el tratamiento antineoplásico.

30 Según una realización preferida, la cepa bacteriana probiótica según la invención se usa en combinación con un agente quimioterapéutico o una inmunoterapia biológica, por ejemplo, en combinación con un tratamiento mediante un agente alquilante o mediante inmunoterapia.

Una composición que comprende al menos la cepa *Lactobacillus johnsonii* LJFS001B, (Fig. 26A) depositada el 15 de
 35 noviembre de 2013 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) con el número I-4823 y / o la cepa del *Enterococcus hirae* EHFS001 (Fig. 26B), depositada el 7 de noviembre de 2013 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) con el número I-4815, también forma parte de la presente invención. Las composiciones según la invención pueden estar en forma de complementos alimenticios (por ejemplo, píldoras, tabletas, jarabes y similares) o en forma de alimentos funcionales como bebidas, yogures fermentados, etc. Los
 40 probióticos están preferentemente vivos en estas composiciones.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a la transferencia de células adoptivas de células Th17 (pTh17) «patógenas» derivadas de células CD4+ T de un paciente con cáncer, preferentemente en combinación con un
 45 tratamiento antineoplásico tal como una quimioterapia (por ejemplo, con un agente alquilante) o una inmunoterapia (por ejemplo, vacuna antitumoral,...), para el tratamiento de dicho paciente. Por ejemplo, las células CD4+ T sin tratamiento previo pueden obtenerse de la sangre, luego amplificarse y estimularse ex vivo en presencia de citoquinas que favorecen el fenotipo pTh17 (por ejemplo, en presencia de IL-1β, IL-6, IL-21 e IL-23 y opcionalmente IL-1b + IL-9) así como la reticulación de TCR (tal como perlas recubiertas con Ac anti-CD3 / anti-CD28). Como se describió anteriormente, las células pTh17 comparten características distintivas de las células Th1 (expresión
 50 nuclear del factor de transcripción T-bet, expresión citoplásmica de IFNγ y exposición superficial del receptor de quimiocinas CXCR3) y células Th17 (expresión de RORγt, IL-17 y CCR6). El fenotipo de las células se controla antes de su transferencia al paciente. Si es necesario, las células obtenidas ex vivo se seleccionan para conservar solo aquellas que exhiben el fenotipo pTh17.

55 Otras características de la invención también se harán evidentes en el curso de la descripción que sigue a los ensayos biológicos que se han realizado en el marco de la invención y que le proporcionan el soporte experimental requerido, sin limitar su alcance.

EJEMPLOS

60

Ejemplo 1: La microbiota intestinal modula los efectos inmunes anticancerosos de la ciclofosfamida - estudio en ratones

Materiales y procedimientos

N.b. : a menos que se indique lo contrario, los materiales y el procedimiento que se describen en el presente ejemplo son aquellos que también se han utilizado en los otros ejemplos.

- Animales y modelos tumorales. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de conformidad con las leyes y regulaciones francesas y europeas. Los ratones se utilizaron entre las 7 y 14 semanas de edad. Los ratones WT SPF C57BL/6J y DBA2/J se obtuvieron de Harlan, Charles River o Janvier y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos (SPF). Los ratones *Nod1^{-/-}Nod2^{-/-}* y *Nod2^{-/-}* C57BL/6J fueron proporcionados por I. Gomperts Boneca (Institut Pasteur, Francia), los ratones *Myd88^{-/-}* C57BL/6J por B. Ryffel (CNRS, Francia) y los ratones sin gérmenes C57BL/6J se obtuvieron de CDTA (Orleáns, Francia) o del Instituto Pasteur y se mantuvieron en aisladores estériles. MCA205, B16F10 (singénicos de ratones C57BL/6J) y P815 (singénicos de ratones DBA2/J) se cultivaron a 37°C bajo 5 % de CO₂ en RPMI 1640 que contenía el 10 % de FCS, 2 mM de L-glutamina, 100 UI / ml de penicilina / estreptomina, 1 mM de piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen). 0,5 - 1 × 10⁶ de células tumorales MCA205, 0,3 × 10⁶ de B16F10 o 0,8 × 10⁶ de P815 se inocularon s.c. en el flanco derecho. La quimioterapia se realizó mediante inyección intratumoral de doxorubicina (Doxo) (2 mM, 50 µl) o inoculación intraperitoneal de CTX (100 mg / kg de peso corporal) cuando los tumores alcanzaron 35-60 mm².
- Tratamiento de ratones KP portadores de adenocarcinoma de pulmón mediante quimioterapia. Ratones *Kras^{LSL-G12D}/WT*; *p53^{Flx/Flx}* de ocho semanas de edad recibieron un adenovirus que expresaba Cre recombinasa por instilación intranasal (definido como d0). El sistema de recombinasa Cre activa el *Kras (Kras^{G12D})* oncogénico y desactiva el *p53* en unas pocas células somáticas del pulmón; los adenocarcinomas de grado 3 y 4 se hacen visibles en ~d70 (Cortez-Retamozo y col., 2013). Los ratones se dejaron sin tratar o recibieron quimioterapia (d84, d91 y d98) en ausencia o presencia de 0,25 mg / ml de vancomicina (mezclada con agua potable iniciando en d77 y hasta el final del experimento; el agua que contiene antibióticos se reemplazó cada dos semanas). Los volúmenes tumorales se cuantificaron en d73 y 100 (equivalente de quimioterapia 'previa' y 'posterior') en ratones anestesiados mediante imagenología no invasiva como se describió anteriormente (Cortez-Retamozo y col., 2013). Los datos muestran cambios absolutos en los volúmenes totales de tumores de pulmón (media ± SEM) entre los dos momentos.
- Reactivos. La ciclofosfamida (CTX) (Endoxan, Baxter) fue proporcionada por el Instituto Gustave Roussy. El clorhidrato de doxorubicina (D1515) y el isotiocianato-dextrano de fluoresceína (FITC-dextrano) (46944, 4 kDa) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Anticuerpos anti-ratón para CD3ε, CXCR3 (CXCR3-173), CD4 (GK1.5), CD8α (53-6.7), γδ TCR (GL-3), IL-17 (eBio17B7), IFNγ (XMG1.2), T-bet (4B10), RORγt (AFKJS-9), CD45, CCR6 (140706) se obtuvieron de BioLegend, eBioscience y R&D. La fluorescencia de tinción amarilla fijable por VIVO / MUERTO para la tinción de viabilidad se adquirió de Invitrogen/Molecular Probes. Todas las células se analizaron en un citómetro de flujo Cyan (Beckman Coulter) o FACSCANTO II (BD) con el software FloJo (Tree Star).
- Protocolos de antibióticos. Los ratones fueron tratados con antibióticos 2-3 semanas antes de la implantación del tumor y se continuó hasta el final del experimento. Una mezcla de ampicilina (1 mg / ml) + estreptomina (5 mg / ml) + colistina (1 mg / ml) (Sigma-Aldrich) o vancomicina (0,25 mg / ml) o colistina sola (2·10³ U/ml) se añadieron en agua potable estéril. Las soluciones y botellas se cambiaron 2-3 veces por semana. La actividad antibiótica se analizó mediante cambios macroscópicos observados a nivel del intestino ciego (dilatación) y cultivando los sedimentos fecales resuspendidos en BHI+15 % de glicerol en placas de agar sangre y agar sangre anaeróbico durante 48 horas a 37°C con 5 % de CO₂ para condiciones aeróbicas o en condiciones anaeróbicas respectivamente. En los experimentos que se muestran en la Fig. 4, la vancomicina sesgó el repertorio de bacterias comensales hacia distintas especies comensales (como *E. coli* y diferentes especies de *Clostridium*, Fig. 16) mientras que la colistina promovió el crecimiento de *E. faecalis*.
- Aislamiento bacteriano, cultivo e identificación. Los ganglios linfáticos mesentéricos y los bazo se extrajeron de forma aséptica, se desintegraron en PBS y se colocaron en placas de agar COS (BioMérieux), para el crecimiento aeróbico y anaeróbico. Después de 48 h de cultivo, se aislaron colonias individuales y se almacenaron en glicerol a -80°C.
- Diluciones seriales de heces de ratones sin tratamiento previo o portadores de tumores tratados con NaCl o CTX, vancomicina o antibióticos de amplio espectro (ATB) (ampicilina + estreptomina + colistina), se colocaron en placas de agar COS y, después de 48 h, se aislaron colonias individuales y se realizó una tinción de Gram. La identificación de bacterias específicas se realizó mediante la combinación de pruebas morfológicas y el análisis a través del sistema automatizado VITEK® (BioMérieux, Francia) y se verificó en espectrometría de masas (MALDI-TOF, véase abajo) realizados en el Instituto Pasteur, París, Francia.

La *P. distasonis* utilizada en los experimentos se aisló de heces de ratones SPF tratados con ATB de amplio

espectro prolongado y se identificó como se describe anteriormente. Para experimentos *in vitro*, *E. hirae*, *E. faecalis* y *E. coli* se cultivaron en medio BHI (analítica de Fluka), mientras que *L. johnsonii*, *L. plantarum* y *L. murinus* se cultivaron en caldo MRS (BD) a 37°C hasta que alcanzan un OD₆₀₀= 1 cuando el crecimiento era exponencial. *L. reuteri* se cultivó en condiciones anaeróbicas en placas de agar COS durante 48 horas a 37°C. Las diluciones en serie de las preparaciones de bacterias se colocaron en placas de manera que las dosis administradas pudieran evaluarse. *E. coli* MC1061, *E. faecalis* JH2-2 y *L. plantarum* NCIMB8826 fueron proporcionadas amablemente por I. Gomperts Boneca, Instituto Pasteur, Francia. *P. distasonis* se cultivó en placas de agar COS en condiciones anaeróbicas durante 48 h, luego las colonias se resuspendieron en PBS para alcanzar un OD₆₀₀=1.

- 10 La identificación de las bacterias se realizó mediante análisis MALDI-TOF y secuenciación del gen 16S rRNA. El análisis de MALDI-TOF MS se realizó en células preparadas de la siguiente manera. Las cepas se cultivaron durante la noche a 37°C en agar MRS. Aproximadamente 5 a 10 mg de células se resuspendieron en 300 µl de agua ultrapura estéril y 900 µl de etanol absoluto, se homogeneizaron moviendo los tubos, se centrifugaron durante 2 minutos a 13000 g y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 50 µl de ácido fórmico al sedimento
- 15 y se mezclaron antes de la adición de 50 µl de acetonitrilo. La mezcla se centrifugó de nuevo a 13000 g durante 2 min. Se observó un microlitro del sobrenadante en la placa de muestra MALDI-TOF y se secó al aire a temperatura ambiente. Cada muestra se cubrió con 1 µl de solución de matriz (HCCA) (Bruker Daltonics ref. 201344: solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50 % - ácido trifluoroacético al 2,5 %) y se secó al aire a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron con un espectrómetro de masas Autoflex (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) utilizando el software flexcontrol (versión 3.0). Los espectros se registraron en el modo lineal positivo (frecuencia láser, 200 Hz, fuente de iones 1, voltaje a 20 kV; fuente de iones 2, voltaje a 18,4 kV; voltaje de la lente, 9,1 kV; rango de masa, 2000-20.000 Da). Para el análisis automatizado de datos, los espectros sin procesar se procesaron utilizando el software MALDI BioTyper 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) con la configuración predeterminada. El gen 16S rRNA de las cepas estudiadas se amplificó por PCR utilizando los cebadores
- 20 universales A, 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 1) (posición 8 a 27, numeración de *Escherichia coli*) y H, 5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3' (SEQ ID NO: 2) (posición 1541 a 1522) (Bottger, 1989), en un termociclador GeneAmp® (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) y los siguientes parámetros: 4 min a 94°C, 25 ciclos de 1 min a 94°C, 25 de 1 min a 57°C, 25 de 2 min a 72°C con una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. La secuenciación de los amplicones generados por PCR fue realizada por GATC Company utilizando los cebadores A,
- 25 H y otros dos cebadores de secuenciación (sistema de enumeración de *E. coli*): B, 5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' (SEQ ID NO: 3), posición 339 a 358; y G, 5'-GCATGTGGTTTAATTCTGA-3' (SEQ ID NO: 4), posición 947 a 964. Las secuencias casi completas del gen que codifica el 16S rRNA se obtuvieron después del ensamblaje utilizando el software BioNumerics versión 6.6 (Applied-Maths, Bélgica) y luego se analizaron en el programa NCBI BLAST.

- 35 Histología e inmunofluorescencia del tejido intestinal. Se extirpó todo el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), se limpió el contenido fecal y se fijó en 4 % de PFA durante 1 h. La rehidratación del tejido se realizó en sacarosa al 15 % durante 1 hora y en sacarosa al 30 % durante la noche. Dependiendo del experimento, el intestino delgado fue enrollado en su totalidad o cortado en trozos pequeños, y luego embebidos en la temperatura de corte óptima (OCT),
- 40 se prepararon compuestos (Sakura), se congelaron instantáneamente y se crearon secciones longitudinales o transversales de 6 µm.

- Para los análisis histológicos, las secciones longitudinales se contratiñeron con hematoxilina y eosina. Para los análisis cuantitativos histológicos, se puntuaron los focos inflamatorios, las vellosidades alteradas y el espesor de la lámina propia para cada sección, mientras que el número de células caliciformes se contó para cada vellosidad. Para la enumeración de células de Paneth, las secciones longitudinales se permeabilizaron con tritón al 0,5 % durante 15 min, y se bloquearon con una solución de tritón al 0,1 %, suero al 5 % y BSA al 1 % durante 1 h. Luego, se usó un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína de lisozima (1:500 durante 1 h, Thermo Scientific) y un fragmento de Alexa Fluor 488 de IgG anti-conejo de cabra (1:300 durante 1 h, Molecular Probes). Todas las etapas
- 50 fueron realizadas a temperatura ambiente. Las áreas positivas a lisozima se cuantificaron en imágenes de mosaico utilizando el software Histolab (Microvision Instruments). La cuantificación de las células de Paneth se realizó midiendo el área promedio de los grupos positivos a lisozima (grupo de células de Paneth), así como la emisión / µm² de esos grupos (no mostrados).

- 55 Tinciones de inmunofluorescencia de los leucocitos intestinales. Para la cuantificación de las células γδ TCR⁺ y γδ TCR⁻ T, las secciones transversales se bloquearon con una solución de tritón al 0,1 % y suero normal de cabra al 10 % durante 1 h. Luego, las secciones se inmunizaron con anti-γδ TCR de hámster (10 µg / ml O / N 4°C, BD Pharmingen) y con A488 anti-hámster de cabra (7,5 µg / ml durante 45 min, Jackson ImmunoResearch) como anticuerpo secundario o con anti-ratón CD3 A647 de hámster (5 µg / ml durante 2 h, Biolegend). Para cada sección,
- 60 el número de células totales, γδ TCR⁺ CD3⁺ y CD3⁺ se contaron las células para determinar el porcentaje de células γδ TCR⁺ y γδ TCR⁻ T.

Ensayo de permeabilidad intestinal in vivo. La integridad de la barrera intestinal se evaluó mediante la permeabilidad a FITC-dextrano (4 kDa, Sigma Aldrich). Catorce horas después de la inyección por inmunoprecipitación con NaCl o CTX a 100 o 200 mg / kg, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y luego se alimentaron por vía oral con FITC-dextrano a 0,6 mg / g de peso corporal (80 mg / ml en NaCl, 18 h después del tratamiento con NaCl/CTX).

5 Después de 3 a 4 h, los ratones se sacrificaron y se desangraron mediante punción cardíaca. Los niveles de FITC en plasma se determinaron posteriormente utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}=485/535$ nm).

Aislamiento de células de la lámina propia del intestino delgado. Se recolectó el duodeno e íleon completos, se retiraron los parches de Peyer, así como todos los residuos de grasa y el contenido fecal. Se obtuvieron pequeños fragmentos cortándolos primero longitudinalmente a lo largo de la longitud y luego transversalmente en piezas de 1-2 cm de longitud. Después de eliminar los linfocitos intraepiteliales (IEL), las piezas del intestino se cortaron y se incubaron con 0,25 mg / ml de collagenasa VIII y 10 U / ml de ADNasa I durante 40 minutos a 37°C bajo agitación para aislar células de la lámina propia (LPC). Después de la digestión, las piezas intestinales se trituraron en un colador de células. Para el análisis de FACS, las suspensiones celulares se sometieron a un gradiente de percoll durante 20 minutos a 2100 RPM, mientras que, para la extracción de ARN, las células se lisaron directamente en tampón RLT (Qiagen) y se congelaron a -80°C.

Análisis de subconjuntos de células dendríticas en el intestino delgado tratado con CTX. Se prepararon suspensiones celulares de bazo de ratón y ganglios linfáticos mediante digestión con collagenasa y ADNasa durante 60 minutos y posteriormente se filtraron a través de una malla de 70 μ m. Los linfocitos del colon y del intestino delgado se aislaron como se describió anteriormente (Schlitzer y col., 2013). En resumen, el colon y el intestino delgado se digirieron en PBS que contenía 5 mM de EDTA y 2 mM de DTT con agitación a 37°C. Después de la digestión inicial, se digirieron los pedazos de tejido del intestino delgado y del colon en collagenasa / ADNasa que contenía medio RPMI durante 30 min. Las piezas de tejido se colaron adicionalmente a través de una malla de 70 μ m. Para los análisis de citometría de flujo, las suspensiones celulares se tiñeron con anticuerpos contra los siguientes marcadores de superficie: CD11c (N418), CD11b (M1/70), Ly6c (HK1.4), MHC clase II (M5/114.15.2), CD24 (M1/69), CD64 (X54-5/7.1), CD317 (ebio927), CD45 (30-F11), F4/80 (C1:A3-1), CD8 α (53-6.7). DAPI se utilizó para la exclusión de células muertas. Los anticuerpos se adquirieron de eBiosciences, BD Biosciences o BioLegend respectivamente. Las poblaciones celulares se seleccionaron de la siguiente manera: intestino delgado (fracción migratoria): CD103⁺ DC (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD103⁺ CD24⁺), CD11b⁺ CD103⁺ (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD103⁺ CD11b⁺ CD24⁺), CD11b⁺ (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD24⁺), DC inflamatoria (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD64⁺ Ly6c⁺), intestino grueso: CD103⁺ DC (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD103⁺ CD24⁺), CD11b⁺ (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD24⁺), DC inflamatoria (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD64⁺ Ly6c⁺).

35 Reconstitución de microbiota. Para la inoculación de ratones GF con SFB, se recogieron sedimentos fecales de ratones monocolonizados con SFB con tubos de ensayo esterilizados. La colonización se realizó por sonda oral con 200 μ l de suspensión obtenida homogeneizando los sedimentos fecales en agua. La colonización eficiente se verificó primero antes de la inoculación del tumor.

40 *E. hirae*, *L. johnsonii* y *L. plantarum* se cultivaron en caldo BHI (analítica de Fluka) y MRS (BD), respectivamente, durante la noche a 37°C. Las bacterias se centrifugaron, se lavaron una vez y se volvieron a suspender en PBS estéril a un OD(600 nm) de 1, que corresponde aproximadamente a 1x10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) / ml. Se mezcló el mismo volumen de cada suspensión de bacterias para obtener una suspensión de igual proporción de cada tipo de bacteria a 1x10⁹ bacterias / ml. *L. reuteri* se cultivó en condiciones anaeróbicas en placas de agar COS durante 48 horas a 37°C. Para la colonización de *P. distasonis*, los ratones se trataron con una mezcla de ampicilina / estreptomycin / colistina (ATB) durante 4 semanas y se inocularon por vía oral con 10⁹ UFC en 200 μ l de PBS 4 días después de la inoculación de MCA205. Para otros experimentos, después de 2-3 semanas de ATB, el tratamiento se detuvo y los ratones se extrajeron por vía oral con 10⁹ UFC de *E. hirae* + *L. johnsonii* o *L. plantarum* o *L. reuteri* un día después de la administración de CTX y de 0 a 3 días después de la suspensión del tratamiento.

50 TCR y ensayos de células T. Para el experimento de entrecruzamiento, 2 x 10⁵ esplenocitos totales por pocillo (después de la lisis de glóbulos rojos) se incubaron en placas MaxiSorp (Nunc) recubiertas con mAb anti-CD3 ϵ (145-2C11) (0,5 μ g por pocillo; eBioscience) y / o mAb anti-CD28 (37.51) (2 μ g / ml; BD). Los sobrenadantes se analizaron a las 48 h mediante ELISA para IL-17A de ratón (eBioscience) e IFN γ (BD). Para los análisis de TIL, los tumores se extrajeron, se cortaron en trozos pequeños y se digirieron en Liberasa TM (Roche) y ADNasa I durante 30 minutos a 37°C. Se obtuvieron suspensiones unicelulares triturando el tejido digerido con un émbolo de jeringa y filtrando a través de un colador de células de 100 μ m. Para intracelular, las células se incubaron durante 4 horas a 37°C con 50 ng / ml de PMA, 1 μ g / ml de ionomicina y BD Golgi STOP™. Después de la tinción de la membrana, las células se tiñeron con anti-IL-17A, IFN γ , T-bet y ROR γ t utilizando eBioscience FoxP3 / conjunto de tampón de tinción de factor de transcripción.

Polarización y propagación de células T in vitro. Transferencia adoptiva de células Th17 (Th17 patógenas o

reguladoras). Se obtuvieron células CD4⁺ T (CD4⁺CD62L^{hi}) sin tratamiento previo de bazo y nódulos linfáticos de ratones C57BL/6 WT. Las células se clasificaron por citometría de flujo (BD ARIA III con el software FACSDiva) en consecuencia. La pureza de las poblaciones de células T aisladas habitualmente superó el 95 %. Las células T sin tratamiento previo se estimularon con anticuerpos unidos a la placa contra CD3ε (145-2C11, 2 µg / ml) y CD28 (PV-1, 2 µg / ml) en presencia de IL-1β de ratón recombinante (10 ng / ml), IL-6 (10 ng / ml) e IL-23 (20 ng / ml) (pTh17) o TGF-β (2,5 ng / ml) e IL-6 (Th17) (Miltényi). El regulador Th17 (Th17) resultó de una diferenciación en TGF-β (2,5 ng / ml) e IL-6, mientras que la Th17 patógena (pTh17) resultó de la incubación en IL-1β, IL-6 e IL-23. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 3×10⁶ células T. *Cebado de células T in vitro*. Las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) se generaron a partir de fémures y tibias de ratones C57BL/6, se cultivaron durante 8 días en medio de Iscove (Sigma-Aldrich) con sobrenadante J558 (que contiene 40 ng / ml de GM-CSF), 10 % de FCS, 100 UI / ml de penicilina / estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y se divide cada 3-4 días. En el día 8, las BMDC se infectaron con las cepas bacterianas aisladas a una MOI (multiplicidad de infección) de 1:50 durante 1 hora a 37°C en el medio apropiado sin antibióticos. Luego, las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio completo suplementado con gentamicina (50 mg / ml) para matar las bacterias extracelulares. Después de 24 h, las BMDC se cultivaron junto con células CD4⁺ CD62L⁺ T sin tratamiento previo, purificadas a partir del bazo y ganglios linfáticos (Miltényi), en la proporción 1:1 durante 4 días. Los sobrenadantes de cultivo se analizaron para IL-17 e IFNγ mediante ELISA. Respuesta de memoria de células T CD4⁺. Las BMDC se infectaron con diferentes dosis de bacterias (relación células:bacterias 1:2, 1:10 y 1:50) como se describió anteriormente y después de 24 h se cultivaron 1:1 con células CD4⁺ T, purificadas a partir de bazo (Miltényi) de ratones C57BL/6 tratados con CTX o NaCl. Después de 24 h, los sobrenadantes de cultivo se ensayaron para IL-17 e IFNγ mediante ELISA.

Transferencia adoptiva de células T. Se generaron ratones B6.CB1r1 TCR transgénicos (Cb1r1 Tg) (Cong y col., 2009) y se criaron en la Instalación de Animales de la Universidad de Alabama en Birmingham. Todos los experimentos fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Alabama en Birmingham. Las células CD4⁺ T se aislaron de ratones B6.CB1r1 TCR Tg utilizando perlas magnéticas CD4 anti-ratón. Brevemente, las células esplénicas se lavaron dos veces y se incubaron con perlas magnéticas anti-CD4 a 4°C durante 30 minutos y luego se separaron por campo magnético. Cuando se verificó mediante citometría de flujo, más del 95 % de las células eran células CD4⁺ T. Un millón de células CB1r1 Tg T (CD45.1⁺) se transfirieron de forma adoptiva por vía intravenosa a ratones congénicos sin tratamiento previo tratados con CTX o NaCl (CD45.2⁺) dos días después de la quimioterapia y los bazo se recogieron en el día 5-7 posterior a la transferencia para los análisis de citometría de flujo y reestimulaciones de esplenocitos *ex vivo*. Análisis de citometría de flujo selecciono en células CD45.1⁺ para apreciar porcentajes de IL-17⁺ intracelular o células IFNγ⁺ después de la reestimulación de PMA / ionomicina 5 h en presencia de monensina. Otros esplenocitos se incubaron por triplicado en placas de fondo plano de 24 pocillos a 1,0 millones / ml, se cultivaron sin o con CB1r1-péptido 455-475 (DMATEMVKYSNANILSQAGQ) a 1 µg / ml y los sobrenadantes se analizaron utilizando ELISA comercial específico de anti-IFNγ.

RT-PCR cuantitativa para la determinación de péptidos antimicrobianos. Se aislaron células de lámina propia del duodeno, ileon y colon 18 h después de CTX, y la extracción total de ARN y la eliminación de ADN genómico se realizaron con el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ARN total y la eliminación del ADN genómico del ileon o duodeno se realizaron con el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc con la transcriptasa inversa SuperScript III y el inhibidor de la ribonucleasa recombinante RNaseOUT™ (Life Technologies, Saint Aubin, Francia), en presencia de cebadores aleatorios (Promega, Charbonnières, Francia) y el conjunto de trifosfato de desoxinucleósido, grado de PCR (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). La expresión de los genes relacionados con RegIIIy (Mm00441127_m1) y LysM (Mm01612741_m1) se analizó con los ensayos de expresión génica TaqMan® utilizando el Universal Master Mix II en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Life Technologies, Francia). Los datos cuantitativos de RT-PCR se normalizaron invariablemente a los niveles de expresión del gen de mantenimiento peptidilprolil isomerasa A (*Ppia*) por medio del procedimiento 2^{-ΔCt}.

Extracción de ADN microbiano, pirosecuenciación 454 y PCR cuantitativa en bacterias comensales. El ADN total se extrajo de muestras de mucosa (~50-100 µg) como se describió anteriormente (Lepage y col., 2005; Seksik y col., 2003) usando lisis física y química. La concentración de ADN y la integridad se determinaron visualmente mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % que contenía bromuro de etidio y espectrofotométricamente utilizando un instrumento Nanodrop (Thermo Scientific).

La composición de la microbiota se evaluó mediante pirosecuenciación 454 (tecnología GS FLX Ti) dirigidas a la región V3-V4 del gen bacteriano 16S rRNA (V3fwd: 5'TACGGRAGGCAGCAG3', SEQ ID NO: 5; V4rev: 5'GGACTACCAGGTATCTAAT3', SEQ ID NO: 6). Las secuencias se recortaron para los códigos de barras, los cebadores de PCR y se agruparon para una longitud de secuencia mínima de 300 pb, un umbral de calidad de base mínimo de 27, una longitud de homopolímeros máxima de 6. Las secuencias resultantes se asignaron a los

diferentes niveles taxonómicos, desde el filo al género, utilizando la base de datos RDP (versión 10, actualización 31) (Cole y col., 2009). Las secuencias se agruparon en OTO (unidades taxonómicas operacionales o filotipos) al 97 % de la identidad utilizando QIIME (Caporaso y col., 2010) y cdhit (Li y Godzik, 2006). Las OTO se asignaron a los vecinos taxonómicos más cercanos y a las especies bacterianas relativas utilizando Seqmatch (RDP) y Blastall (NCBI). Se calculó la abundancia relativa de cada OTO y otros niveles taxonómicos (de filo a género) para cada muestra para considerar los diferentes niveles de muestreo en múltiples individuos. Después del recorte, el número de secuencias agrupadas dentro de cada OTO (u otros niveles taxonómicos) se convirtió en una fracción que representa la contribución relativa de cada característica a cada uno de los individuos. Para la representación de mapas de calor, se aplicó la transformación \log_{10} en la matriz de datos de abundancia relativa, lo que permitió visualizar similitudes o diferencias entre muestras que afectan a miembros de la comunidad que pueden representar menos del 1 % de la abundancia relativa en una muestra. Los análisis de componentes principales de las diferentes microbiotas de ratones se calcularon en función de la composición del género bacteriano. La robustez de cada resultado de agrupación se evaluó mediante una prueba de clasificación de Monte Carlo ($n = 10\,000$ repeticiones, $p < 0,05$) (Romesburg, 1985). Para obtener más información sobre los recuentos de bacterias, se aplicó PCR cuantitativa. Los sistemas qPCR dirigidos se aplicaron utilizando la tecnología Taqman (para los sistemas dirigidos al dominio de todas las bacterias, grupo *Clostridium leptum* (Mayeur y col., 2013) o SybrGreen (para sistemas dirigidos al grupo de *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* (Mayeur y col., 2013), grupo del *Enterococo* (Furet y col., 2009), SFB (Yin y col., 2013) y TM7 (Hugenholtz y col., 2001)). No se observaron modulaciones específicas de CTX de las cantidades relativas de SFB y TM7 o *Clostridium* grupo XIV en el día 7 después de CTX (no mostrado). La PCR cuantitativa se realizó utilizando un sistema de detección de secuencias ABI 7000 con la versión de software 1.2.3 (Applied-Biosystems). La amplificación y detección se llevaron a cabo con TaqMan Universal PCR 2_MasterMix (Applied-Biosystems) o con SYBR-Green PCR 2_Master Mix (Applied-Biosystems) por duplicado en un volumen final de 25 μ l con 10 μ l de diluciones apropiadas de muestras de ADN como se describió anteriormente. Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando el siguiente perfil de incremento: 1 ciclo a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 60°C durante 1 min. Para la amplificación de SYBR-Green, se agregó una etapa de fusión (Yin y col., 2013). Para la cuantificación de los grupos bacterianos, se generaron curvas estándar a partir de diluciones en serie de una concentración conocida de ADN genómico de un representante de cada grupo. Las curvas estándar se generaron mediante el trazado de los ciclos de umbral (Ct) frente a la cantidad de bacterias (UFC). El número total de bacterias (UFC) se interpoló a partir de las curvas estándar promediadas.

Caracterización de células Th17 transferidas adoptivamente mediante análisis cuantitativo de PCR. El ARN total de las células T se extrajo con Trizol (Invitrogen). De 100 a 300 ng de ARN se transcribieron de forma inversa en ADNc mediante M-MLV transcriptasa inversa, cebadores aleatorios e inhibidor de RNaseOUT (Invitrogen). El ADNc se cuantificó mediante PCR en tiempo real con un kit de PCR en tiempo real SYBR Green (Applied Biosystems) en un sistema de detección Fast7500 (Applied Biosystems, Francia). Los niveles relativos de ARNm se determinaron con el procedimiento Δ Ct. Los valores se expresaron en relación con la ciclofilina A. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se describen a continuación.

Tabla 1: oligonucleótidos utilizados para caracterizar los perfiles de expresión de células Th17

Gen	Directa	SEQ ID NO	Inversa	SEQ ID NO
<i>Actina</i>	ATGGAGGGGAATACAGCCC	7	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	8
<i>Cd3e</i>	CCAGGATACTGAGGGCATGT	9	CTTATCAGTTGGCGTTTGGG	10
<i>Cd4</i>	CCTGTGCAAGAAGCAGAGTG	11	GTTCTGCTGATTCCCCTTCC	12
<i>Ppia</i>	GGCCGATGACGAGCCC	13	TGTCTTTGGAACCTTTGTCTGCAA	14
<i>Eomes</i>	CAGCACACCTCTACGAACA	15	CGCCACCAAACCTGAGATGAT	16
<i>Foxp3</i>	CTCGTCTGAAGGCAGAGTCA	17	TGGCAGAGAGGTATTGAGGG	18
<i>Gata3</i>	AGGATGTCCCTGCTCTCCTT	19	GCCTGCGGACTCTACCATAA	20
<i>Ifng</i>	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	21	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	22
<i>Il10</i>	TGTCAAATTCATTCATGGCCT	23	ATCGATTCTCCCCTGTGAA	24
<i>Il17a</i>	TGAGCTTCCCAGATCACAGA	25	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA	26
<i>Rorc</i>	GGTGATAACCCCGTAGTGGA	27	CTGCAAAGAAGACCCACACC	28
<i>Tbx21</i>	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG	29	TCAACCAGCACCAGACAGAG	30
<i>Tgfb</i>	CAACCCAGGTCCTTCCTAAA	31	GGAGAGCCCTGGATACCAAC	32

Bioinformática y estadísticas. A excepción de los datos de proporción y recuento que se compararon respectivamente mediante regresión beta y regresión binomial negativa, se aplicó un modelo lineal para evaluar el impacto del tratamiento sobre los parámetros en su escala original o en la escala logarítmica. El examen sistemático de los residuos del modelo y la aplicación de herramientas de diagnóstico respectivas a cada procedimiento confirmaron el ajuste apropiado de los datos. La influencia del tumor y del tratamiento con CTX en el contenido de bacterias se estimó por la máxima probabilidad de considerar las mediciones no detectadas como se describió anteriormente (Helsel, 2005). Dado que en ambos parámetros podrían aparecer no detectables, se computó la tau

de Kendall (Newton y Rudel, 2007) para estudios de correlación entre IL-17 / IFN γ y el contenido de bacterias con las bandas de error estándar de la línea de regresión estimadas por autodocimante (B = 1999). Se obtuvieron resultados similares mediante estudios de validación adicionales que incluyeron la aplicación del mismo procedimiento a los datos donde se excluyeron las muestras con no detectables y la determinación de los valores de p por permutación. El modelado del crecimiento tumoral se realizó mediante el modelado del efecto mixto lineal en las superficies tumorales procesadas previamente mediante logaritmo (Demidenko, 2006; Sugar y col., 2012). Los valores de p informados se obtienen de la prueba conjunta de que tanto las pendientes de crecimiento del tumor como las intercepciones (en escala logarítmica) son iguales entre los grupos de interés de tratamiento. En aras de la claridad, el resultado de la prueba solo se proporciona para las comparaciones que sean significativas a $p < 0,05$.

10 Las pruebas de pares post-hoc en un solo momento de muestreo confirmaron los efectos informados en los gráficos. Debe tenerse en cuenta que no se destacaron diferencias significativas en el área del tumor entre los grupos de tratamiento en el momento del tratamiento. Las incidencias de "presencia / ausencia de crecimiento tumoral" se compararon con la regresión logística de probabilidad penalizada de Firth (Heinze, 2006). Todas las pruebas registradas son bilaterales y se consideraron significativas: *, para un valor de $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$, ns, no significativo.

Resultados

En el presente ejemplo, se describe el impacto de la CTX en la microbiota del intestino delgado y sus efectos subsiguientes en la respuesta inmune antitumoral.

El estado inflamatorio de la barrera epitelial intestinal se caracterizó 48 horas después de la terapia con dosis no mieloablativas de CTX o la antraciclina doxorubicina en ratones sin tratamiento previo. Ambos fármacos causaron acortamiento de las vellosidades del intestino delgado, discontinuidades de la barrera epitelial, edema intersticial y acumulación focal de células mononucleares en la lámina propia (LP) (Fig. 1A-B). Después de la quimioterapia, el número de células caliciformes y de células de Paneth aumentó respectivamente en vellosidades (Fig. 1C) y criptas (Fig. 1D). La enzima lisozima antibacteriana (pero no el péptido microbicida RegIII γ) estaba regulada por incremento en el duodeno de ratones tratados con CTX (Fig. 1E). El isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano administrado por vía oral se detectó en la sangre (Yang y col., 2013) 18 h después de la CTX, lo que confirma un aumento de la permeabilidad intestinal (Fig. 1F). La interrupción de la barrera intestinal estuvo acompañada por una translocación significativa de bacterias comensales en ratones > 50 % en ganglios linfáticos mesentéricos y bazo que fueron bien detectables 48 h después de la CTX, menos después del tratamiento con doxorubicina (Fig. 2A). Varias especies bacterianas Gram⁺, incluidas *Lactobacillus johnsonii* (aumentando en > 40 % de los casos), *Lactobacillus murinus* y *Enterococcus hirae*, se podrían cultivar a partir de estos órganos linfoides (Fig. 2B).

A continuación, se analizó la composición global de la microbiota intestinal mediante una pirosecuenciación 454 de alto rendimiento, seguido de una PCR cuantitativa dirigida a las bacterias de dominio y a grupos bacterianos específicos. Aunque la CTX no causó gran disbiosis en los primeros momentos (24-48 h, Fig. 5), la CTX alteró significativamente la composición microbiana del intestino delgado (pero no del intestino ciego) en ratones con cánceres subcutáneos (a saber, melanomas metastásicos B16F10) y sarcomas no metastásicos MCA205) una semana después de su administración (Fig. 2C, Fig. 5). Según informes anteriores sobre muestras fecales de pacientes (Zwiehler y col., 2011), la CTX indujo una reducción de las especies bacterianas del filo de *Firmicutes* (Fig. 5) distribuidas en cuatro géneros y grupos (*Clostridium* grupo XIVa, *Roseburia*, *Lachnospiraceae* sin clasificar, *Coprococcus*, Tabla 2) en la mucosa de animales tratados con CTX.

Filo	Género	Nombre de secuencia del 1er aislado	Todos los animales				Portadores de tumor				
			AN	S	ab	Co	CT	Valor p	Co	CT	Valor p
Firmicutes	Unclassified_Clostridiaceae 1	Segmented filamentous bacterium	X77814	1.000	0,83	7,95	0,083	0,58	2,55		
Firmicutes	Lactobacillus	Lactobacillus reuteri; LU3	AY735406	1.000	0,13	0,24		0,02	0,14	0,048	
Firmicutes	Clostridium XIVa	Butyrate-producing bacterium SM4/1	AY305314	0.908	1,31	0,21	0,045	1,76	0,20	0,049	
Firmicutes	Clostridium XIVa	Butyrate-producing bacterium M62/1	AY305309	0.920	0,43	0,07	0,056	0,54	0,06	0,049	
Firmicutes	Clostridium XIVa	Clostridium sp. Culture-41	AB622820	0.933	0,35	0,10	0,045	0,32	0,08	0,048	
Firmicutes	Clostridium XIVa	Rumen bacterium NK4A66	GU124467	0.872	0,26	0,07	0,046	0,34	0,10	0,080	
Firmicutes	Roseburia	Roseburia intestinalis; XB6B4	AM055815	0.827	0,24	0,02	0,032	0,26	0,00	0,016	
Firmicutes	Roseburia	Roseburia faecis (T); M72/1	AY305310	0.910	1,20	0,35		2,00	0,41	0,095	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Clone-49	AB622849	0.973	1,04	0,07	0,056	1,61	0,09	0,052	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. A9	DQ789119	0.942	0,70	0,23	0,045	0,96	0,27	0,024	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Lachnospiraceae bacterium 14-2	DQ789124	0.859	0,57	0,05		0,95	0,02	0,028	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Clone-40	AB622844	0.977	0,25	0,05		0,42	0,02	0,026	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Lachnospiraceae bacterium 607	AB700365	0.900	0,06	0,08		0,11	0,01	0,043	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Culture-54	AB622823	0.968	0,09	0,03	0,064	0,13	0,04	0,049	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. ASF502	AF157053	0.943	0,10	0,01	0,022	0,17	0,00	0,016	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Clone-33	AB622843	0.885	0,07	0,02	0,046	0,10	0,00	0,016	
Firmicutes	Coprococcus	Coprococcus catus; L8	AB361624	0.827	0,13	0,03		0,20	0,03	0,052	
Bacteroidetes	Tannerella	Tannerella forsythia; OB071	JN713185	0.581	0,06	0,02		0,10	0,02	0,028	

Tabla 2: disbiosis de microbiota mucosa inducida por CTX en un nivel de especies

Se representa una abundancia relativa media de especies bacterianas que se representan significativamente de manera diferente entre los ratones tratados con CTX (CTX) y los tratados con NaCl (Co). También se agrega la afiliación taxonómica de estas secuencias (niveles de filo y género). Luego de la determinación del filotipo (OTO), los 5 centroides del filotipo se asignan a su aislado relativo más cercano (base de datos RDP Seqmatch). Todos los animales se compararon juntos y los portadores de tumores se distinguieron más detalladamente. AN: Número de Acceso NCBI; Sab_Puntuación: La puntuación de similitud de RDP entre la secuencia centroide y el aislado de referencia. Valores p de la prueba de Wilcoxon.

- 10 Se aplicó una PCR cuantitativa para determinar los recuentos bacterianos de todas las bacterias y de los grupos de bacterias específicos (grupo de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium leptum* grupo IV) en la mucosa del intestino delgado de CTX frente a los ratones sin tratamiento previo y portadores de tumores tratados con vehículo. En portadores de tumores, la carga bacteriana total del intestino delgado a los 7 días posteriores a la CTX así como los recuentos bacterianos del *Clostridium leptum* no fueron afectados (Fig. 2D). Sin embargo, el tratamiento con CTX condujo a una reducción en la abundancia de lactobacilos y enterococos (Fig. 2D). En conjunto, estos datos revelan la capacidad de la CTX para provocar la translocación selectiva de distintas especies de bacterias Gram⁺ seguido por cambios significativos en el microbioma del intestino delgado.

- 20 Coincidiendo con la disbiosis 7 días después de la CTX, las frecuencias de células dendríticas CD103⁺ CD11b⁺ (Fig. 7A) y células TCRαβ⁺ CD3⁺ T que expresan el factor de transcripción RORγt (Fig. 7B) disminuyeron significativamente en la lámina propia (LP) del intestino delgado (pero no en el colon), como lo revela la citometría de flujo de tejidos disociados (Fig. 7B) y la tinción de inmunofluorescencia *in situ* (Fig. 7C). RORγt es necesario para la generación de células Th17 (que producen interleucina-17, IL-17), y se han establecido fuertes vínculos entre las respuestas de Th17 que residen en el intestino y las respuestas sistémicas en el contexto de enfermedades autoinmunes que afectan las articulaciones, el cerebro o el páncreas (Ghiringhelli y col., 2004; Lee y col., 2011; Wu y col., 2010). Confirmando el trabajo anterior (Michaud y col., 2011; Viaud y col., 2011), la CTX indujo la polarización de células esplénicas CD4⁺ T hacia un patrón Th1 (interferón-γ productor de [IFNγ]) y Th17 (Fig. 3A, Fig. 7D). Este efecto no se observó para la doxorubicina (Fig. 8). La microbiota intestinal era indispensable para la conversión de células T CD4⁺ sin tratamiento previo en productores de IL-17 en respuesta a la CTX. De hecho, la liberación de IL-17 *ex vivo* por los esplenocitos estimulados con TCR aumentó con el tratamiento con CTX de ratones libres de patógenos específicos (SPF), aunque no logró hacerlo en ratones libres de gérmenes (GF) (Fig. 3A, panel izquierdo). La esterilización del intestino mediante antibióticos de amplio espectro (ATB, una combinación de colistina, ampicilina y estreptomina, Fig. 9) también suprimió la secreción de IL-17 estimulada por CTX (Fig. 3A, panel derecho) e IFNγ mediante esplenocitos estimulados con TCR (Fig. 7D). El tratamiento de ratones con vancomicina, un antibiótico específico para bacterias Gram⁺ (Rice, 2006) también redujo la conversión de Th17 inducida por CTX (Fig. 3A, panel derecho). En ratones SPF convencionales, los recuentos de lactobacilos y SFB medidos en la mucosa del intestino delgado (Fig. 2D) se correlacionaron positivamente con la polarización Th1 y Th17 de los esplenocitos (Fig. 3B, Fig. 7E), mientras que la del *Clostridium* grupo IV no lo hizo (Fig. 3B). En conjunto, estos resultados apuntan a una asociación específica entre los componentes microbianos particulares presentes en la mucosa intestinal (y ocasionalmente en los órganos linfoides) y la polaridad de las respuestas Th inducidas por el tratamiento con CTX.

La CTX aumentó la frecuencia de las células Th17 (pTh17) «patógenas» que comparten características distintivas de las células Th1 (expresión nuclear del factor de transcripción T-bet, expresión citoplasmática de IFNγ y

exposición superficial del receptor de quimiocinas CXCR3) y de células Th17 (expresión de ROR γ t, IL-17 y CCR6) (Ghoreschi y col., 2010; Lee y col., 2012), dentro del bazo (Fig. 7F, Fig. 3C). Nuevamente, esta respuesta dependió de la microbiota intestinal (Fig. 3C). Además, el aumento en las células pTh17 requirió la expresión del gen 88 de la respuesta primaria de la diferenciación mieloide (MyD88), que señala aguas abajo de los receptores de tipo toll (Fig. 5 10A) y es necesario para el éxito terapéutico de las quimioterapias anticancerosas en varios modelos de tumores (Apetoh y col., 2007). En contraste, los dos receptores de reconocimiento de patrones, el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (Nod) 1 y Nod2, fueron prescindibles para el aumento inducido por CTX en células pTh17 esplénicas y para los efectos retardantes del crecimiento tumoral de CTX (Fig. 10B). Estos resultados establecen la capacidad de CTX para estimular las células pTh17 a través de un complejo circuito que involucra bacterias 10 intestinales y MyD88, en correlación con sus efectos anticancerosos. Más allá de su efecto general sobre la frecuencia de células pTh17, la CTX indujo respuestas inmunitarias específicas de antígeno restringidas a TCR contra bacterias comensales (Fig. 11). Por lo tanto, los autores de la invención abordaron la posibilidad de que especies bacterianas Gram⁺ que se translocaron a órganos linfoides secundarios en respuesta a la CTX (Fig. 2A) podrían polarizar células sin tratamiento previo CD4⁺ T hacia un patrón Th1 o Th17. Ambas *L. johnsonii* y *E. hirae* 15 estimularon la diferenciación de células sin tratamiento previo CD4⁺ T en células Th1 y Th17 *in vitro* en presencia de células dendríticas derivadas de la médula ósea, mientras que tanto el receptor de tipo toll 4 que activa el lipopolisacárido bacteriano purificado (LPS) o *E. coli* tuvieron un efecto menor (Fig. 12). Además, aunque se suministraron por vía oral *L. johnsonii* y *E. hirae* ni *L. plantarum* (una bacteria que no se detectó en los experimentos de translocación, Fig. 2B) ni *L. reuteri* facilitaron la reconstitución del conjunto de células pTh17 en el bazo de 20 ratones SPF tratados con ATB (Fig. 3D). Respuestas de memoria Th1 contra *L. johnsonii* se detectaron sistemáticamente en el 50 % de los ratones que recibieron CTX (Fig. 3E) pero no en los ratones de control, después de reestimulación *in vitro* de células CD4⁺ T con células dendríticas derivadas de la médula ósea cargadas con *L. johnsonii* (y en un grado menor *E. hirae*, pero no con otros comensales o patobiontes). Estos resultados sugieren que la translocación de un conjunto específico de bacterias comensales Gram⁺ puede mediar la acumulación de 25 células pTh17 impulsada por CTX y las respuestas de células T de memoria específica de bacteria Th1.

Debido a que las bacterias comensales modulan la inmunidad intestinal y sistémica después de CTX, los autores de la invención investigaron más a fondo el efecto de los antibióticos en la inhibición del crecimiento tumoral mediado por CTX. El tratamiento a largo plazo con ATB de amplio espectro redujo la capacidad de CTX para curar los 30 mastocitomas P815 establecidos en ratones DBA2 singénicos (Fig. 4A, Fig. 13A). Además, los efectos antitumorales mediados por CTX contra los sarcomas MCA205 se redujeron en GF en comparación con los ratones SPF (Fig. 4B, paneles izquierdo y central). Impulsado por las observaciones de que la CTX mayormente indujo la translocación de bacterias Gram⁺ y esas bacterias Gram⁺ en correlación con la polarización esplénica Th1 / Th17, los autores de la invención compararon la capacidad de varios regímenes de ATB, a saber, vancomicina (reduciendo las bacterias 35 Gram⁺) y colistina (reduciendo la mayoría de las bacterias Gram⁻) para interferir con los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral de la CTX. La vancomicina y, en menor medida, la colistina comprometió la eficacia antitumoral de la CTX contra el sarcoma MCA205 (Fig. 4C, Fig. 13B). Utilizando un modelo de tumor transgénico de carcinogénesis pulmonar autóctona impulsada por K-Ras oncogénica acoplada a la eliminación condicional de p53 (Cortez-Retamozo y col., 2013), se confirmó el papel inhibitorio de la vancomicina en la eficacia anticancerosa de un 40 régimen de quimioterapia basado en CTX (Fig. 4D). La vancomicina también evitó la acumulación de pTh17 inducida por CTX en el bazo (Fig. 4E) y redujo la frecuencia de células CD3⁺ T infiltradas en tumores y de células Th1 (Fig. 4F).

Aunque las heces de la mayoría de los ratones SPF tratados con ATB generalmente estaban libres de bacterias 45 cultivables (Fig. 9), algunos ratones ocasionalmente experimentaron el crecimiento de *Parabacteroides distasonis*, una especie relacionada con el mantenimiento de parte del repertorio de células T reguladoras intestinales y que media los efectos antiinflamatorios locales (Geuking y col., 2011; Kverka y col., 2011; Lathrop y col., 2011). Esta contaminación bacteriana se asoció con el fracaso de una quimioterapia inmunogénica (doxorrubicina) contra los sarcomas MCA205 establecidos (Fig. 14A). Además, la recolonización experimental de ratones esterilizados con 50 ATB con *P. distasonis* comprometió los efectos anticancerosos de la doxorrubicina (Fig. 14B), lo que demuestra que la disbiosis microbiana intestinal anula la terapia anticancerosa. Finalmente, la monoasociación de ratones GF portadores de tumores con SFB que promueve la diferenciación de células Th17 en el LP (Hooper y col., 2012; Lee y col., 2012; Wu y col., 2010) también tuvo un impacto perjudicial en el efecto inhibidor de crecimiento tumoral de CTX (Fig. 4B, panel derecho).

55 Los resultados mencionados resaltan la asociación entre las alteraciones específicas inducidas por CTX en la microbiota intestinal, la acumulación de células pTh17 en el bazo y el éxito de la quimioterapia. Para establecer un vínculo causal directo entre estos fenómenos, los autores de la invención transfirieron de forma adoptiva poblaciones de Th17 o pTh17 a ratones tratados con vancomicina y evaluaron su capacidad para restablecer el retraso del 60 crecimiento tumoral mediado por CTX. La pTh17 propagada *ex vivo* exhibió un patrón de expresión génica similar al expresado por células CD4⁺ T esplénicas inducidas por CTX *in vivo* (Fig. 15). Solo las células pTh17 y no las Th17, pudieron rescatar el impacto negativo de la vancomicina sobre el efecto terapéutico mediado por CTX (Fig. 4G).

Estos resultados enfatizan la importancia de las células pTh17 para las respuestas inmunes anticancerosas mediadas por CTX.

Para obtener más información sobre los vínculos entre la microbiota intestinal y la inmunidad celular contra el cáncer, se utilizaron dos enfoques experimentales distintos.

En primer lugar, los autores de la invención analizaron el impacto de la vancomicina en el microentorno de los cánceres de pulmón no microcítico no afectados por la activación oncogénica de K-Ras y P53 y se trataron con quimioterapia a base de CTX. Analizaron el impacto de la vancomicina en la infiltración de lechos tumorales tratados con quimioterapia por células $\gamma\delta$ T17, que se sabe que son cruciales para el reclutamiento de CTL antitumorales después de la quimioterapia (Ma y col., 2011). En ratones tratados con vancomicina o con ATB de amplio espectro, los lechos tumorales carecían de $\gamma\delta$ T17 después de la terapia en contraste con los receptores de quimioterapia tratados con agua (Fig. 17).

En segundo lugar, analizaron si afectar la microbiota intestinal con diversos regímenes de antibióticos podría interferir con la provocación de las respuestas inmunitarias primarias de Th1 o Tc1 dirigidas contra un antígeno modelo ampliamente estudiado (ovoalbúmina de pollo y su epítipo restringido inmunodominante H-2^b) que se combinaron con el agonista de TLR3 poli-(I:C) y se inyectaron en la almohadilla plantar de ratones tratados o no tratados con antibióticos que recibieron CTX. Ninguno de los antibióticos que se usaron fue capaz de inhibir la producción de IFN γ al drenar las células de los ganglios linfáticos. Del mismo modo, la secreción de IFN γ desencadenada por reestimulación con el péptido de OVA inmunodominante SIINFEKL con restricción de H-2^b se mantuvo en ratones tratados con vancomicina, lo que sugiere que las respuestas inmunes de Th1 (o Tc1) no se ven afectadas por la microbiota intestinal (Fig. 18). De este modo, en este modelo, la eliminación mediada por antibióticos de las bacterias comensales causa defectos en el nivel de inmunidad innata (pérdida de células $\gamma\delta$ T17 en el microentorno tumoral) que resultan en modulaciones de respuestas inmunes antitumorales afines (TIL de memoria efectora) con una relación de CD8⁺/Foxp3 (Fig. 20) y respuestas de Th1 atenuadas (Fig. 4).

Aunque muchos de los mecanismos moleculares detallados que gobiernan la compleja interacción entre las células epiteliales, la microbiota intestinal y la inmunidad intestinal aún no se han descifrado, el presente estudio revela el impacto insospechado de la microbiota intestinal en las respuestas inmunitarias anticancerosas provocadas por la quimioterapia. Los datos anteriores subrayan los nuevos riesgos asociados con la medicación antibiótica durante los tratamientos contra el cáncer, así como la potencial utilidad terapéutica de manipular la microbiota intestinal.

Ejemplo 2: La microbiota intestinal modula los efectos inmunes anticancerosos de la ciclofosfamida - Resultados en un modelo preclínico que imita la génesis tumoral humana

Un modelo de tumor transgénico de NSCLC autóctono impulsado por K-Ras oncogénico acoplado a una supresión condicional de P53 (como se describió inicialmente por T. Jacks, Cell 2012) se utilizó para probar el papel inhibitorio de la antibioterapia basada en vancomicina en la eficacia anticancerosa de una combinación de oxaliplatino más CTX. En este modelo preclínico que imita la génesis tumoral humana, se validó el concepto de que la erradicación de bacterias Gram-positivas por vancomicina comprometía la eficacia de la quimioterapia basada en CTX (Fig. 19A y Fig. 4D), que se correlaciona con una relación intratumoral reducida de células reguladoras efectoras CD8⁺T/Foxp3⁺ T (Fig. 19B).

Por lo tanto, las bacterias Gram-positivas parecen ser necesarias para la eficacia óptima de la respuesta inmune anticancerosa inducida por CTX y la reducción de la masa tumoral.

Ejemplo 3: Resultados en humanos: La ciclofosfamida induce las respuestas inmunitarias de TH1 y TH10 dirigidas contra bacterias comensales en pacientes con cáncer

Con el fin de demostrar que la CTX induce la translocación bacteriana a tejidos linfoides secundarios tanto en humanos como en ratones, los autores de la invención evaluaron las respuestas de células CD4⁺Th1 de memoria, en sangre periférica, específicas para una serie de bacterias en pacientes con cáncer avanzado antes y después del tratamiento con ciclofosfamida metronómica (CTX). Las respuestas que fueron monitoreadas incluyeron aquellas contra enterococos (*E. hirae* y *E. faecalis*, ambos inmunogénicos en ratones que reciben la CTX), lactobacilos (*L. johnsonii* y el menos relevante *L. plantarum*), así como contra *E. coli*. Los resultados se obtuvieron de 6 pacientes con cáncer de ovario metastático tratados con CTX + Avastin (Viaud y col., 2011), 3 pacientes de CPNCP (cáncer de pulmón no de células pequeñas) tratados con CTX antes de un ensayo de vacuna de fase II con exosoma basado en DC (Chaput y col., 2006), y 2 pacientes con melanoma inscritos en un ensayo de fase I de inmunoterapia dirigida precedida por CTX (Chaput y col., 2013). De estos 11 pacientes, 6 (54 %) desarrollaron respuestas Th1 de memoria contra enterococos 2 contra *L. johnsonii* (18 %), 2 (18 %) contra *E. coli*, mientras que uno (9 %) de ellos montó una respuesta inmune celular contra *L. plantarum* (Fig. 20). Curiosamente, algunos individuos provocaron una respuesta

inmune Th10 (es decir, liberación de IL-10 que a menudo se asocia con la progresión del tumor) contra *E. faecalis* (alta IL-10 y baja producción de IFN γ , como los pacientes 5 y 6).

En resumen, se observaron tres patrones de liberación de citoquinas en estas condiciones experimentales: (i) no hay liberación de citoquinas, es decir, no hay respuesta de memoria a comensales; (ii) respuesta de memoria de un fenotipo Th10; y (iii) respuesta de memoria de un fenotipo Th1.

Los autores de la invención anticipan que solo el patrón 3 se pronosticará para beneficiarse de la quimioterapia, y ahora correlacionan esta respuesta inmune bacteriana anti-comensal con el resultado clínico. Este ensayo farmacodinámico es útil para predecir, después de 3-6 semanas (1-2 ciclos de quimioterapia) si dicha quimioterapia basada en CTX desencadenaría una respuesta inmune adyuvante y un beneficio clínico.

Ejemplo 4: Resultados en humanos: La quimioterapia a base de oxaliplatino indica un cambio en la distribución de especies bacterianas en la microbiota intestinal y un aumento de la transcripción de T-bet por la microbiota intestinal

Durante una cirugía de reducción de volumen de un cáncer de colon primario o cáncer de páncreas o cáncer de estómago, es posible acceder al duodeno (para tumores estomacales y pancreáticos) o al íleon (para el cáncer de colon derecho). En dichos casos, las muestras de mucosa pueden rasarse y recogerse (para los análisis de pirosecuenciación del gen 16S rRNA y la descripción de la composición de la microbiota de la mucosa en los diferentes niveles taxonómicos descritos anteriormente), así como la mucosa que se puede mantener congelada (en RNazol para qRT-PCR) o en tejidos incrustados en parafina (para análisis de inmunohistoquímica).

Esta cirugía puede realizarse antes de la quimioterapia (quimioterapia adyuvante) o después de la quimioterapia (quimioterapia neoadyuvante).

En el presente ejemplo, se analizó la mucosa ileal de pacientes operados por un cáncer de colon derecho (6 pacientes en quimioterapia neoadyuvante con oxaliplatino y 7 pacientes antes de la terapia) para comparar la composición de la microbiota ileal y la pérdida o ganancia relativa de representatividad de distintos géneros y especies (aislados) en casos de quimioterapia adyuvante frente a neoadyuvante, es decir, en pacientes con cáncer de colon que ya recibieron («quimio») o no recibieron quimioterapia de («control»).

La distribución de bacterias en un nivel de especies (primeros aislamientos relativos) fue significativamente diferente en el íleon posterior a la quimioterapia (análisis de componentes principales, prueba de Monte Carlo, $p = 0,018$) (Fig. 21).

Al igual que en ratones, la quimioterapia indujo la disminución de especies pertenecientes al *Clostridium* grupo IV en casi todos los pacientes, más específicamente de bacterias de los géneros *Dorea*, *Coprococcus*, *Lachnospiraceae*, *Gemmiger*, *Alistipes*, y especies bacterianas *Faecalibacterium prausnitzii* (Fig. 22 y 23, Tabla 3). En cambio, las bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* tendieron a aumentar después de la quimioterapia (Tabla 3, Fig. 24).

Tabla 3: Especies bacterianas representadas diferencialmente (aislamientos) con $p < 0,1$ entre pacientes tratados con quimioterapia y no tratados

Especies bacterianas	AV Químio	AV Control	SD Químio	SD Control	valor p de prueba t	Clasificación_Género
Bacteroidescaccae_JCM9498_EU136886	3.828	0.135	4.619	0.190	0.056	Bacteroides
Flavonifractorplautii_17_GU968170	0.712	0.109	0.767	0.162	0.065	Flavonifractor
Bifidobacteriumlongum_IMAUFB091_XJ2813_JQ805709	0.530	0.029	0.653	0.076	0.067	Bifidobacterium
Bilophiawadsworthia_L35148	0.195	0.023	0.242	0.061	0.092	Bilófila
ClostridiumspAP4_JX101685	0.112	0.024	0.109	0.064	0.090	unclassified_Ruminococcaceae
unidentifiedbacterium_CCCM26_AY654952	0.097	0.015	0.115	0.026	0.088	Clostridiales_no_clasificado
ClostridiaceaeBacteriumFH042_A8298771	0.053	0.000	0.070	0.000	0.068	Anaerovorax
bacteriaNLAzIC328_JQ608041	0.027	0.000	0.038	0.000	0.079	Bacteroides
AlistipesspNML05A004_EU189022	0.000	0.023	0.000	0.024	0.028	Alistipes
Doreaformicigenans_SaLBHI10_JN093132	0.000	0.034	0.000	0.027	0.006	Dorea
Bacteroidesuniformis_JCM5828T_AB050110	0.009	0.090	0.024	0.104	0.068	Bacteroides
Clostridiumleptum_DSM753T_AJ305238	0.006	0.195	0.015	0.166	0.011	Clostridium
bacteriaqueproducebutiratoSR1_1_AY305321	0.115	0.318	0.207	0.215	0.097	Blautia
bacteriaClostridiaceaeDJF_LS13_EU728741	0.050	0.260	0.074	0.177	0.013	Dorea
Clostridiumruminantium_LA1_EU089964	0.043	0.294	0.077	0.325	0.070	Clostridium XI
bacteriaClostridialesoralitaxonF32_V0026_HM099644	0.005	0.306	0.012	0.445	0.098	Acetivibrio
unidentifiedeubacteriumcloneBSV28_AJ229190	0.068	0.440	0.126	0.521	0.091	bacterias_no_clasificadas
butyrateproducingbacteriumA2231_AJ270484	0.047	0.438	0.087	0.438	0.039	Coprococcus
BacteroidesspdlKV2_JF813174	0.278	0.893	0.262	0.589	0.027	Bacteroides
Gemmigerformicilis_ATCC27749_X256_GU562446	0.121	1.264	0.198	1.421	0.057	Gemmiger
Alistipesputredinis_JCM16772_AB554232	0.000	1.171	0.000	1.319	0.037	Alistipes
bacteriumIARPR184_KC153191	1.199	3.993	1.288	3.686	0.083	Uncl Lachnospiraceae
Faecalibacteriumprausnitzii_A2165_AJ270469	1.167	4.820	1.585	3.226	0.020	Faecalibacterium

Los autores de la invención también investigaron, en paralelo a los análisis de pirosecuenciación de 16SrRNA de microbiota intestinal de íleon, el perfil transcripcional de citoquinas y factores de transcripción detectables en las mucosas de pacientes que reciben o no quimioterapia. Esta investigación se realizó mediante qRT-PCR a partir de la mucosa ileal de los mismos pacientes. Mientras que ROR γ t e IL-17 no fueron muy diferentes en ambos grupos, T-bet se reguló al alza después de la quimioterapia y en dos pacientes que tenían niveles altos de Bifidobacterium y Lactobacilli después de la quimioterapia, las transcripciones de T-bet fueron bastante altas en comparación con los otros pacientes, lo que sugiere que una respuesta de células pTh17 T había sido provocada por el tratamiento.

Ejemplo 5: La *E. hirae* es una bacteria PTH17/TH1, sola o en conjunto con lactobacilos (*L. Johnsonii*) que induce efectos probióticos antitumorales

Para analizar el impacto de distintas especies bacterianas (específicamente aquellas capaces de translocación al bazo posterior a la CTX) en el cebado de las respuestas inmunitarias TH17 patógenas específicas para bacterias, los autores de la invención trataron ratones C57BL/6 con ATB de amplio espectro durante 15 días (que esterilizaron las heces), se realizó una inyección de CTX (100 mg / kg) seguida de sonda oral con 10^9 *E. hirae* \pm 10^9 *L. johnsonii*. Seis días después de la mono o biasociación de la bacteria, los esplenocitos se recolectaron para un análisis de citometría de flujo centrado en las células IFN γ + o CXCR3+ T entre las células TH17 (denominadas en lo sucesivo "pTH17") (Fig. 25A) que podrían surgir de células CD3+CD4+ROR γ t+ o CCR6+ T (denominadas en lo sucesivo "TH17") (Fig. 25B) y podrían dar lugar a células CD3+CD4+IFN γ + o CXCR3+ T genuinas (denominadas en lo sucesivo células TH1) (Fig. 25C). Los datos obtenidos revelaron que *E. hirae* pero no *L. johnsonii* fue la bacteria dominante que mediaba una respuesta TH1 y pTH17 en el bazo posterior a la CTX, que podría ampliarse aún más en presencia de *L. johnsonii* (Fig. 25A, 25C). Además, los autores de la invención ahora presentan evidencia de una relación causa-efecto entre la presencia de un cóctel de bacterias Gram-positivas (*L. johnsonii* + *E. hirae*) en el intestino delgado y, no solo la mera provocación de células pTH17 sistémicas (Fig. 25), sino también la restauración parcial de los efectos antitumorales inducidos por CTX en ratones tratados con ATB (Fig. 26).

Ejemplo 6: *E. hirae* mejoró la respuesta inmune anticancerosa in vivo

Para investigar si las respuestas análogas de TH dirigidas contra *E. hirae* podrían promover respuestas de células T anticancerosas, se establecieron dos modelos preclínicos distintos.

En primer lugar, se han implantado líneas celulares tumorales modificadas genéticamente para expresar el antígeno ovalbúmina (OVA) (el fibrosarcoma MCA205 OVA) sc. después de un tratamiento de 14 días con ATB de amplio espectro (o solución salina como control). Los animales han sido transferidos adoptivamente con células T transgénicas OTII TCR restringidas por MHC de clase II específico de OVA₃₂₃₋₃₃₉ y tratados con CTX (o solución salina). Los autores de la invención monitorearon el impacto "clínico" de la sonda oral con *E. hirae* sobre la expansión y activación de células CD45.1⁺ T singénicas y células CD45.2⁺ OTII congénicas en el bazo y en los lechos tumorales (entorno experimental presentado en la Fig. 27A). En el bazo, confirmaron la expansión inducida por *E. hirae* de los esplenocitos hospederos (CD45.1⁺) (Fig. 27B, panel izquierdo), debido al menos en parte a la proliferación de células CD4⁺ T (Fig. 27B, panel central) acompañado por la acumulación de células pTH17 (Fig. 27B, panel derecho). De hecho, demostraron la división, acumulación y diferenciación mediadas por *E. hirae* en células T de memoria de las células CD45.2 OTII transferidas de forma adoptiva en el bazo (Fig. 27C). Además, las células CD45.2⁺ T se recuperaron de los lechos tumorales, adquirieron moléculas de CD44 y proliferaron casi tan eficientemente como las TIL hospederas en el contexto de la alimentación oral con *E. hirae* (Fig. 27D-F).

En segundo lugar, para imitar un modelo de ratón clínicamente relevante, se estableció e informó modelos ortotópicos originales de cánceres de cabeza y cuello y pulmón utilizando las líneas celulares TC1 que expresan el virus del papiloma humano 16 (HPV16) E7 (F. Sandoval y col., 2013). La regresión del tumor podría obtenerse mediante la vacunación de ratones utilizando un sistema de administración no replicante compuesto por la subunidad B de la toxina Shiga acoplada al antígeno E7 (SBxT-E7) como un vector mucoso. Vingert y col. informó que solo la vacunación intranasal dirigida a DC CD103⁺ que reside en el LN torácico (y no en los macrófagos) podrían provocar células CD8⁺ T de enlace tetramérico polifuncional D^b -E739-47 que expresan integrinas de la mucosa (CD49a y CD103) (B. Vingert y col., 2006). El entorno experimental de este experimento se presenta en la Fig. 28A. En un modelo TC1 sc., el crecimiento del tumor podría reducirse significativamente mediante la combinación de SBxT-E7 y CTX, lo que finalmente conduciría a la erradicación completa del tumor (Fig. 28B-C). El impacto negativo del ATB de amplio espectro en la eficacia de la vacuna se muestra en la Fig. 28B-C, donde los porcentajes de animales que rechazan completamente sus tumores TC1 se redujeron considerablemente. A continuación, se monitorizó el impacto "clínico" de la sonda oral con *E. hirae* en la expansión de células CD8⁺ T de enlace tetramérico polifuncional D^b -E739-47 en los bazos. En efecto, *E. hirae* restauró la expansión de células CD8⁺ T de enlace tetramérico polifuncional D^b -E739-47 en ratones que habían rechazado sus tumores (pero no en los otros), como se muestra en los controles positivos no tratados con ATB / CTX (Fig. 28D).

En conjunto, la monoasociación de ratones esterilizados intestinalmente con *E. hirae* podría restaurar parcialmente las respuestas inmunitarias anticancerosas inducidas por CTX, controlando la progresión del tumor.

Ejemplo 7: Comparaciones entre varios clones de *E. hirae* (para PTH17, para efectos anti-apoptóticos de Caco-2)

Hasta otros 13 aislados / clones de *E. hirae* se probaron para analizar su inmunogenicidad diferencial *in vivo* y su capacidad para mediar dicha propiedad de "un probiótico anticanceroso". La alineación de los patrones genómicos bacterianos de varios clones de *E. hirae* analizados en electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Fig. 29) reveló que el clon inicialmente aislado por los autores de la invención (clon "Villejuif", que se depositó el 7 de noviembre de 2013 en la *Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, París* (CNCM), con el número I -4815) difiere de muchos otros en términos de secuencias genómicas. Un aislado humano (clon 708) exhibió un mayor potencial de TH1 y Tc1 que el clon CNCM I -4815 (Fig. 30). Sin embargo, el clon 708 no tuvo un mejor desempeño que el clon CNCM I -4815 para el efecto probiótico anticanceroso en los sarcomas MCA205 establecidos tratados con CTX (no se muestra). Las diferencias secuenciales y funcionales entre varios aislados de *E. hirae* fueron corroboradas en un ensayo *in vitro* destinado a controlar la liberación de LDH (con muerte celular) y la secreción de defensina $\beta 2$ humana de la línea celular intestinal epitelial Caco-2 expuesta a varios clones CTX +/- de *E. hirae* o *E. coli*. Mientras que el clon CNCM I -4815 y el clon 708 podrían prevenir la muerte celular de Caco-2 inducida por CTX, lo más probable es que promuevan la producción de defensina del péptido antimicrobiano $\beta 2$. *E. coli* no lo consiguió (no se muestra).

Ejemplo 8: TLR4, NOD1 y NOD2 evitan la translocación bacteriana mediada por CTX, la estimulación de PTH17 y la actividad tumorigénica.

Para analizar qué puntos de control inmunológicos intestinales podrían controlar la translocación bacteriana durante una terapia con agentes alquilantes, los autores de la invención investigaron el papel de los principales receptores de reconocimiento de patrones que regulan la homeostasis intestinal en la estimulación de células pTH17 esplénicas y en el control de tumores promovidos por CTX en ratones C57BL/6 con MCA205.

Se mejoró la translocación bacteriana analizada mediante el cultivo de colonias bacterianas de bazo en condiciones anaeróbicas, conocidas principalmente por permitir la proliferación de *E. hirae* y *L. johnsonii* (Viaud y col., Science Nov. 2013), en NOD1xNOD2^{-/-} (Fig. 31A). Además, el cebado de las células pTH17 esplénicas después de la administración de CTX se incrementó en ratones NOD2^{-/-} (mientras que se suprimió en animales Myd88^{-/-} en comparación con ratones de tipo salvaje (WT), Viaud y col. Science 2013) (Fig. 31B). Según estos hallazgos obtenidos usando animales con deficiencia génica, los autores de la invención fenocopiaron estos efectos usando farmacomiméticos, es decir, ligandos para NOD1 y NOD2, los peptidoglicanos muramil dipéptido y TriDAP, que actuaron localmente promoviendo la liberación del péptido antimicrobiano lipocalina-2 en heces (Fig. 31D), reduciendo así la pTH17 mediada por CTX en el bazo (Fig. 31C).

Estos resultados se corroboraron en otro sistema experimental donde los ratones tratados con ATB de amplio espectro se reconstituyeron por sonda oral de *E. hirae* y se trataron con CTX antes de un monitoreo cinético de la translocación bacteriana en LN mesentérico. En este contexto, se demostró que las frecuencias de colonias de *E. hirae* se recuperaron después de CTX en mLN y la incidencia de crecimiento en condiciones anaeróbicas se incrementó en ratones KR TLR4, NOD1 y NOD2 (no se muestra). Por consiguiente, la estimulación de células pTH17 inducidas por CTX después de una sonda oral con bacterias Gram⁺ en receptores tratados con ATB se redujo considerablemente en presencia de un agonista de TLR4 (LPS o *E. coli*) (Fig. 32B) mientras que las células TH1 y Tc1 inducidas por CTX no se vieron afectadas (Fig. 32A).

Los efectos anti-sarcoma inmunodependientes mediados por CTX no mejoraron en ratones knock out únicos (NOD1 o NOD2 o RIP2 o CARD15) en comparación con sus contrapartes WT (Fig. 33A-C), pero aumentaron significativamente en ratones NOD1^{-/-}xNOD2^{-/-} (Fig. 33 D-E). Por otra parte, la provisión de *E. coli* o LPS exógenos a la sonda oral con *E. hirae* + *L. johnsonii* en ratones tratados con ATB comprometió severamente los efectos probióticos anticancerosos de la bacteria Gram⁺ (Fig. 34A-B), lo que apoya la idea de que la señalización de TLR4 previene la translocación y, por lo tanto, la acumulación de pTH17 y los efectos antitumorales subsiguientes.

Ejemplo 9: Disbiosis beneficiosa en ratones NOD1^{-/-}xNOD2^{-/-} asociada con el aumento de la actividad tumoral de la CTX

Se realizaron análisis de pirosecuenciación de los amplicones del gen 16S rRNA tanto de las biopelículas del intestino delgado como de las heces recolectadas de ratones WT frente a ratones sin tratamiento previo NOD1^{-/-}xNOD2^{-/-} siete días después de la administración de CTX o PBS. El análisis de coordenadas del principio reveló que las estructuras de la comunidad bacteriana eran significativamente diferentes entre los grupos CTX de WT en

- Apetoh, L. y col. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, 13, 1050-1059.
- Arrntzen EH, (2008), *Cancer Immunol Immunother* 57 (10): 1559
- 5 Bottger, E.C. (1989) Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 53, 171-176.
- Caporaso, J.G. Y col. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7, 335-336.
- Chaput, N. y col. (2013) Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2: HLA-DR NK cell levels correlate with disease outcome. *Oncoimmunology*, 2, e23080.
- 10 Chaput, N. y col. (2006) Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol*, 80, 471-478.
- Caux C y col. (1996), *J Exp Med*, 184 (2): 695.
- Cole, J.R., y col. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 37, D141-145.
- 15 Cong, Y. y col. (2009) A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 19256-19261.
- Cortez-Retamozo, V. y col. (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 2491-2496.
- 20 Cortez-Retamozo, V. y col. (2013). Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity*, 38, 296-308.
- Darfeuille-Michaud, A. y col. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127, 412-421.
- Demidenko, E. (2006) The assessment of tumour response to treatment. *Journal of the royal statistical society series C-applied statistics*, 55, 365.
- 25 Dzutsev A, y col. (2014) The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *Eur J Immunol*. 2014 Oct 18. doi: 10.1002/eji.201444972. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25328099.
- Furet, J.P. Y col. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol*, 68, 351-362.
- 30 Furet, J.P., y col. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 59, 3049-3057.
- Geuking, M.B., y col. (2011) Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 34, 794-806.
- Ghiringhelli, F., y col. (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34, 336-344.
- 35 Ghoreschi, K. y col. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*, 467, 967-971.
- Grivennikov, S.I. y col. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491, 254-258.
- 40 Heinze, G. (2006) A comparative investigation of methods for logistic regression with separated or nearly separated data. *Stat Med*, 25, 4216-4226.
- Helsel, D.R. (2005) *Nondestructive and Data Analysis; Statistics for censored environmental data..* John Wiley and Sons, USA, NJ.
- Hooper, L.V. y col. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268-1273.
- 45 Hugenholtz, P., y col. (2001) Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol*, 67, 411-419.
- Joossens, M., y col. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60, 631-637.
- Kroemer, G., y col. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*, 31, 51-72.
- 50 Kverka, M., y col. (2011) Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin Exp Immunol*, 163, 250-259.
- Lathrop, S.K., y col. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478, 250-254.
- Lee, Y., y col. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*, 13, 991-999.
- 55 Lee, Y.K., y col. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 Suppl 1, 4615-4622.
- Lepage, P., y col. (2005). Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 11, 473-480.
- Lesterhuis WJ, (2008) *Crit Rev Oncol Hematol*, 66, 118
- 60 Ley, R.E., y col. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 11070-11075.
- Li, W. y Godzik, A. (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22, 1658-1659.

- Ma, Y., y col. (2011). Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med*, 208, 491-503.
- Manichanh, C., y col. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55, 205-211.
- 5 Mayeur, C., y col. (2013). Faecal D/L lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in patients with short bowel syndrome. *PLoS One*, 8, e54335.
- Michaud, M., y col. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334, 1573-1577.
- Newton, E. y Rudel, R. (2007) Estimating correlation with multiply censored data arising from the adjustment of singly censored data. *Environ Sci Technol*, 41, 221-228.
- 10 Palucka K, (2013) *Curr Opin Immunol* 25 (3): 396
- Rice, L.B. (2006) Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infect Control*, 34, S11-19; discussion S64-73.
- Romesburg, H.C. (1985) Exploring, confirming and randomization tests. *Computers and Geosciences*, 11, 19.
- 15 Sallusto F, (1994) *J Exp Med* 179: 1109.
- Sandoval F. y col. (2013), Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8(+) T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Science translational medicine* 5, 172ra20.
- Schlitzer, A., y col. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*, 38, 970-983.
- 20 Seksik, P., y col. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52, 237-242.
- Sobhani, I., y col. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*, 6, e16393.
- Sokol, H., y col. (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 12, 106-111.
- 25 Sugar, E., y col. (2012). Reporting of preclinical tumor-graft cancer therapeutic studies. *Cancer Biol Ther*, 13, 1262-1268.
- Turnbaugh, P.J., y col. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
- Ubeda, C., y col. (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*, 120, 4332-4341.
- 30 Vanlint S, (2014) *Cancer Immunol Immunother*, 63 (9): 959.
- van Vliet, M.J., y col. (2010). The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*, 6, e1000879.
- Viaud, S., y col. (2011). Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res*. 71(3), 661-665.
- 35 Viaud, S. y col. (2013), The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342(6161): 971-6.
- Viaud S, y col. (2014). Harnessing the intestinal microbiome for optimal therapeutic immunomodulation. *Cancer Res*. 2014 Agosto 15;74(16):4217-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0987. Epub 2014 Jul 29. PubMed PMID: 25074615.
- 40 Viaud S, y col. (2014). Gut microbiome and anticancer immune response: really hot Sh*t! *Cell Death Differ*. 2014 mayo 16. doi: 10.1038/cdd.2014.56. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 24832470.
- Viaud S, y col. (2014). Why should we need the gut microbiota to respond to cancer therapies? *Oncoimmunology*. 1 de enero de 2014;3(1):e27574. Epub 17 de enero de 2014. PubMed PMID: 24800167; PubMed Central PMCID: PMC4006853.
- 45 Vingert B. y col. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *European journal of immunology* 36, 1124.
- Wu, H.J., y col. (2010). Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 32, 815-827.
- Wu, N., y col. (2013). Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol*, 66, 462-470.
- 50 Wu, S., y col. (2009) A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*, 15, 1016-1022.
- Yang, J., y col. (2013). The changes induced by cyclophosphamide in intestinal barrier and microflora in mice. *Eur J Pharmacol*, 714, 120-124.
- Yin, Y., y col. (2013). Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice and chickens. *Isme J*, 7, 615-621.
- 55 Zhang Y y col. (2014) *Toxicology and Applied Pharmacology* 277: 138-145.
- Zitvogel, L., y col. (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, 8, 59-73.
- Zwiehlhner, J., y col. (2011). Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One*, 6, e28654.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO GUSTAVE ROUSSY ZITVOGEL, Laurence GOMPERTS BONECA, Ivo LEPAGE, Patricia VIAUD,
5 Sophie DAILLERE, Romain

<120> COMPOSICIÓN DE MICROBIOTA, COMO MARCADOR DE SENSIBILIDAD A LA QUIMIOTERAPIA, Y USO
DE MODULADORES MICROBIANOS (PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS O SIMBIÓTICOS) PARA MEJORAR LA
EFICACIA DE UN TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

10

<130> VMA11-F1534/17PCT

<150> EP 13306597.9

<151> 21/11/2013

15

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador

<400> 1

agagtttgat catggctcag 20

30

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador

<400> 2

40 aaggaggtga tccaaccgca 20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

50

<400> 3

ctcctacggg aggcagcagt 20

<210> 4

<211> 18

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

60

<400> 4

gcatgtggtt taattcga 18

<210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 5
 tacggraggc agcag 15

 <210> 6
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 6
 ggactaccag ggtatctaa 19

 <210> 7
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador

 <400> 7
 atggagggga atacagccc 19

 35 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador

 <400> 8
 ttctttgcag ctccttcgtt 20
 45
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9
 55 ccaggatact gagggcatgt 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> Cebador
 <400> 10
 5 cttatcagtt ggcgtttggg 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 15 cctgtgcaag aagcagagtg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 12
 gttctgctga ttccccttcc 20
 <210> 13
 <211> 16
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 13
 ggccgatgac gagccc 16
 <210> 14
 40 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador
 <400> 14
 tgtctttgga actttgtctg caa 23
 50 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 60 cagcaccacc tctacgaaca 20
 <210> 16
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 16
 cgccaccaa ctgagatgat 20

 10 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 17
 ctcgtctgaa ggcagagtca 20
 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18
 30 tggcagagag gtattgaggg 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 40 <400> 19
 aggatgtccc tgctctcctt 20

 <210> 20
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 20
 gcctgctggac tctaccataa 20

 <210> 21
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Cebador

 <400> 21

tgagctcatt gaatgcttgg 20

<210> 22
<211> 20

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 22
acagcaaggc gaaaaaggat 20

<210> 23
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Cebador

<400> 23
tgtcaaattc attcatggcc t 21

25 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 24
atcgatttct cccctgtgaa 20

35 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 25
45 tgagcttccc agatcacaga 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

55 <400> 26
tccagaaggc cctcagacta 20

<210> 27
<211> 20
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 27
 5 ggtgataacc ccgtagtgga 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 28
 ctgcaaagaa gacccacacc 20

<210> 29
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 29
 atcctgtaat ggcttggtggg 20

<210> 30
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Cebador

<400> 30
 tcaaccagca ccagacagag 20

40 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 31
 50 caaccaggt ccttctaaa 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador

<400> 32
 60 ggagagccct ggataccaac 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii* y mezclas de las mismas, para su uso como adyuvante de un
5 tratamiento antineoplásico administrado a un paciente con cáncer.
2. La composición según la reivindicación 1, para el uso según la reivindicación 1, donde dicha composición comprende además bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella*, *Holdemania* y mezclas de las mismas.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, para el uso según la reivindicación 1, donde dicha composición comprende *Enterococcus hirae* y al menos una cepa seleccionada de entre el grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Barnesiella* y *Holdemania*.
- 15 4. La composición según la reivindicación 3, para el uso según la reivindicación 1, donde dicha composición comprende además la cepa de *Lactobacillus johnsonii*.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para el uso según la reivindicación 1, donde dicha cepa *Enterococcus hirae* es la cepa depositada el 7 de noviembre de 2013 en la Colección Nacional de
20 Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el número I -4815.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso según la reivindicación 1, donde dicha composición probiótica se formula para administración oral.
- 25 7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso según la reivindicación 1, donde dicha composición probiótica se administra a un paciente que la necesita después de la administración del tratamiento antineoplásico.
8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso según la reivindicación 1 o
30 7, donde dicho tratamiento antineoplásico es un tratamiento con un agente quimioterapéutico.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso según la reivindicación 1 o 7, donde dicho tratamiento antineoplásico es una vacuna anticancerosa con un agente quimioterapéutico como adyuvante de la vacuna.
- 35 10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso según la reivindicación 7 u 8, donde dicho agente quimioterapéutico es ciclofosfamida (CTX).
11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso según cualquiera de las
40 reivindicaciones 1 y 7 a 10, donde dicho paciente tiene una disbiosis con una representación insuficiente de especies presentes en dicha composición probiótica.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 11, donde dicha composición probiótica se administra a un paciente que la necesita después
45 de la administración de un tratamiento con antibióticos de amplio espectro.
13. Una composición inmunogénica que comprende fragmentos de bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii* y mezclas de las mismas, para su uso como adyuvante de un tratamiento antineoplásico administrado a un paciente con cáncer.
- 50 14. La composición inmunogénica según la reivindicación 13, para el uso según la reivindicación 13, donde dicha composición comprende además fragmentos de bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Porphyromonas*, *Barnesiella*, *Holdemania* y mezclas de las mismas.
- 55 15. La composición inmunogénica según la reivindicación 13 o 14, para el uso según la reivindicación 13, donde dicha composición comprende fragmentos de *Enterococcus hirae* y fragmentos de al menos una cepa seleccionada de entre el grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Barnesiella* y *Holdemania*.
16. La composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para el uso según la
60 reivindicación 13, donde dicha cepa de *Enterococcus hirae* es la cepa depositada el 7 de noviembre de 2013 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el número I -4815.

17. La composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, para el uso según la reivindicación 13, donde dicha composición se formula para administración subcutánea o intramuscular.

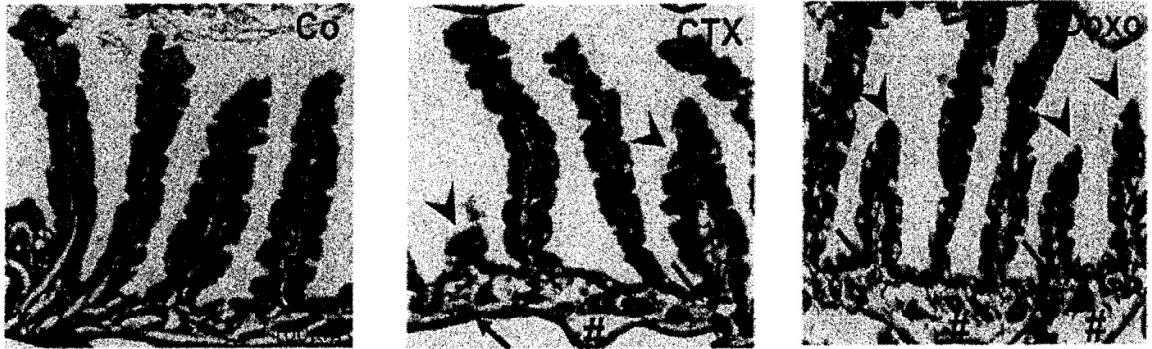


FIGURA 1A

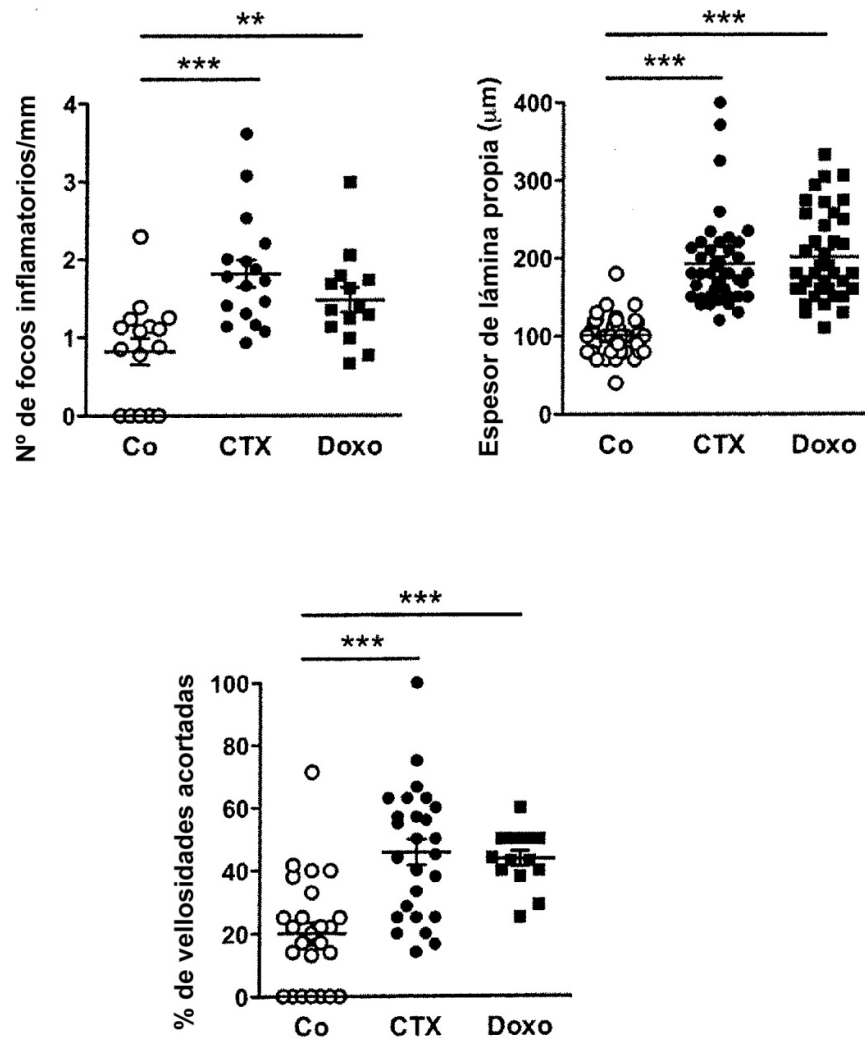


FIGURA 1B

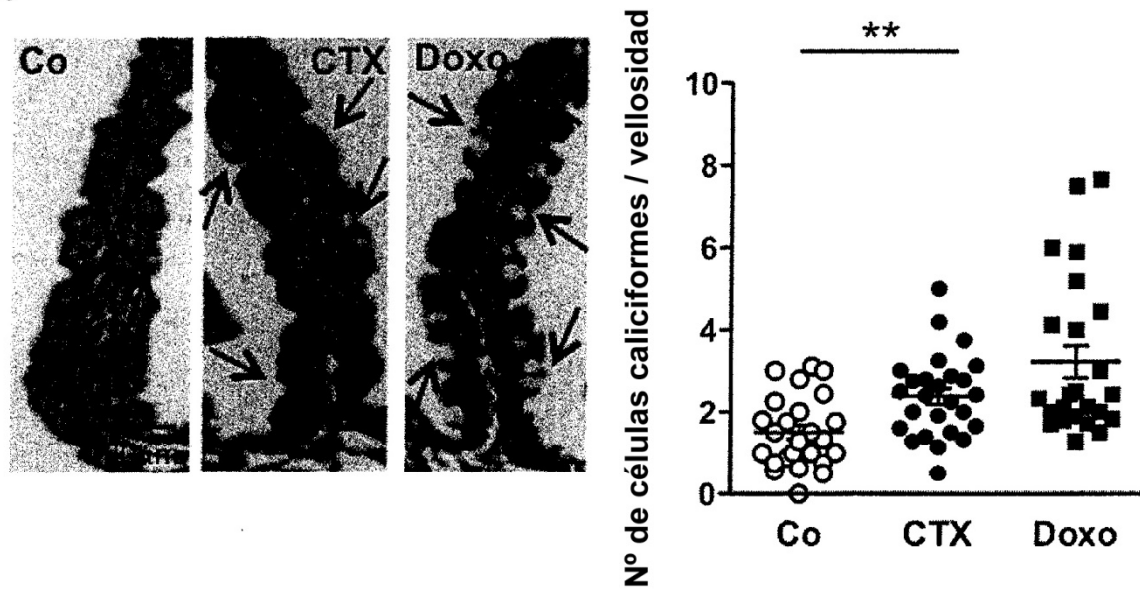


FIGURA 1C

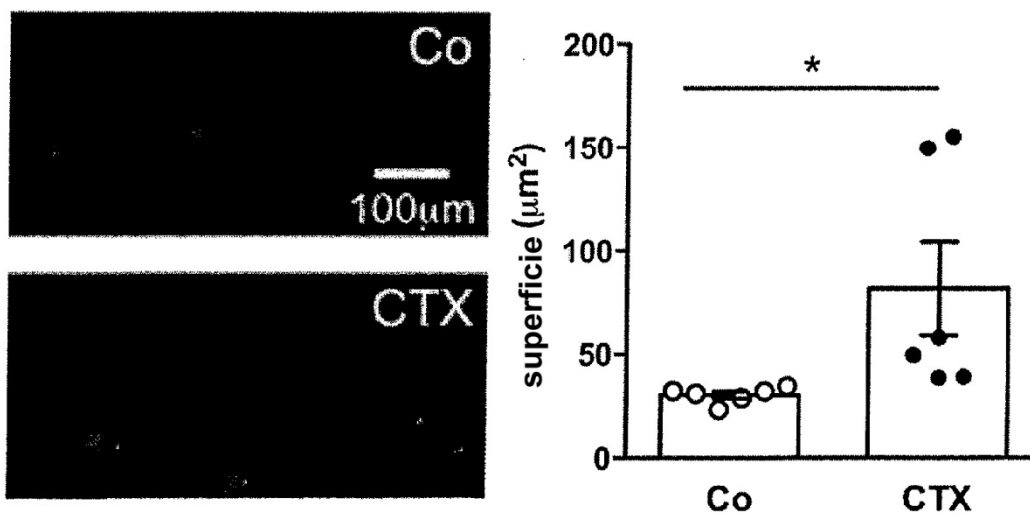


FIGURA 1D

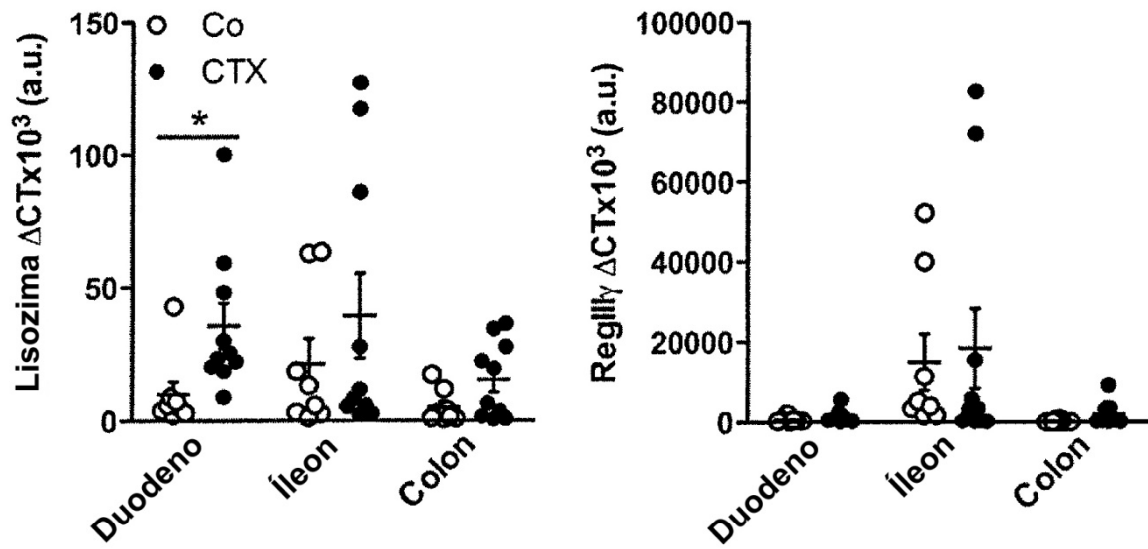


FIGURA 1E

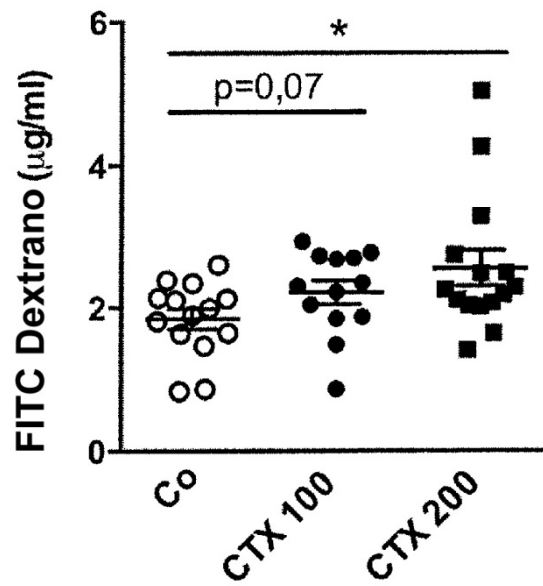


FIGURA 1F

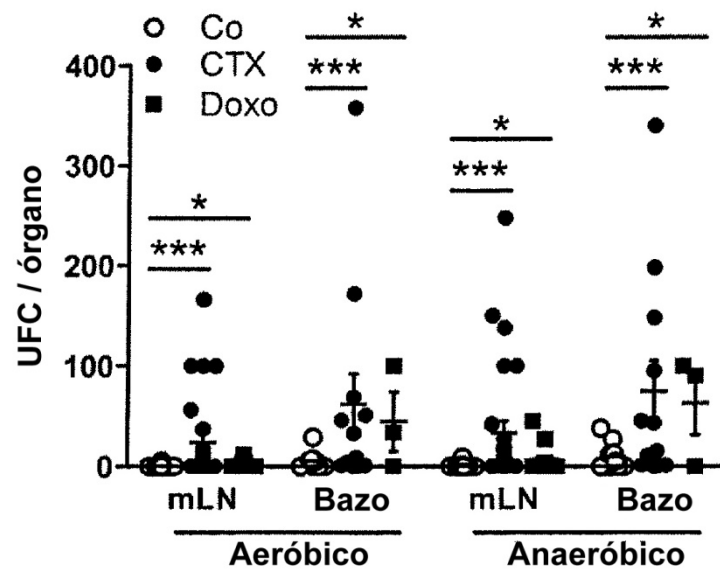
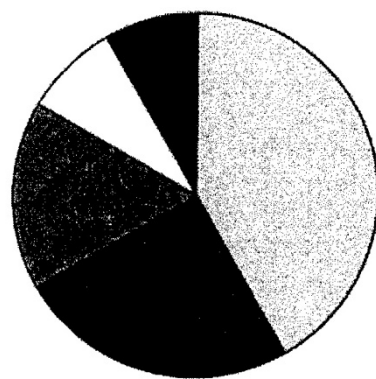


FIGURA 2A



- *L. johnsonii*
- *L. murinus*
- *E. hirae*
- *L. intestinalis*
- *L. reuteri*

FIGURA 2B

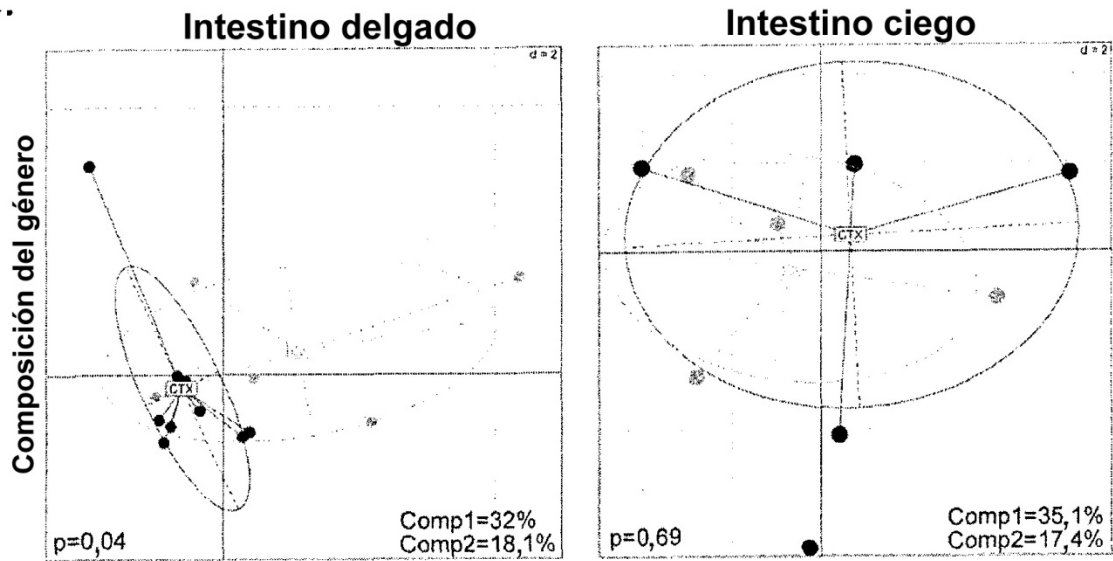


FIGURA 2C

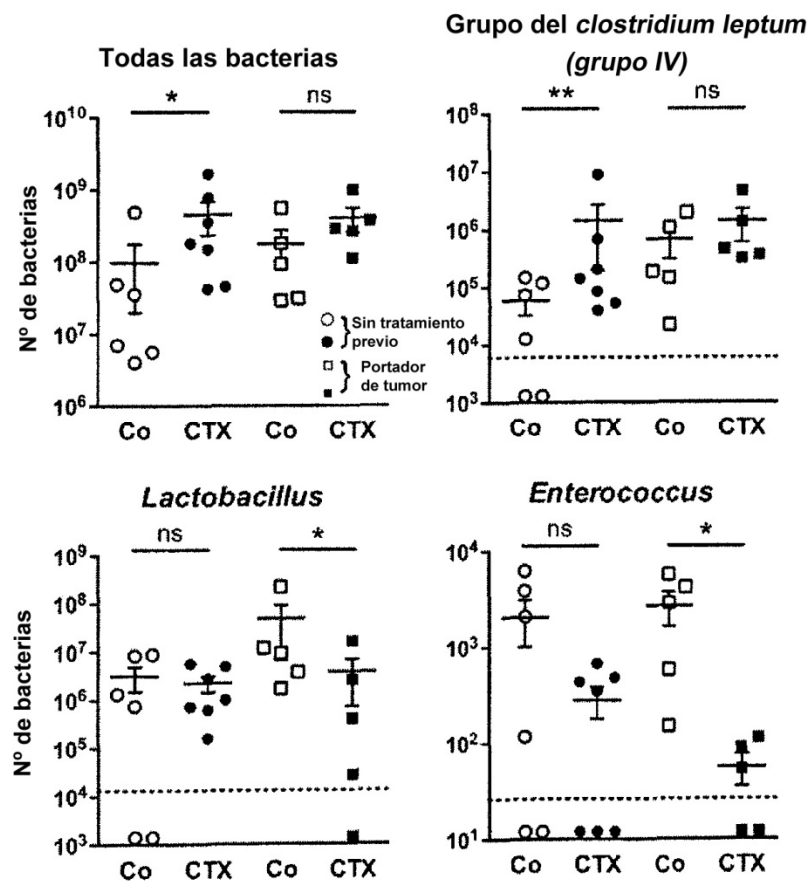


FIGURA 2D

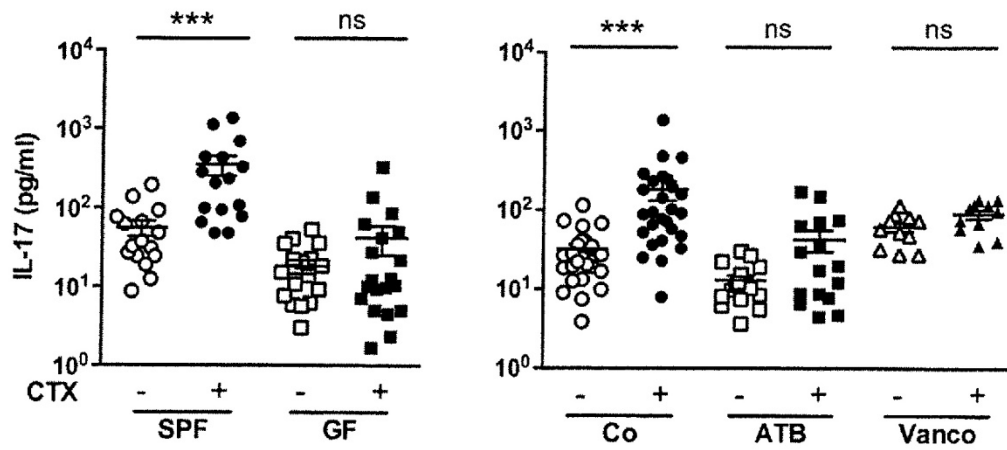


FIGURA 3A

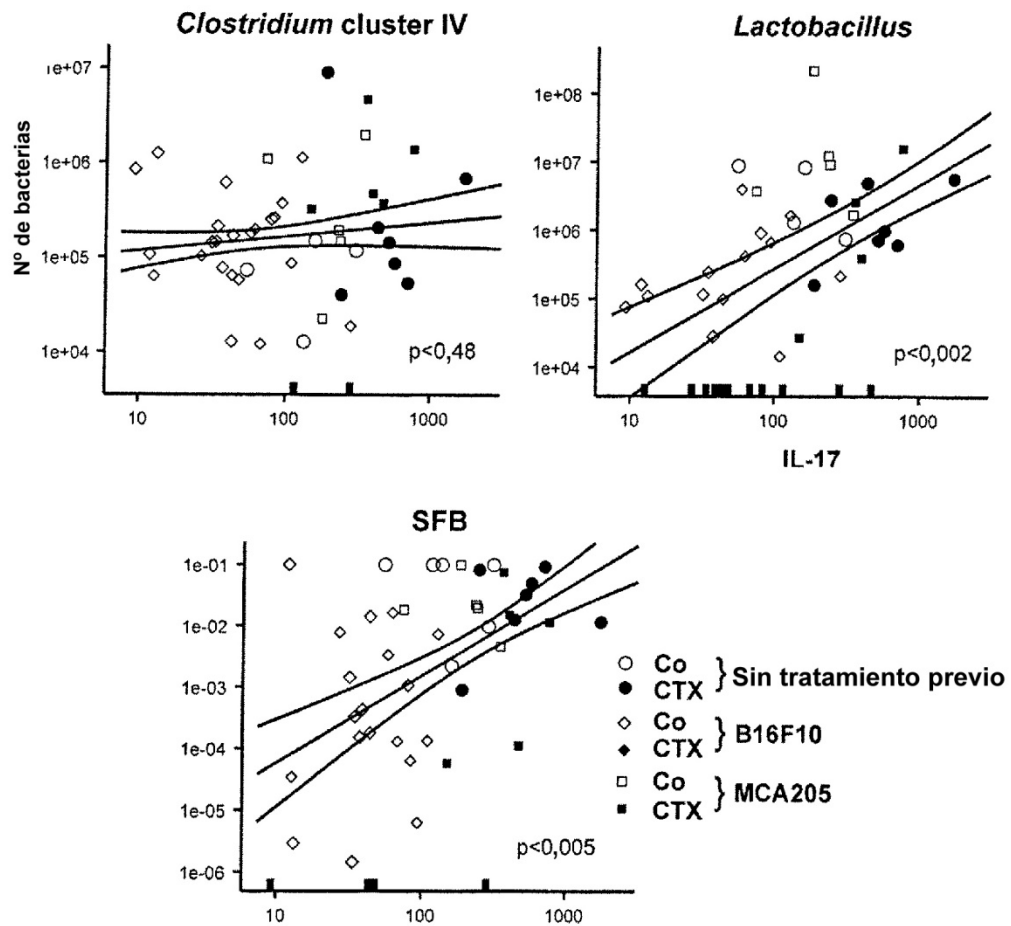


FIGURA 3B

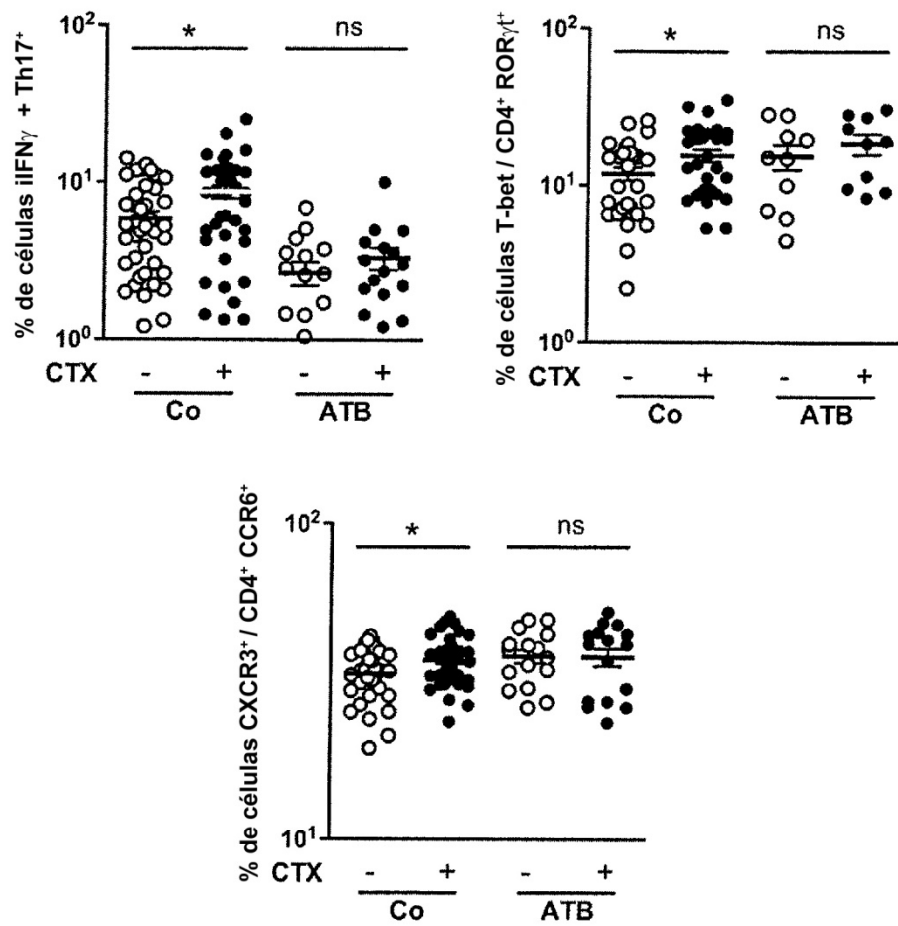


FIGURA 3C

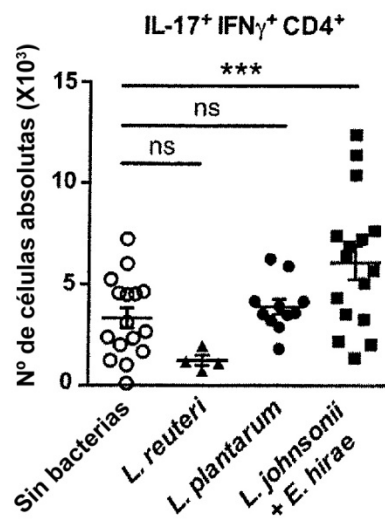


FIGURA 3D

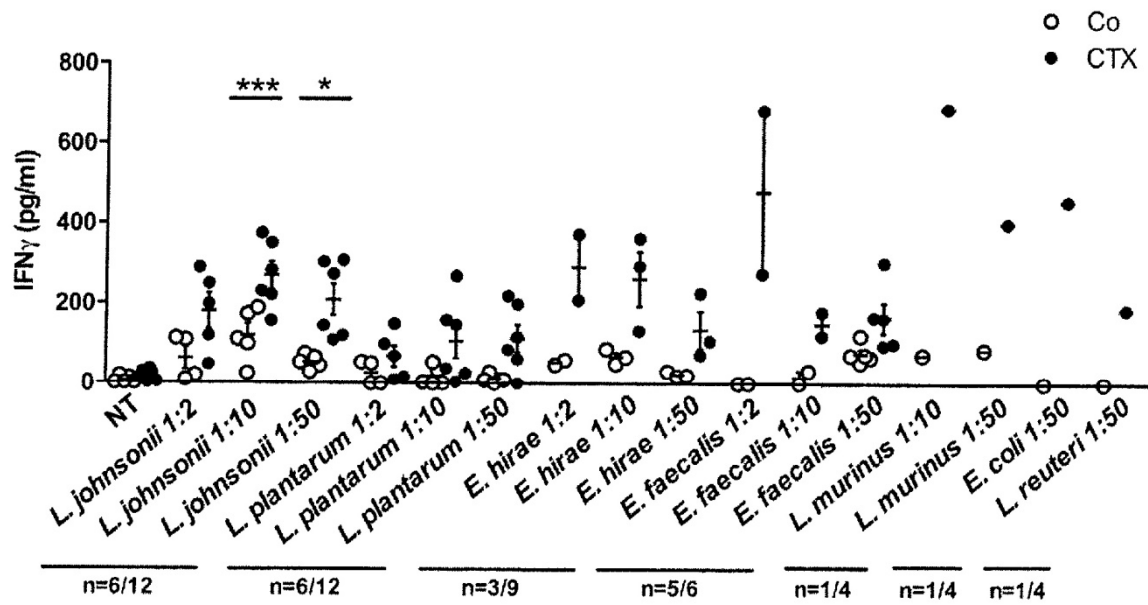


FIGURA 3E

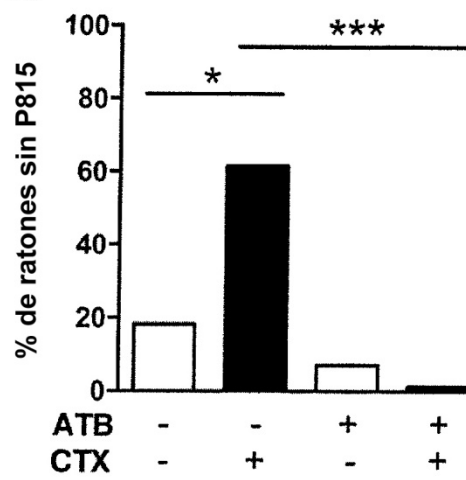


FIGURA 4A

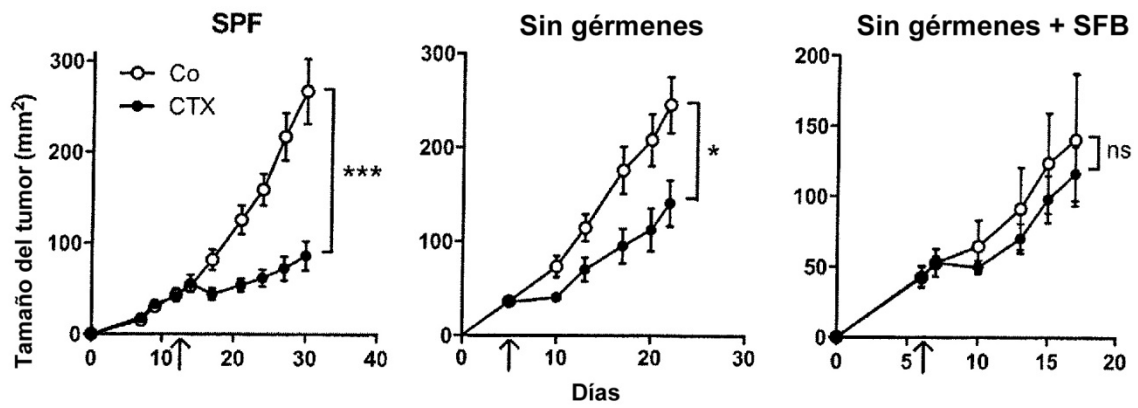


FIGURA 4B

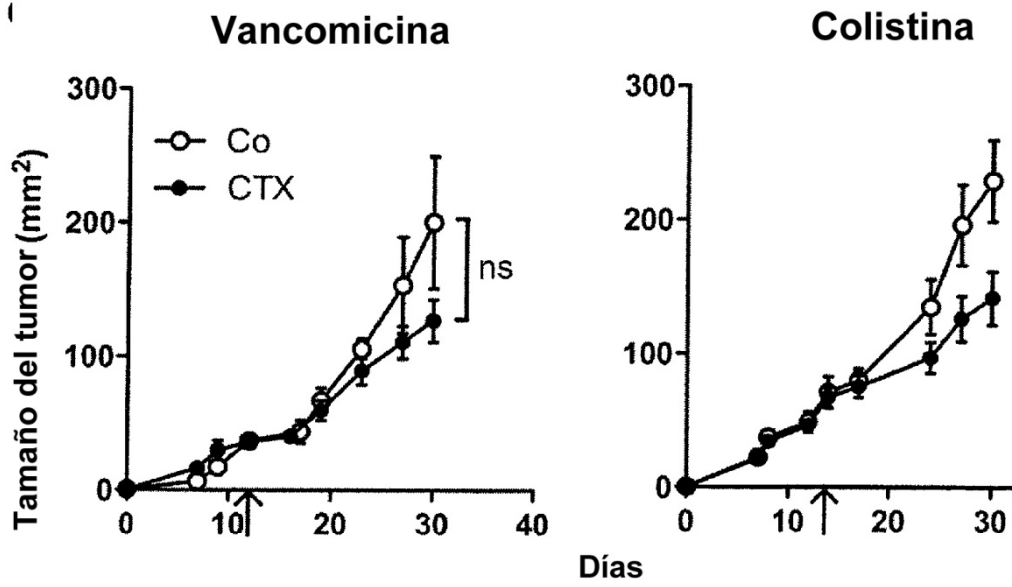


FIGURA 4C

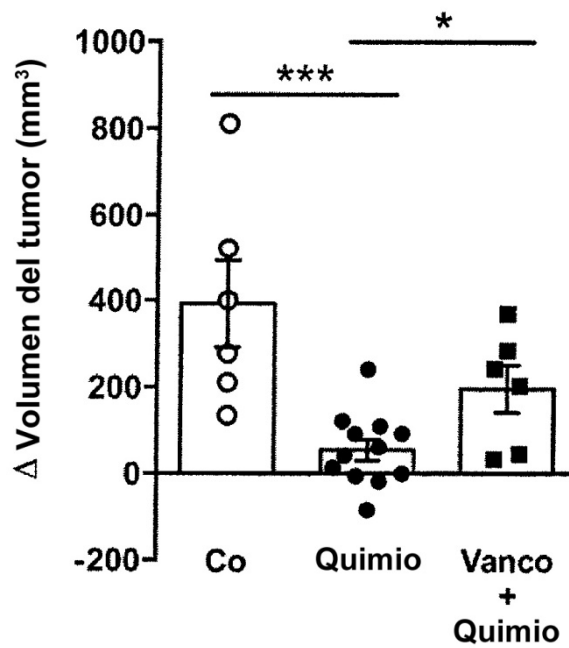


FIGURA 4D

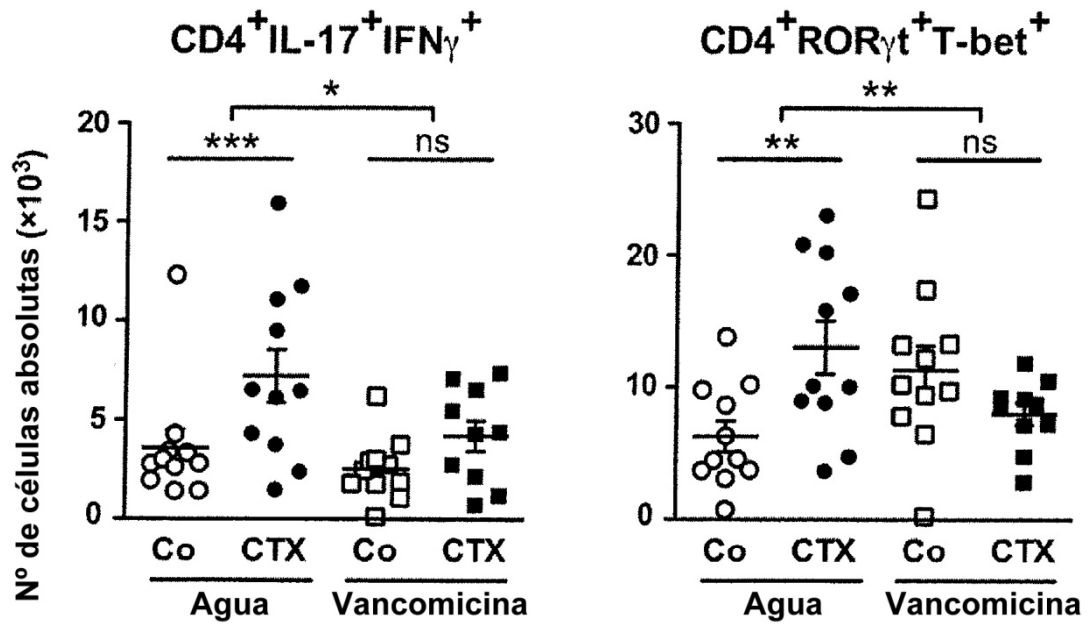


FIGURA 4E

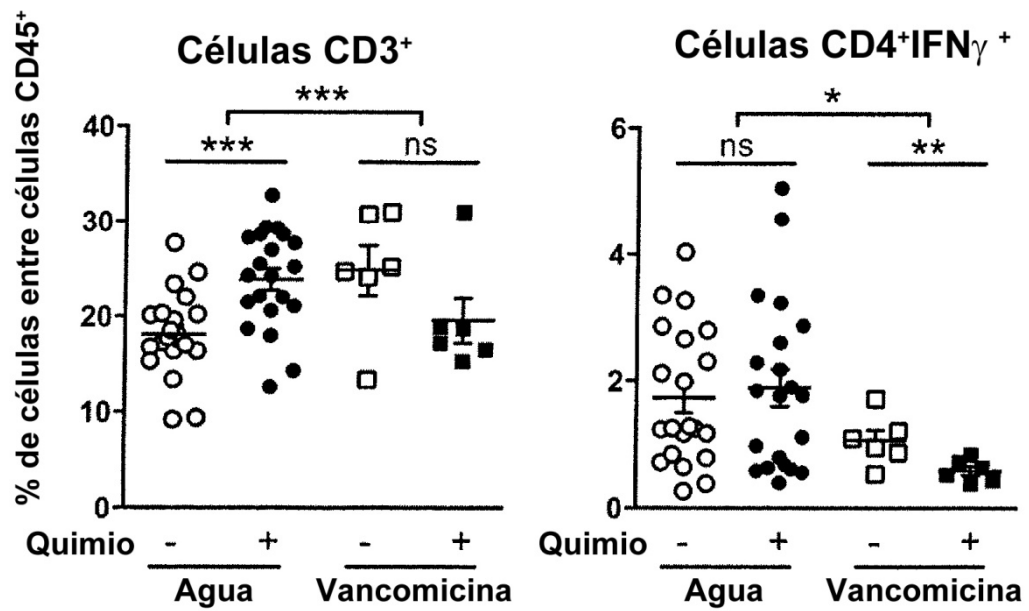


FIGURA 4F

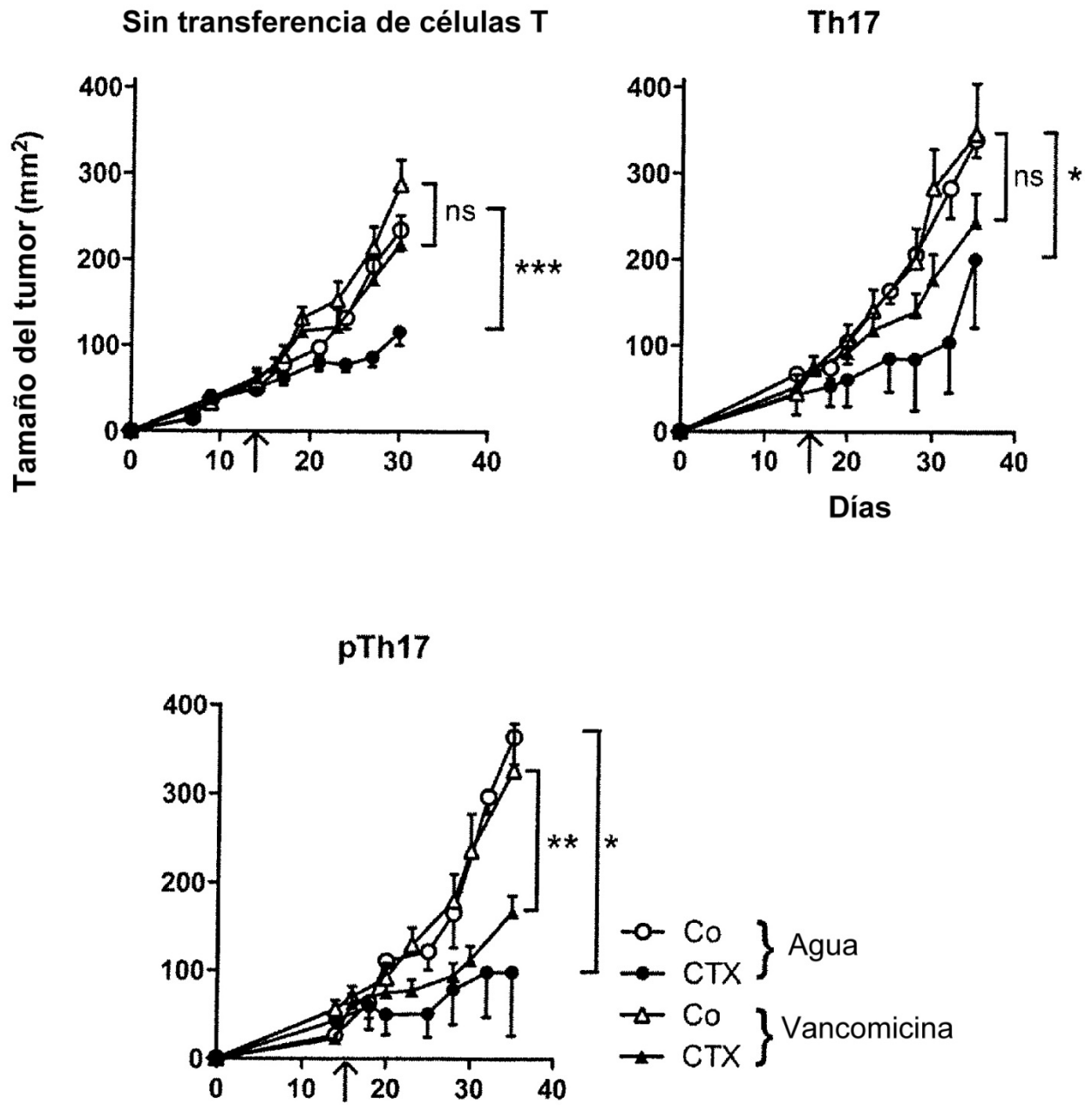


FIGURA 4G

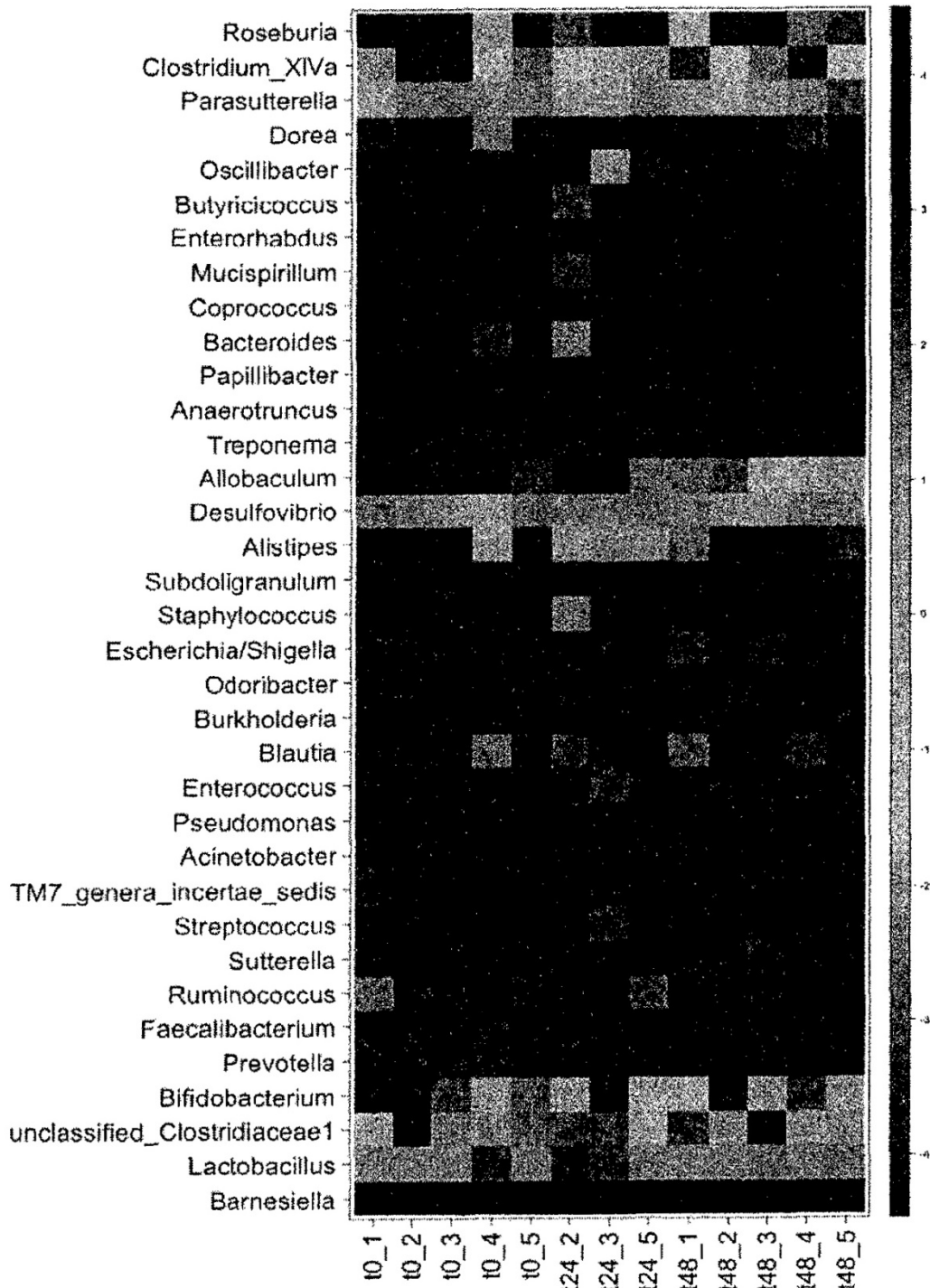


FIGURA 5A

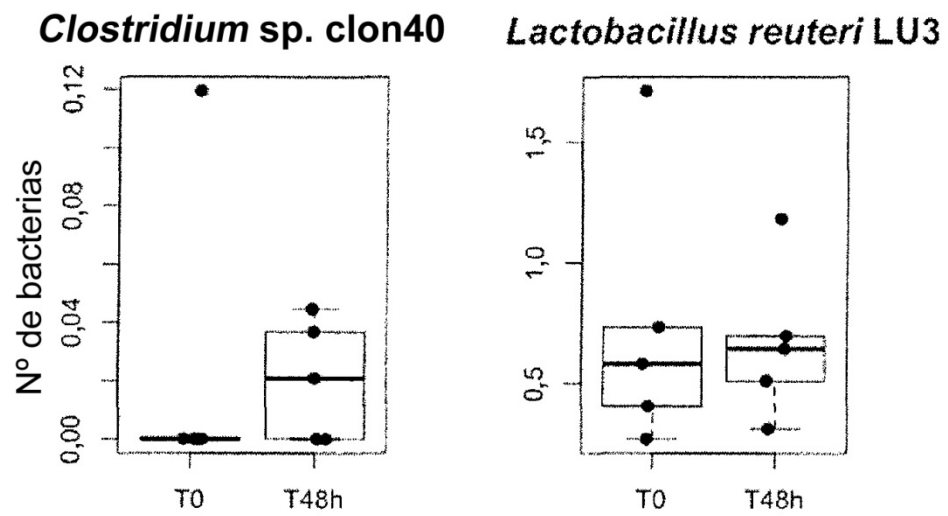


FIGURA 5B

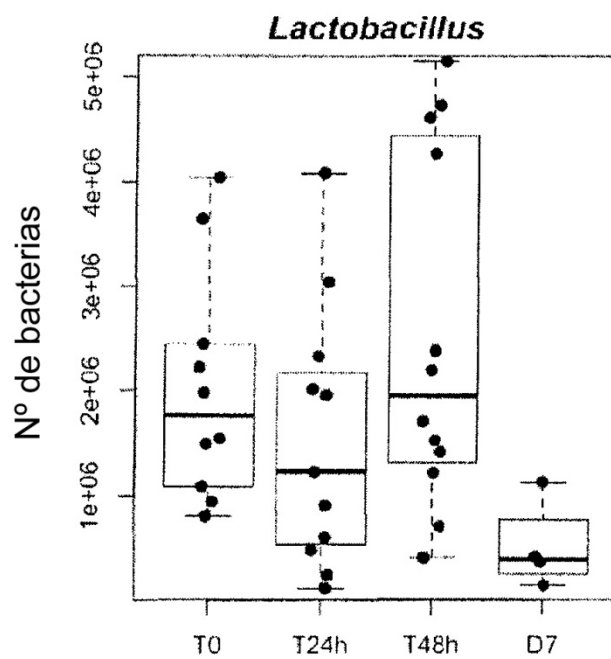


FIGURA 5C

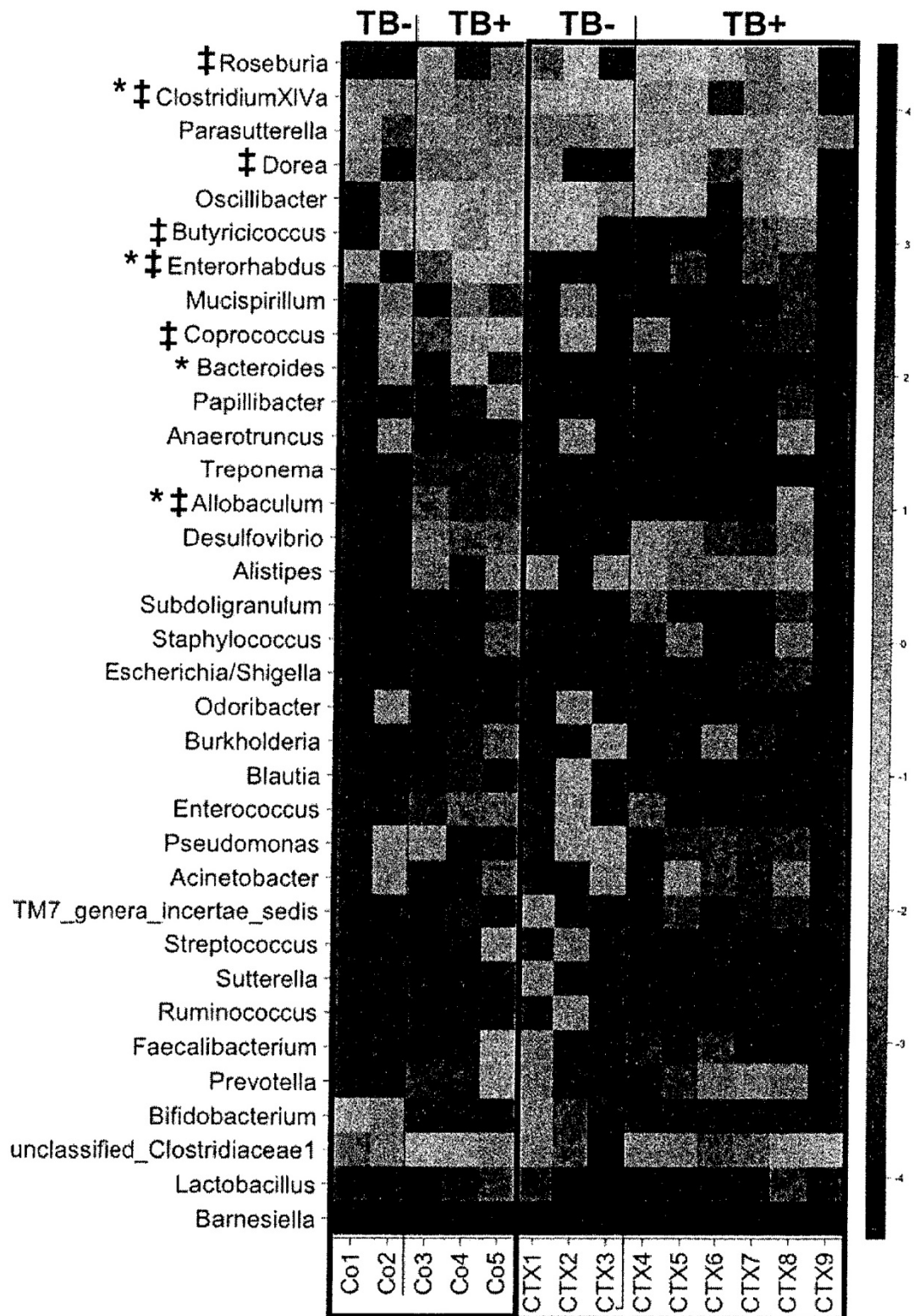


FIGURA 6

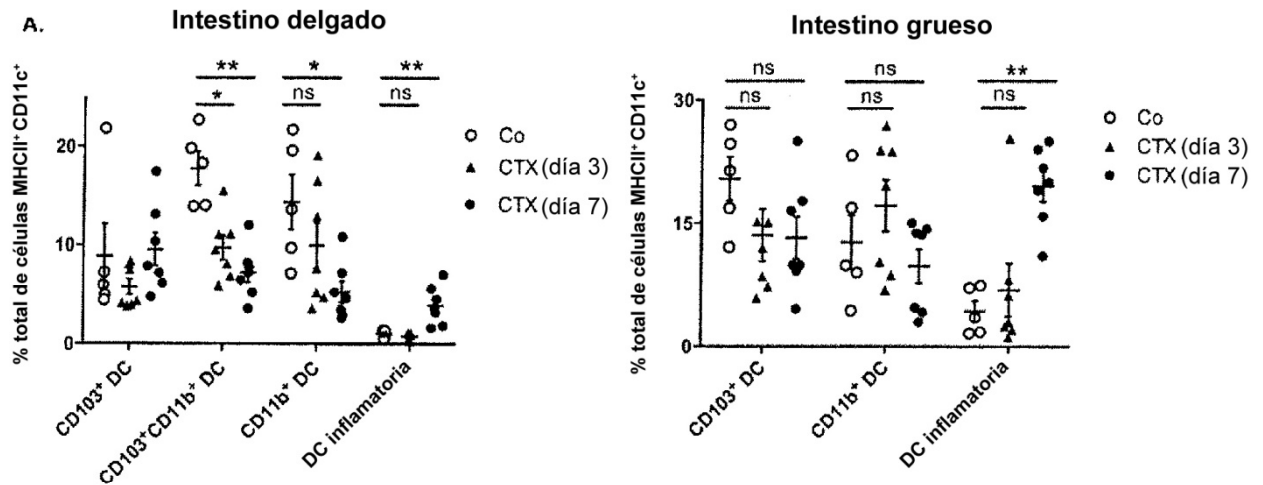


FIGURA 7A

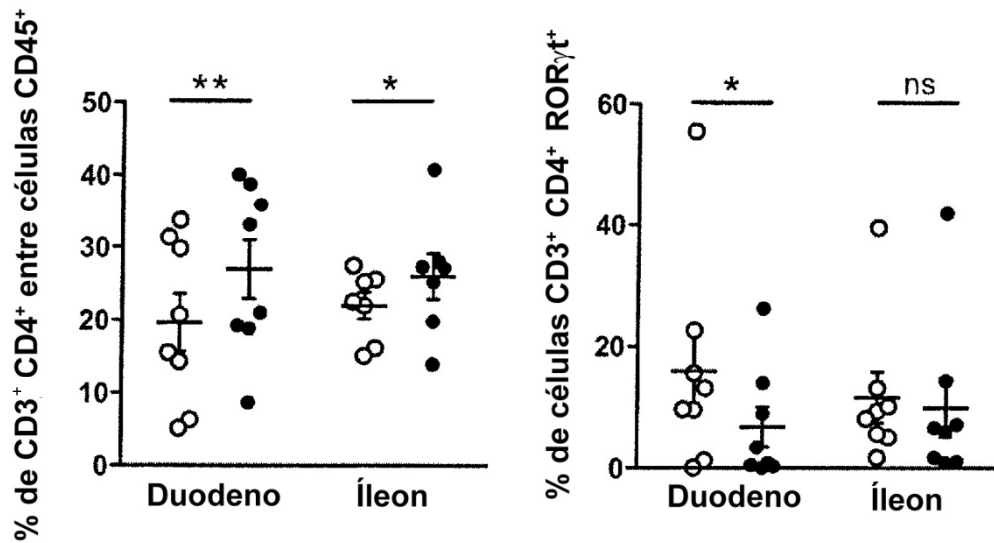


FIGURA 7B

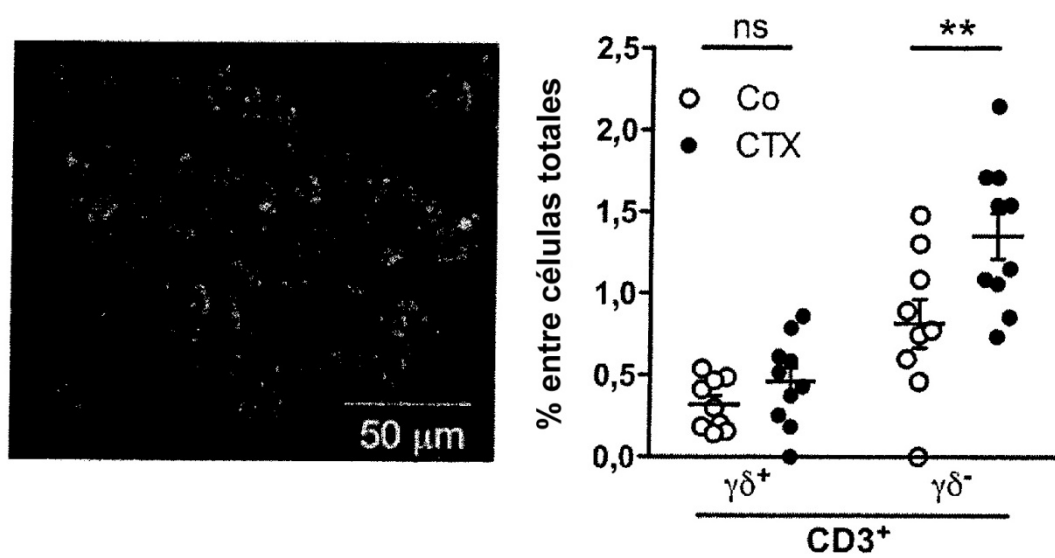


FIGURA 7C

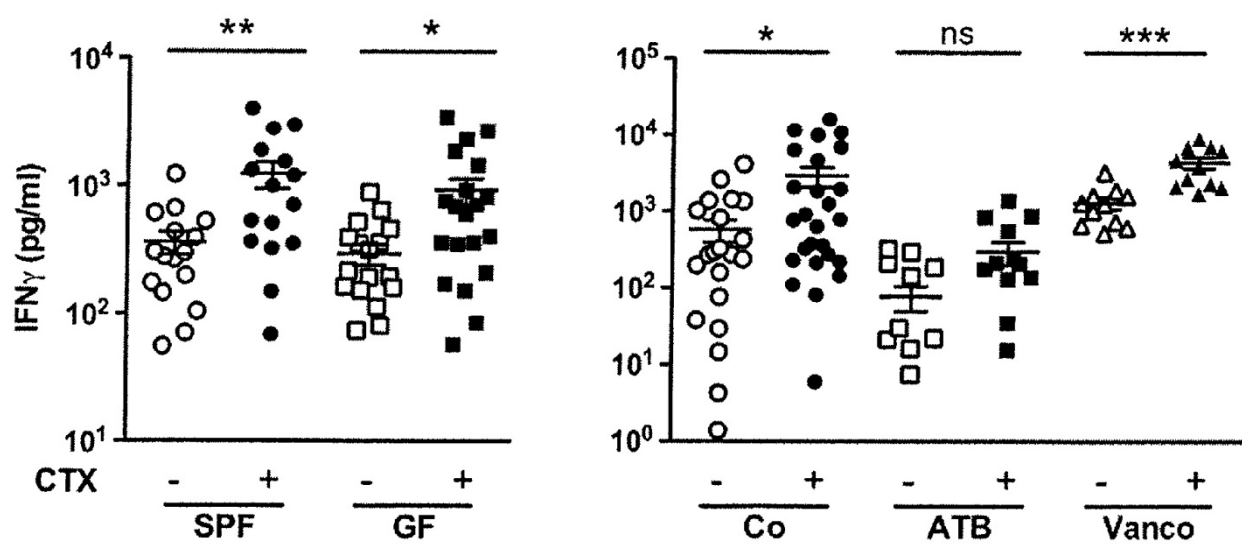


FIGURA 7D

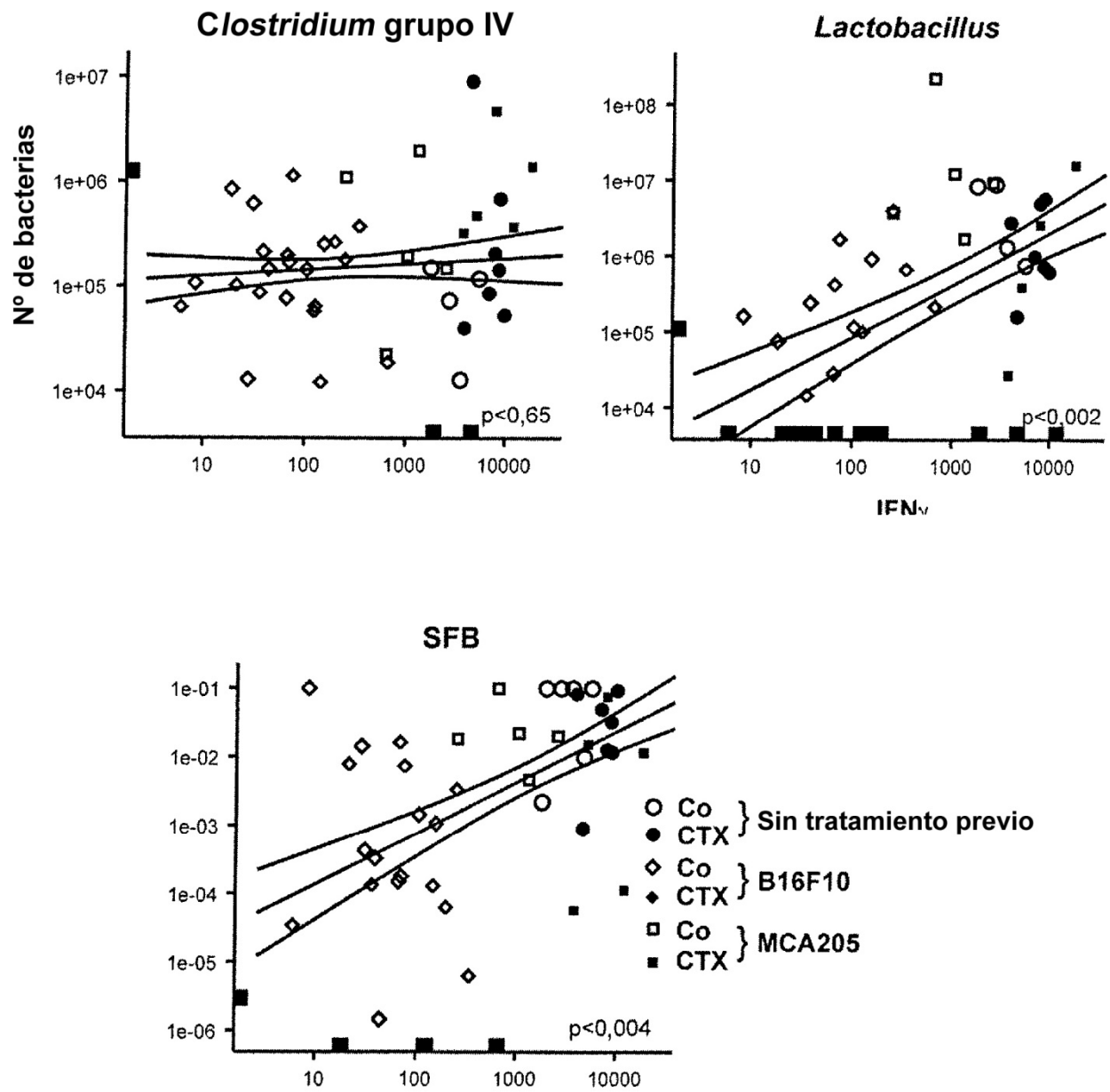


FIGURA 7E

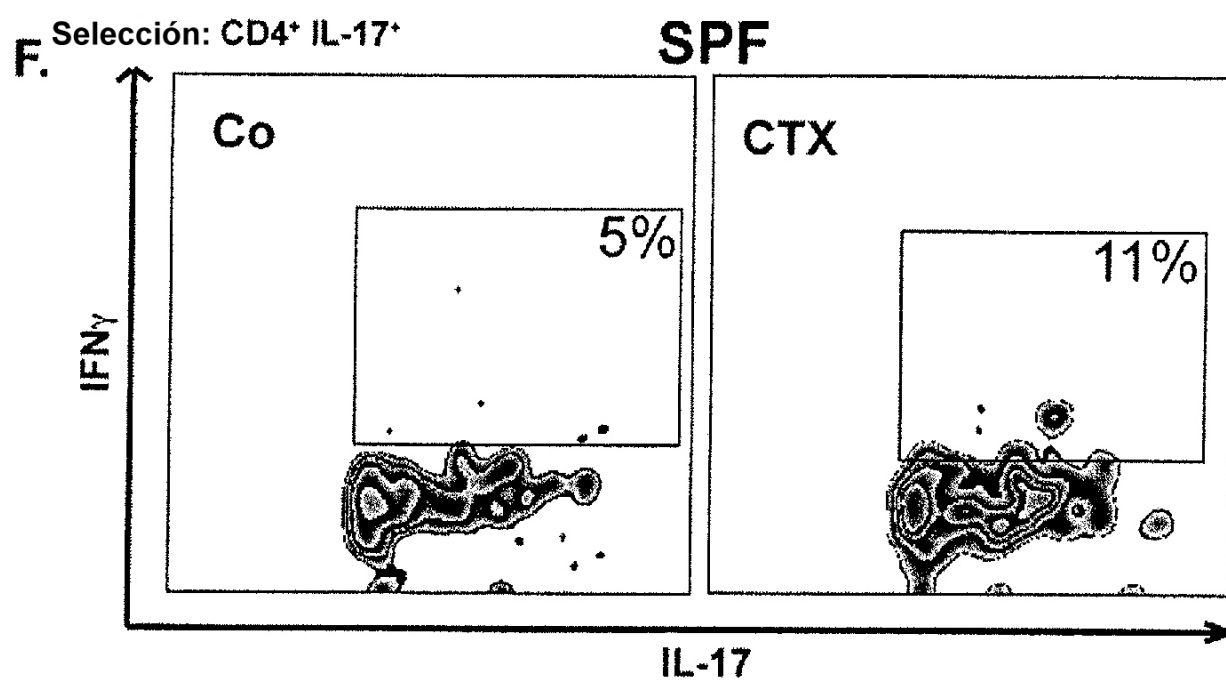


FIGURA 7F

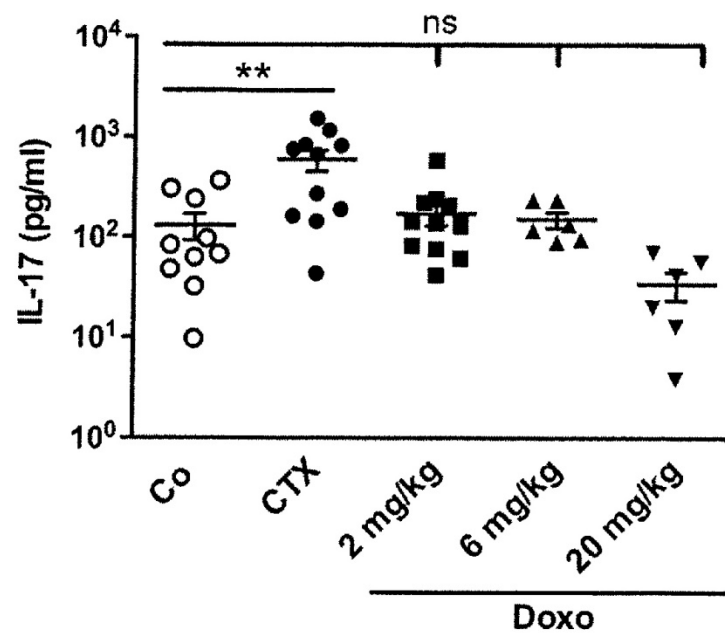


FIGURA 8A

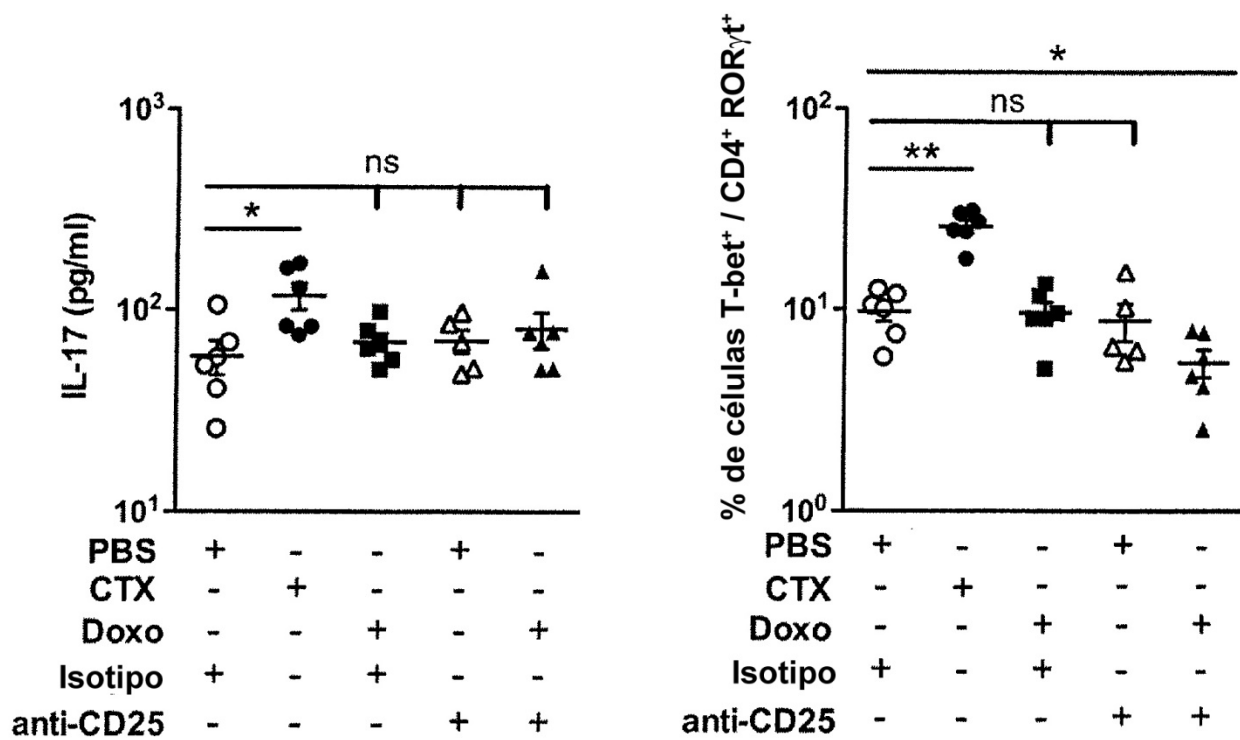
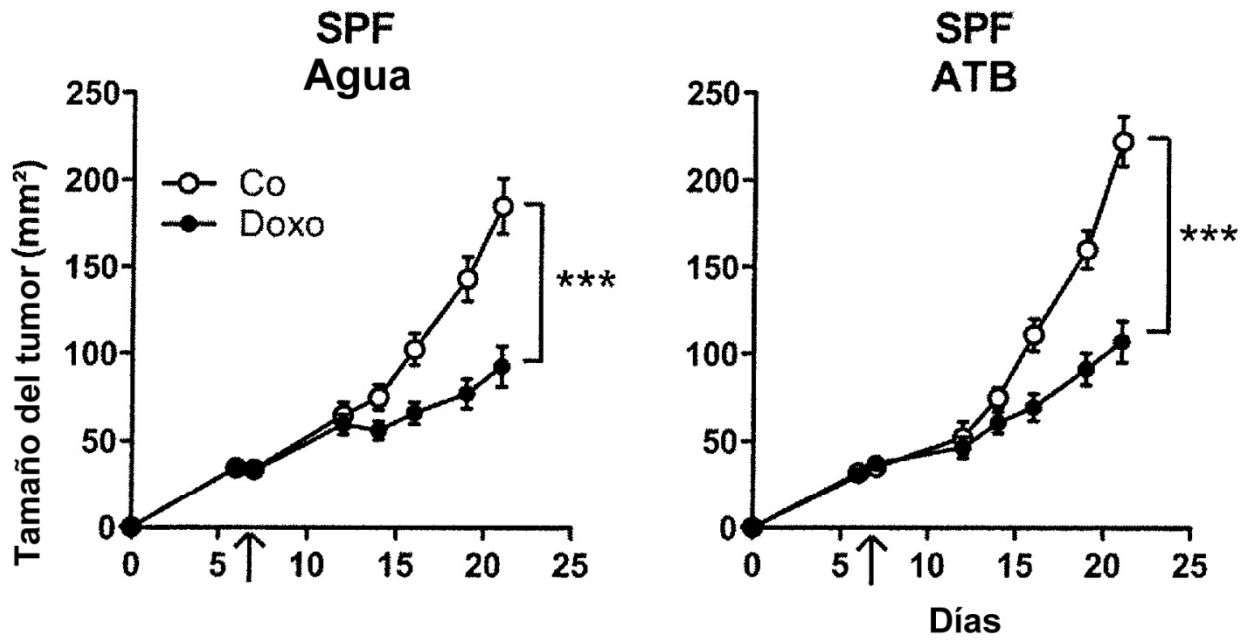


FIGURA 8B



Sin gérmenes

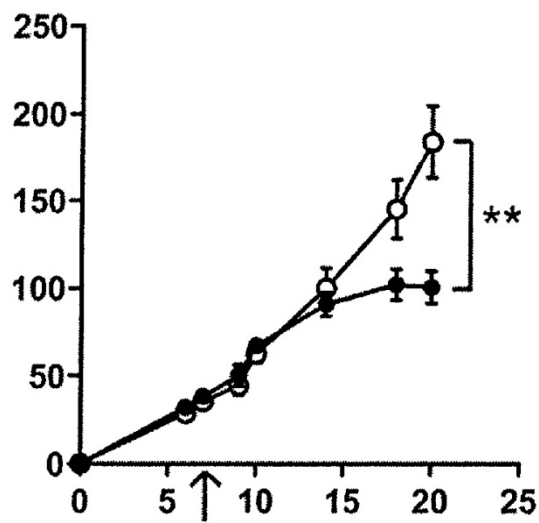


FIGURA 8C

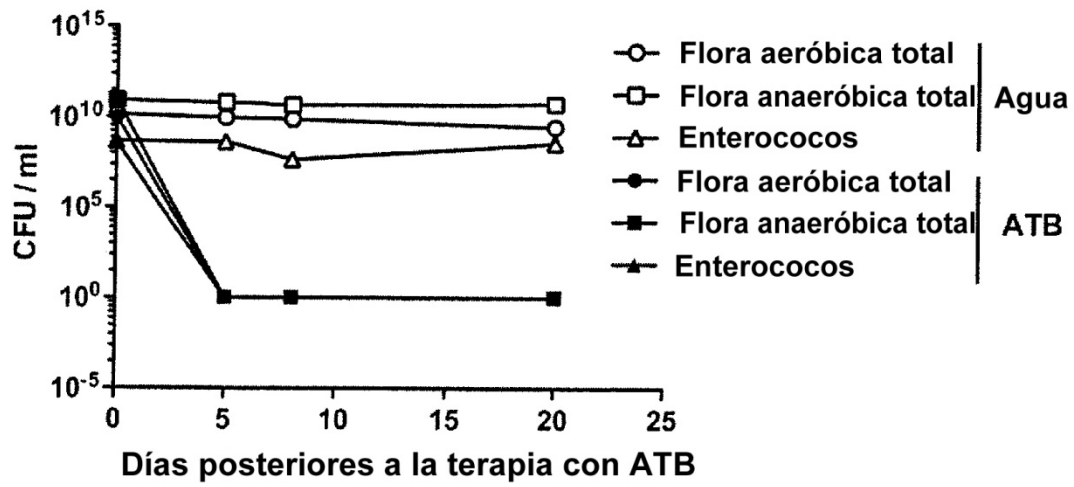


FIGURA 9

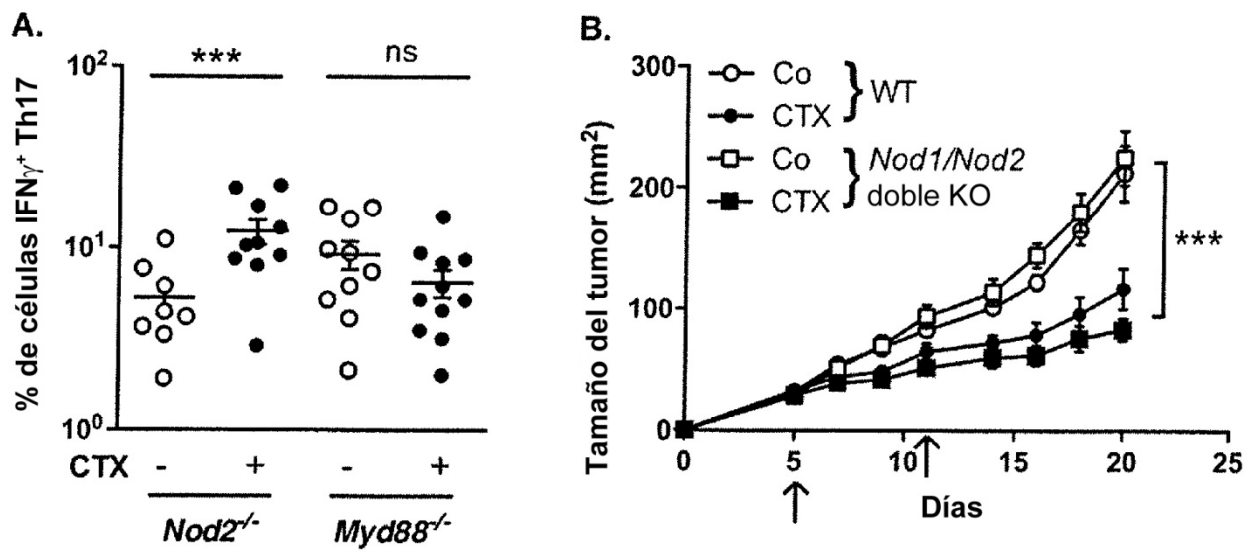


FIGURA 10

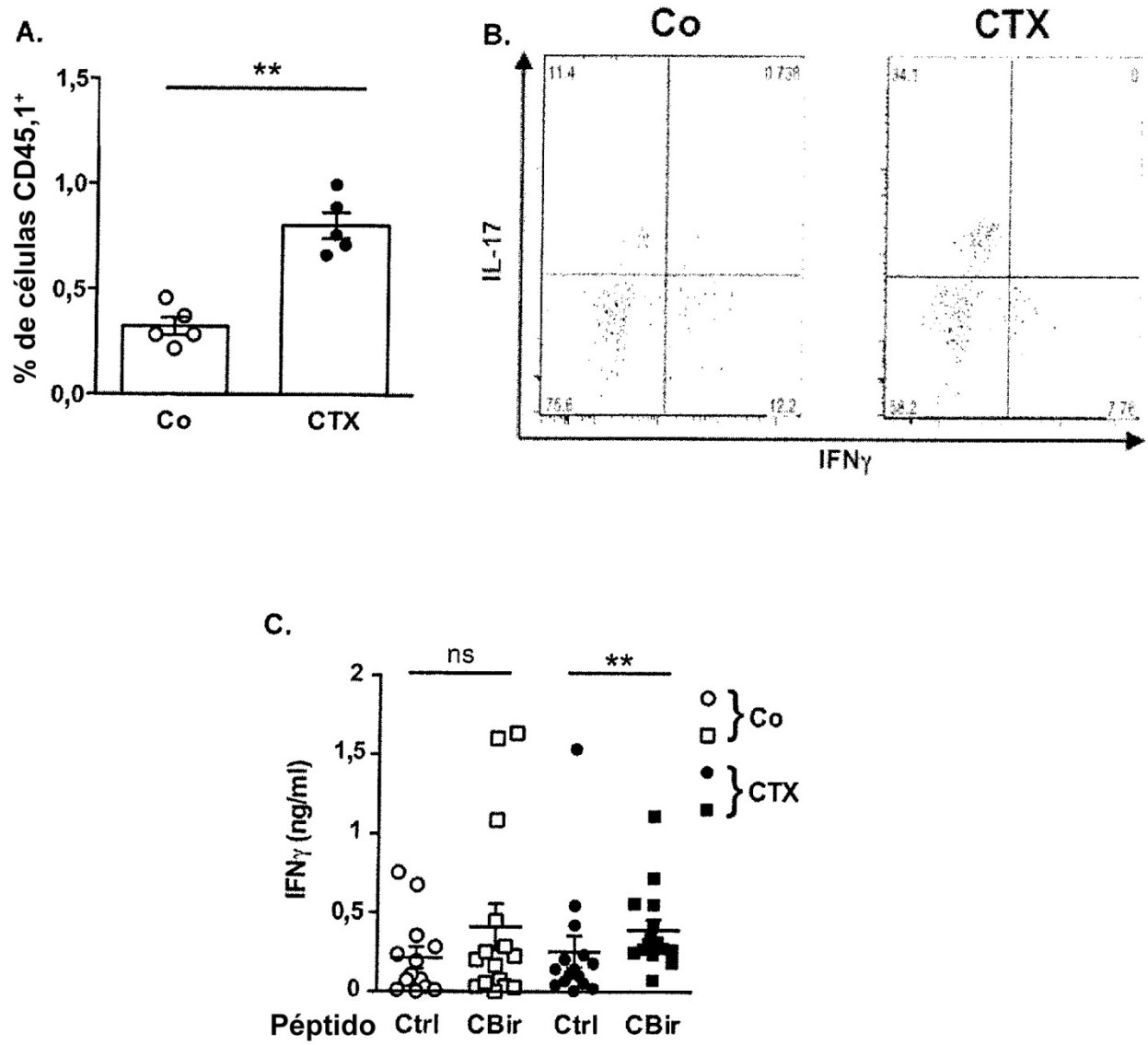


FIGURA 11

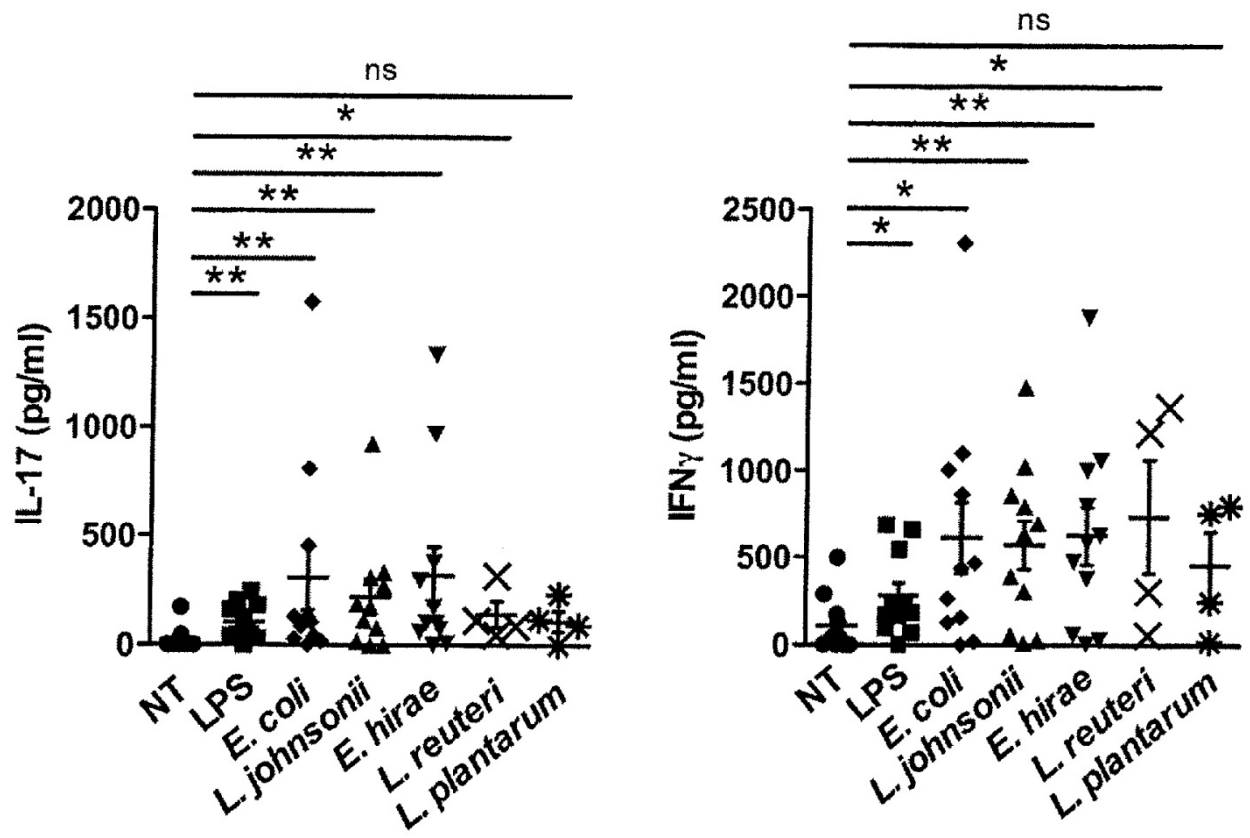


FIGURA 12

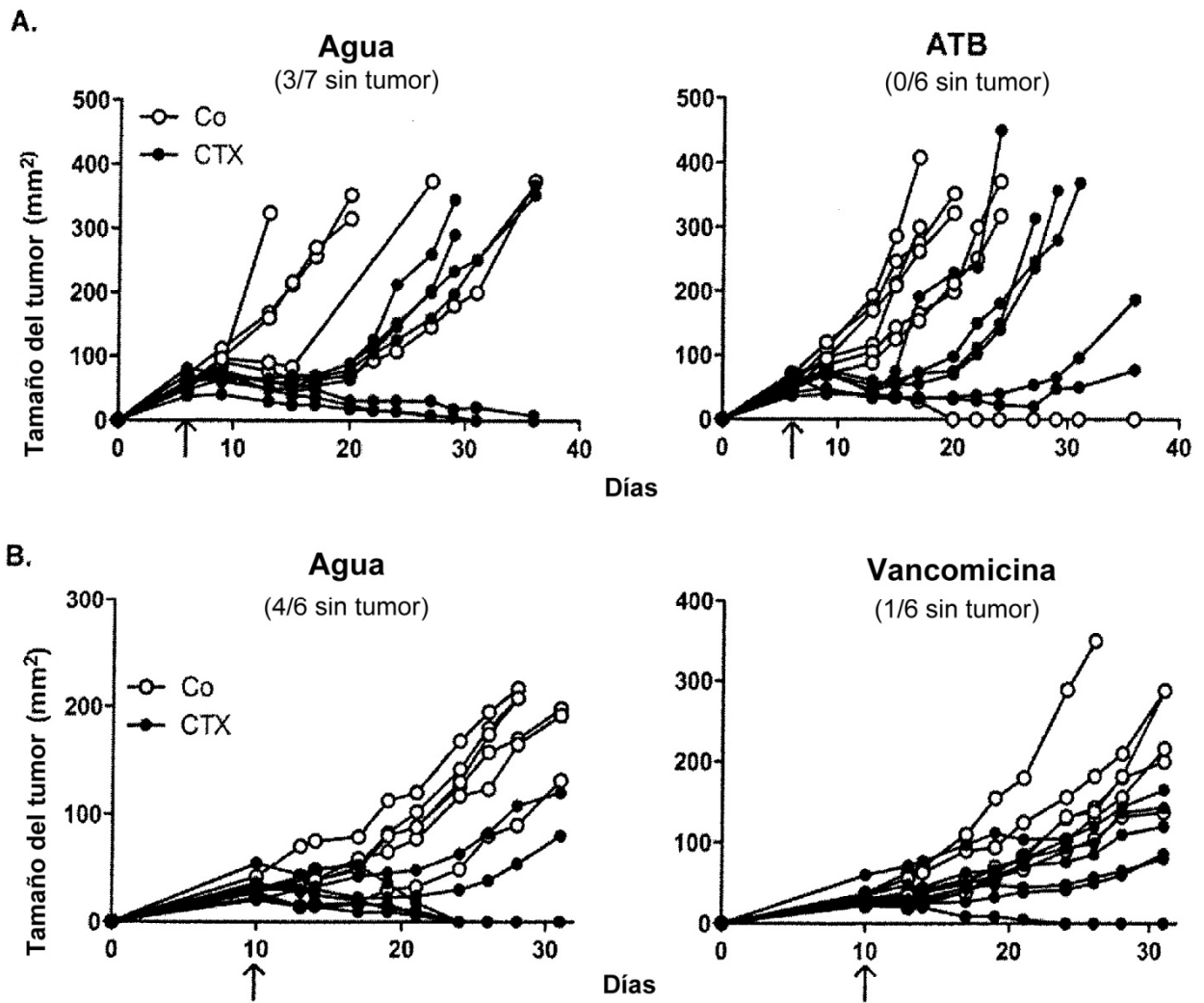


FIGURA 13

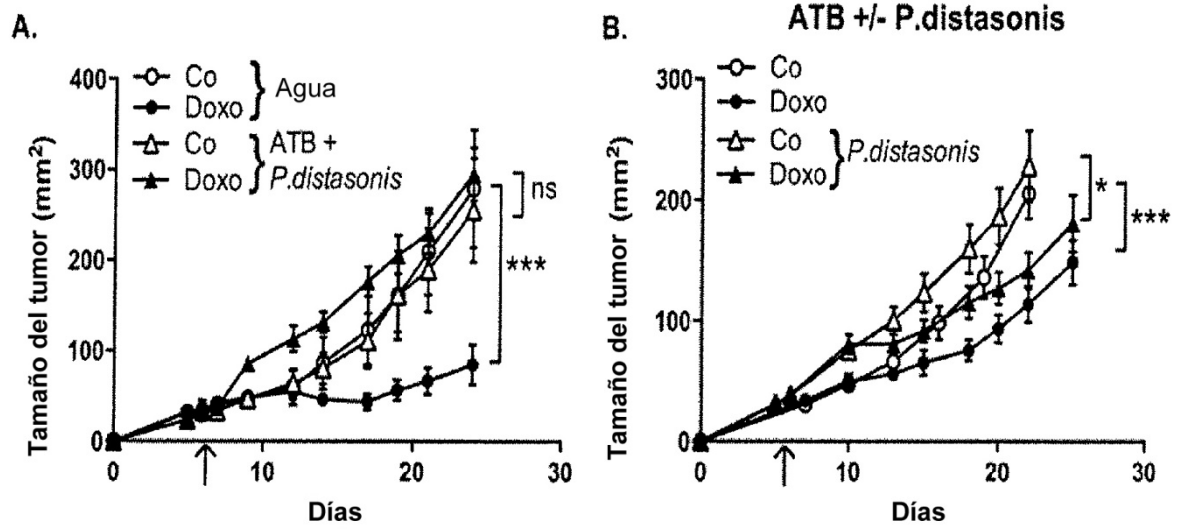


FIGURA 14

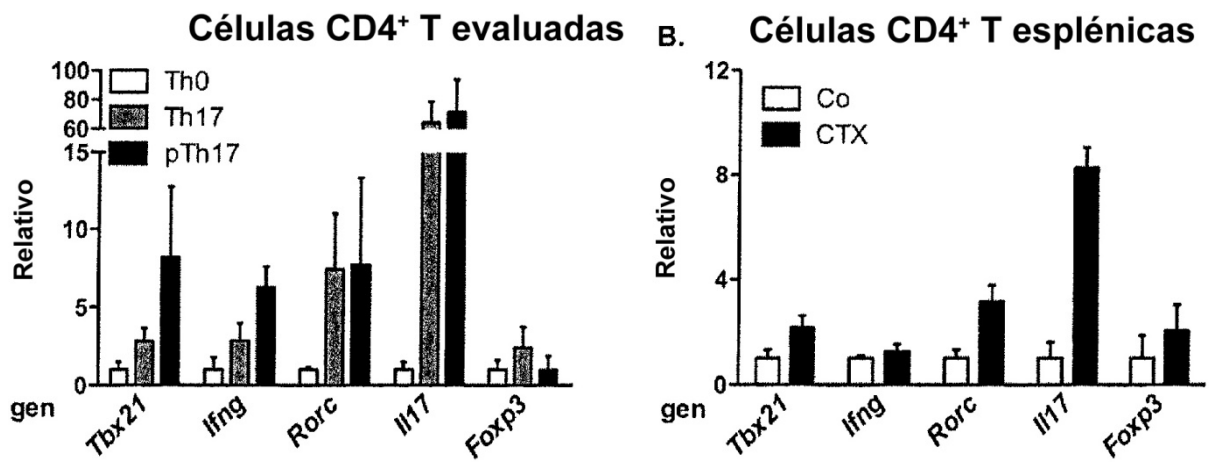


FIGURA 15

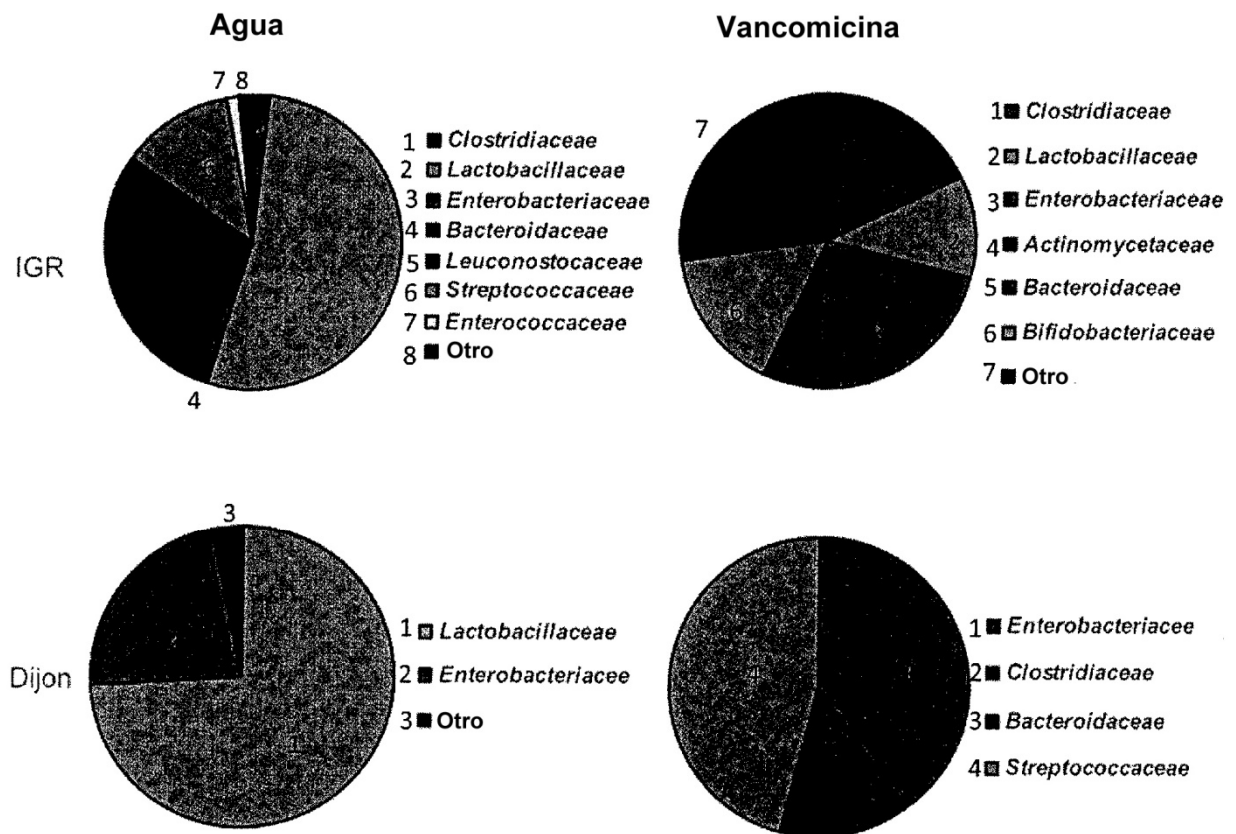


FIGURA 16

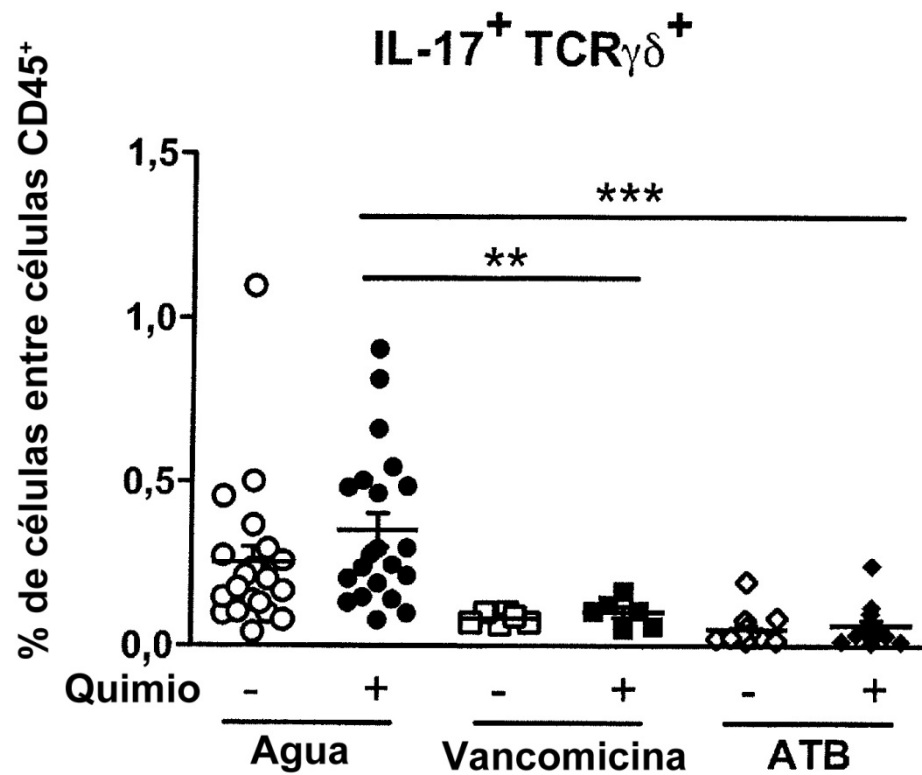


FIGURA 17

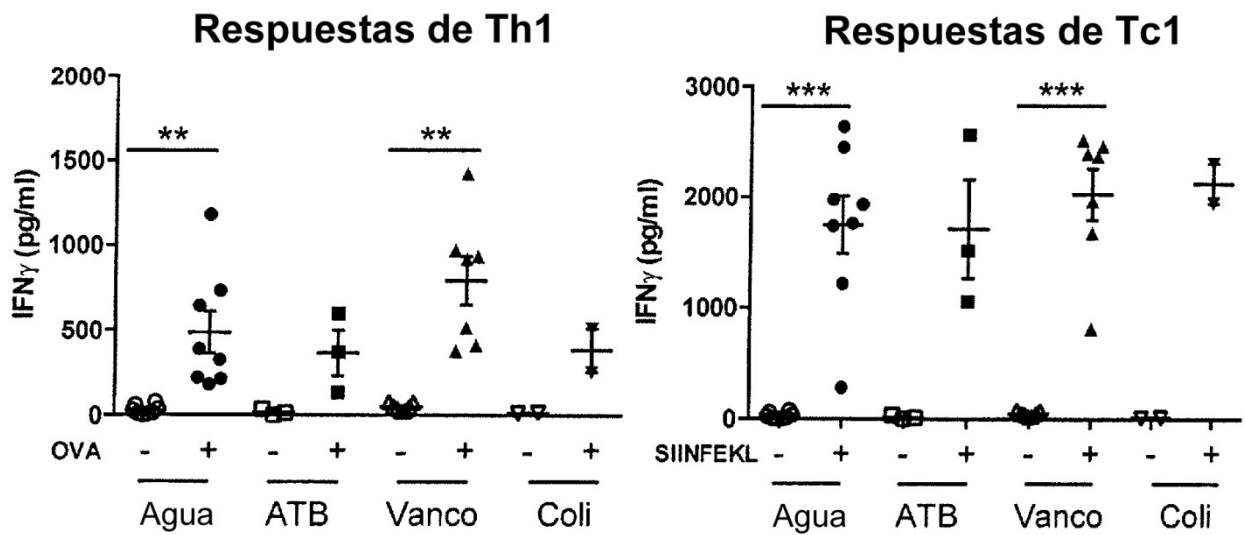


FIGURA 18

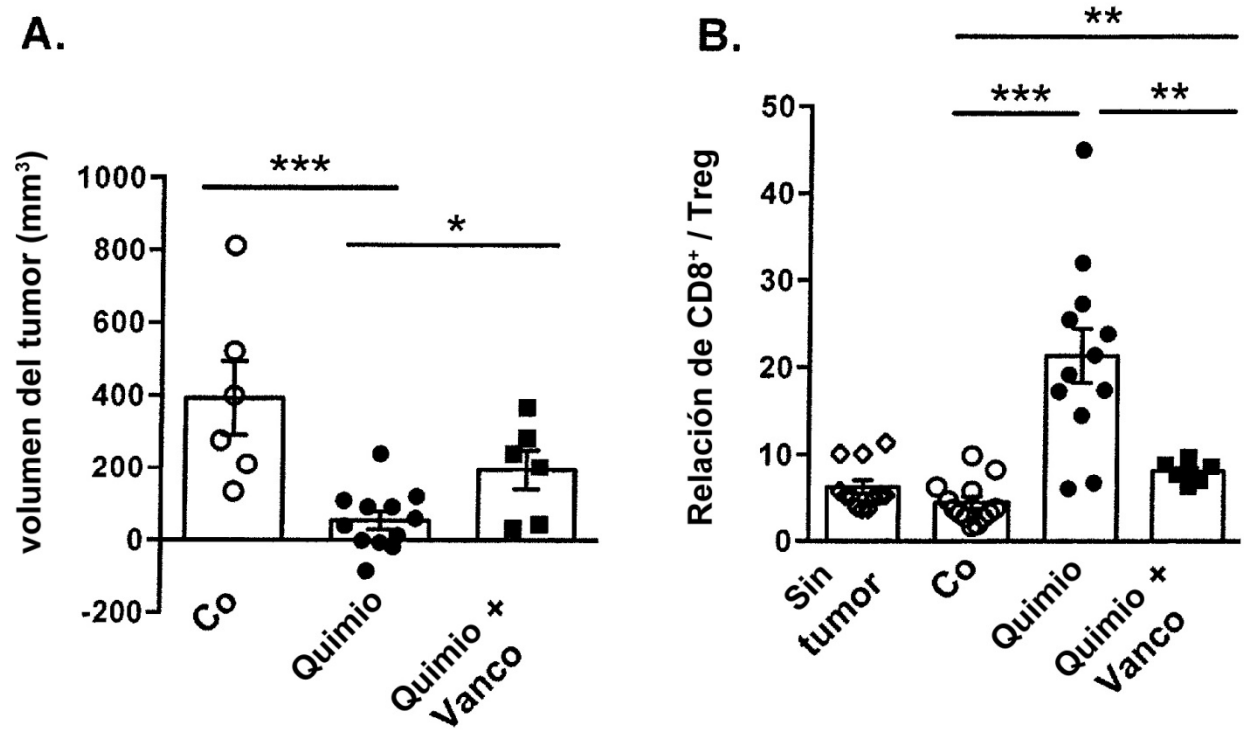


FIGURA 19

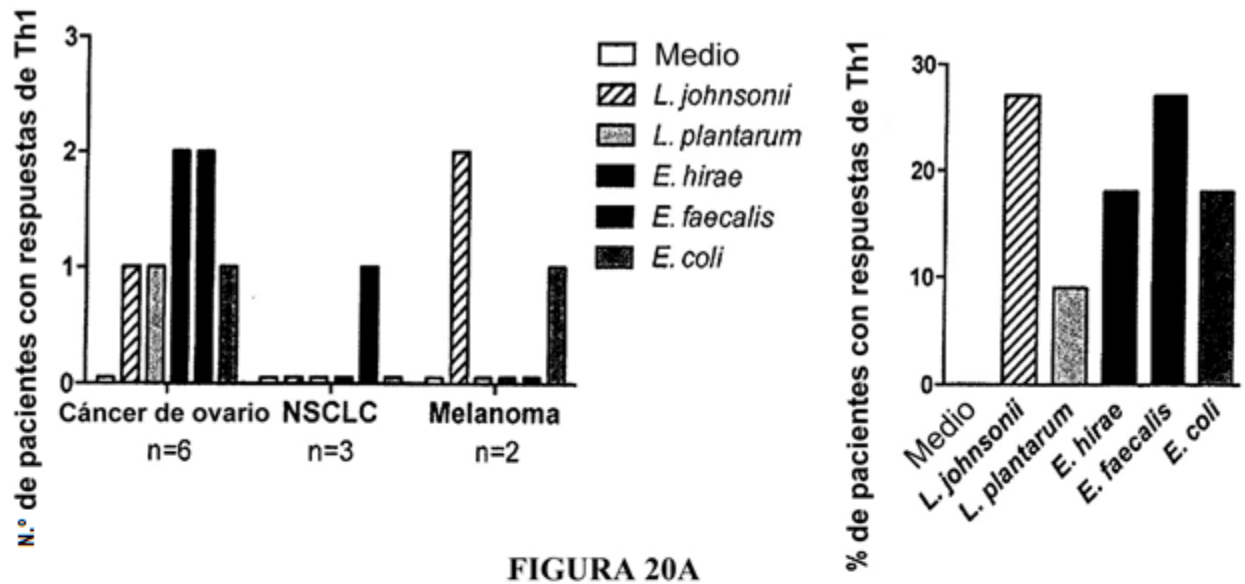


FIGURA 20A

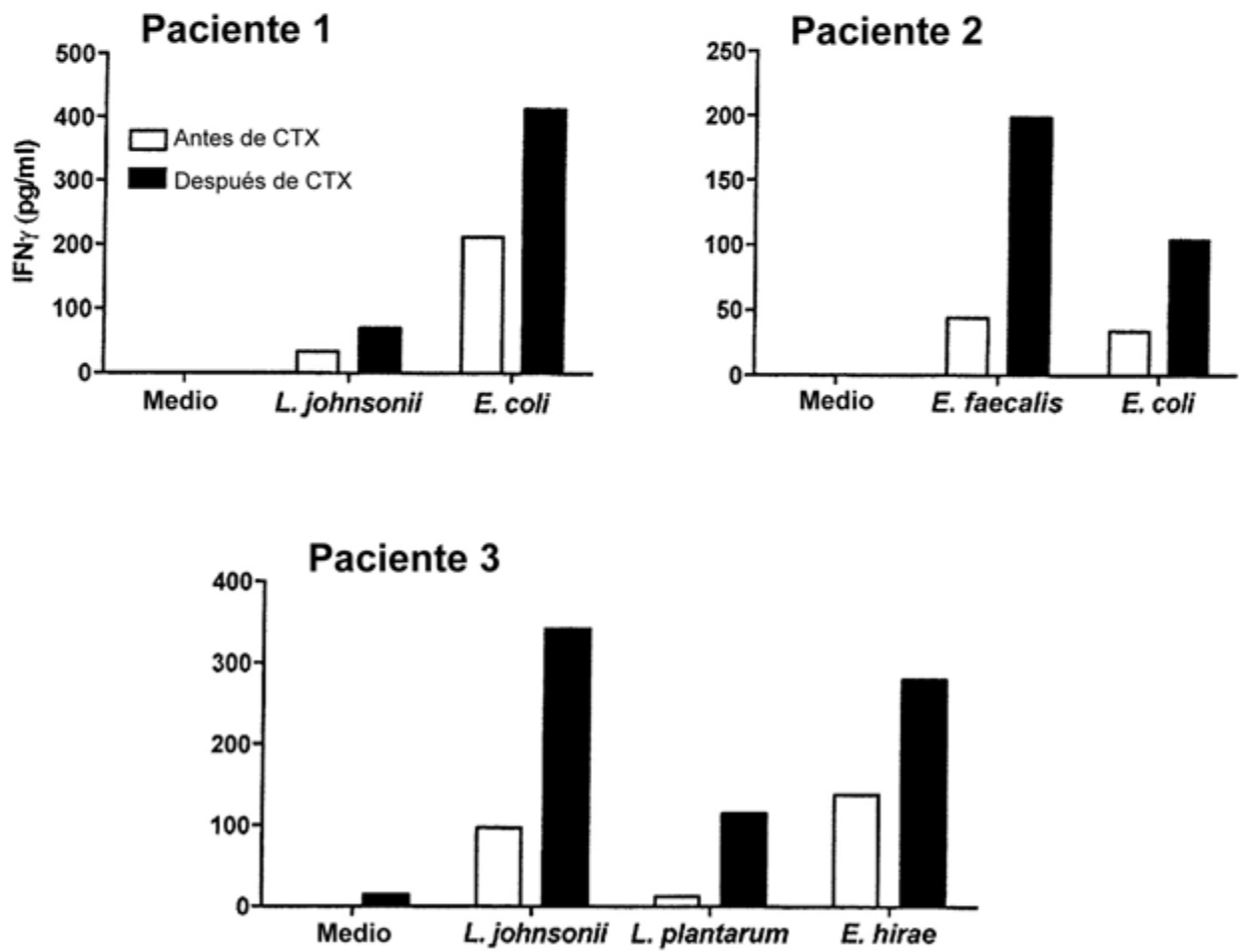


FIGURA 20B

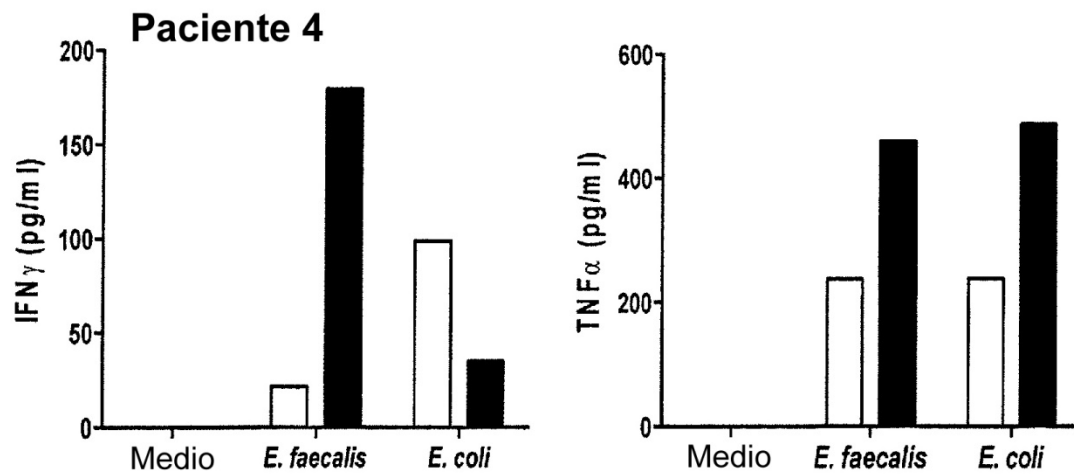


FIGURA 20C

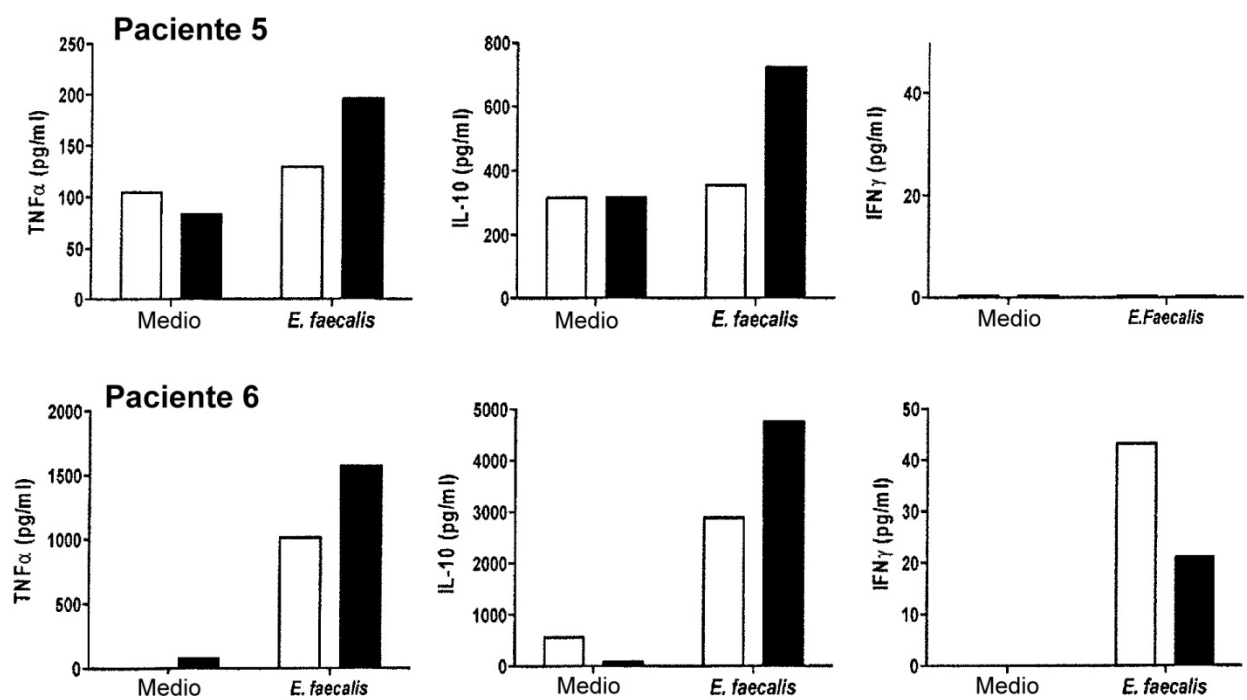
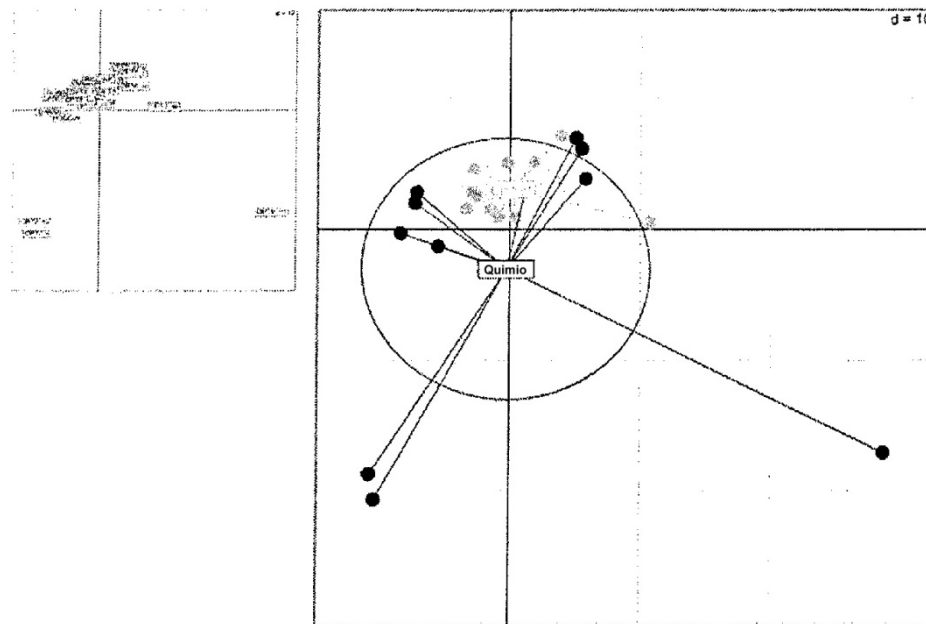


FIGURA 20D



Comp1=9,18%
Comp2=8,26%

Prueba de Monte-Carlo
Observación: 0,05645551

Basado en 999 repeticiones
Valor p simulado: 0,018

FIGURA 21

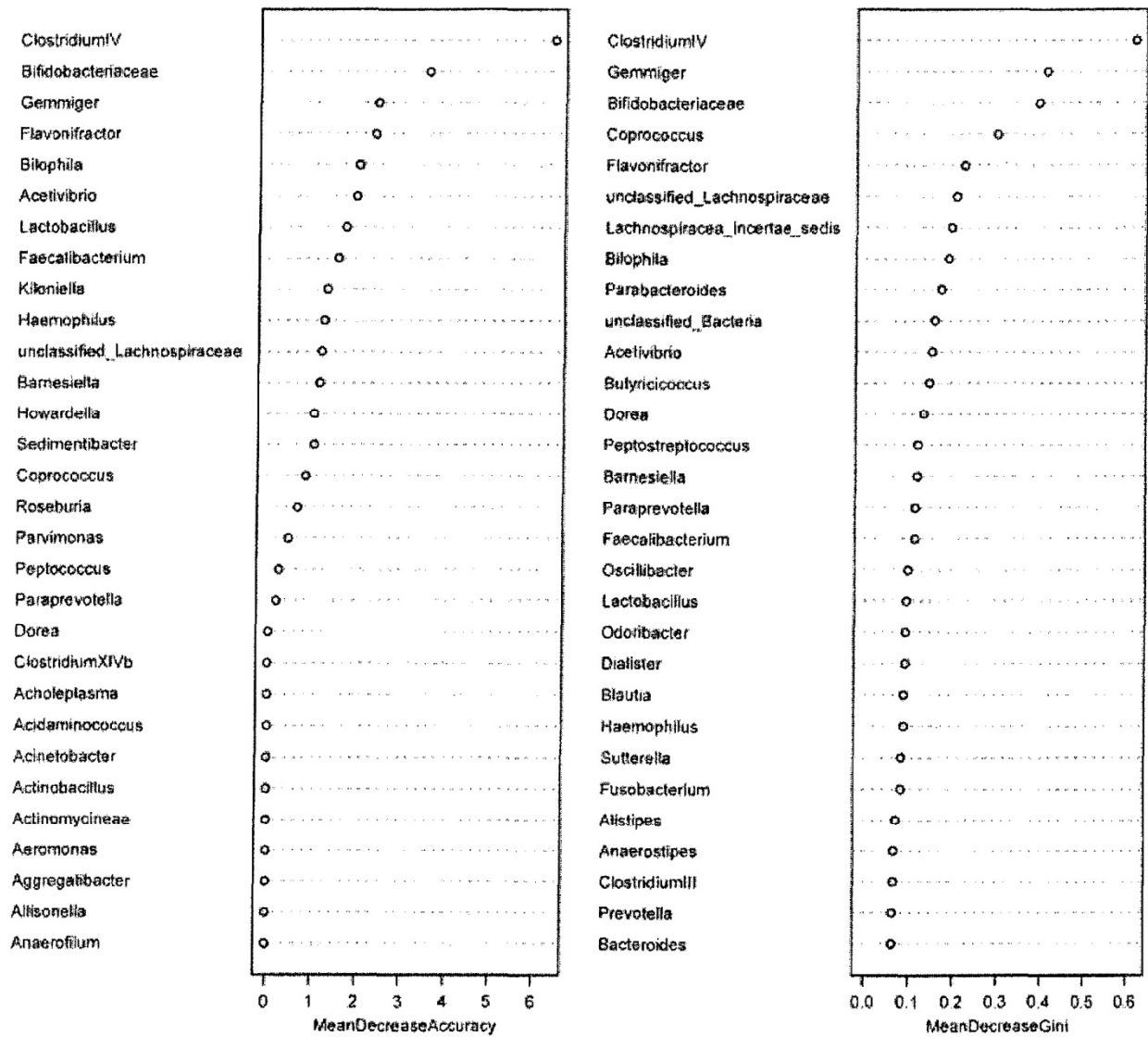


FIGURA 22

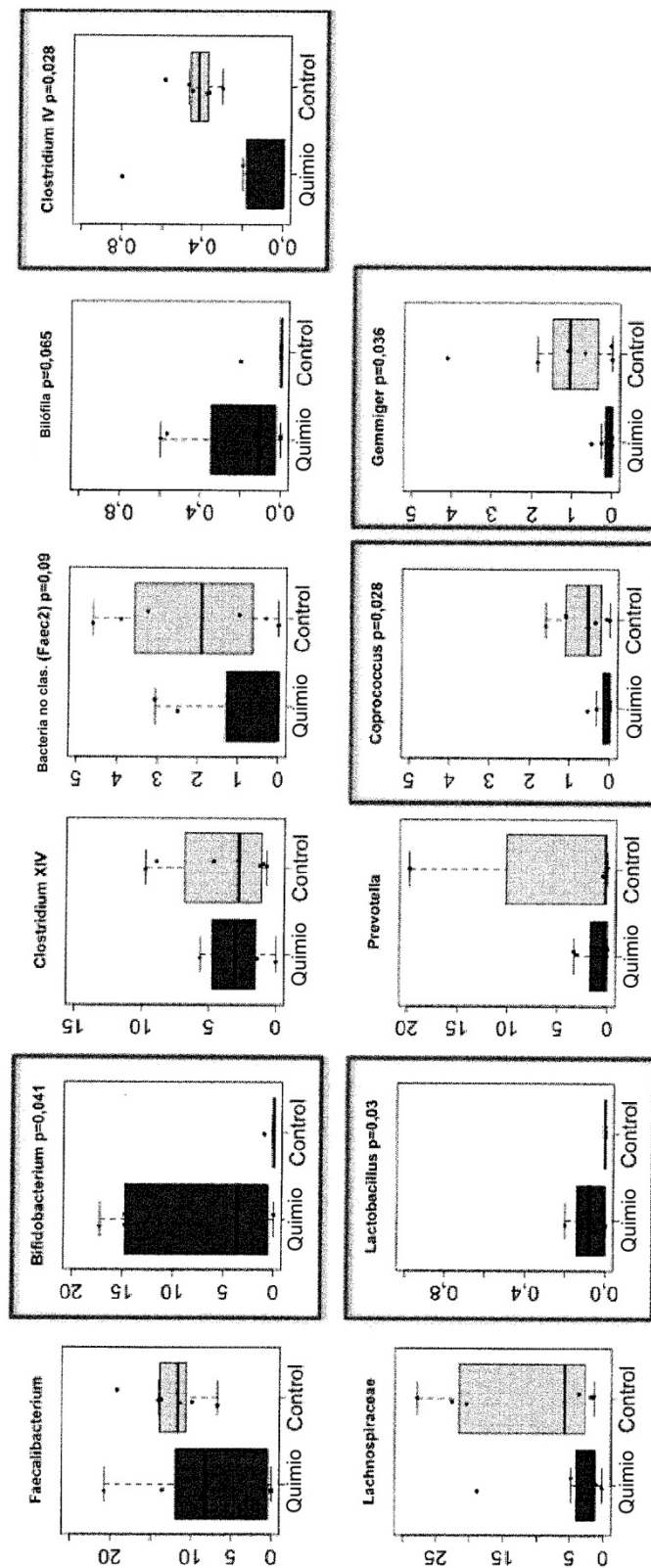


FIGURA 23

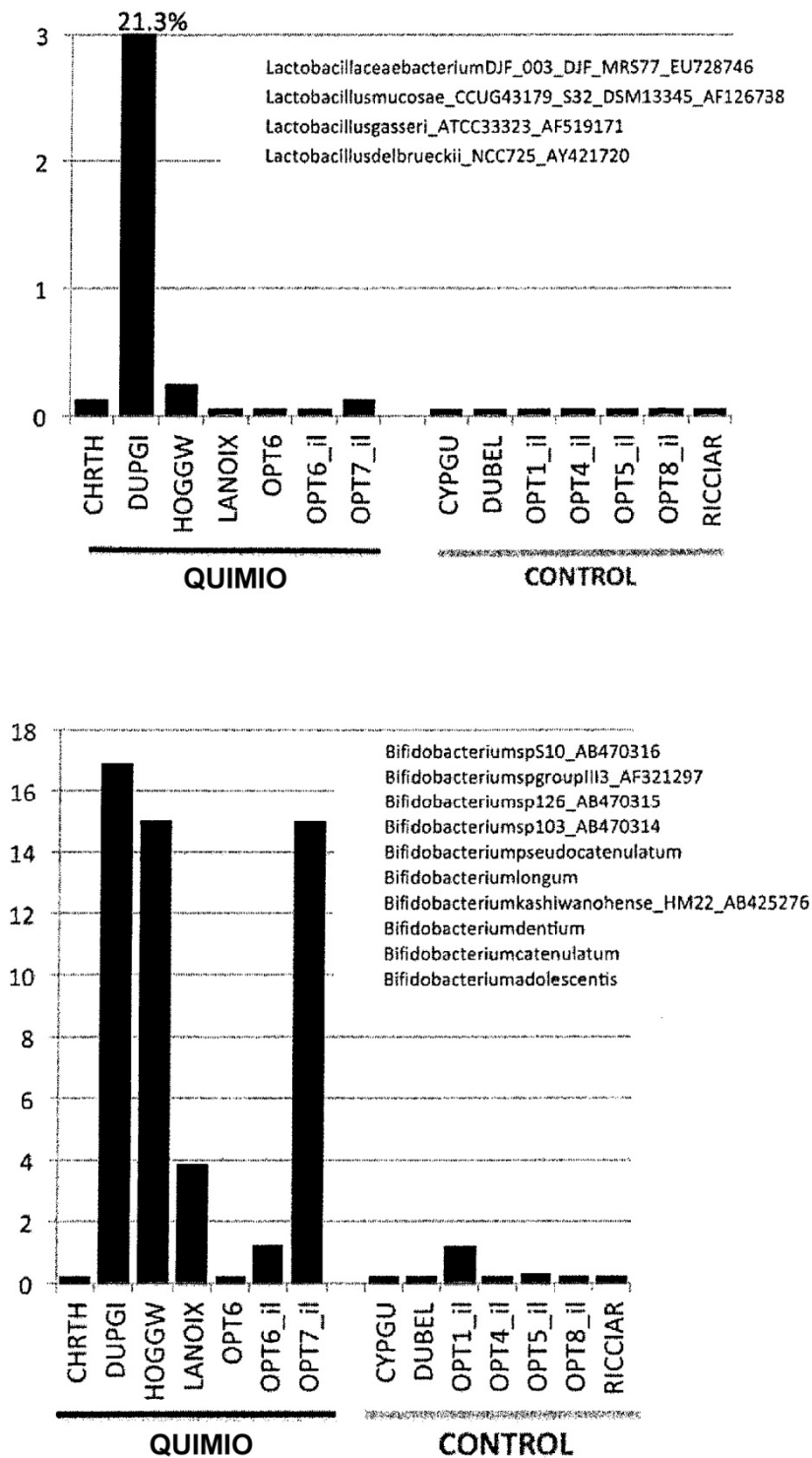


FIGURA 24

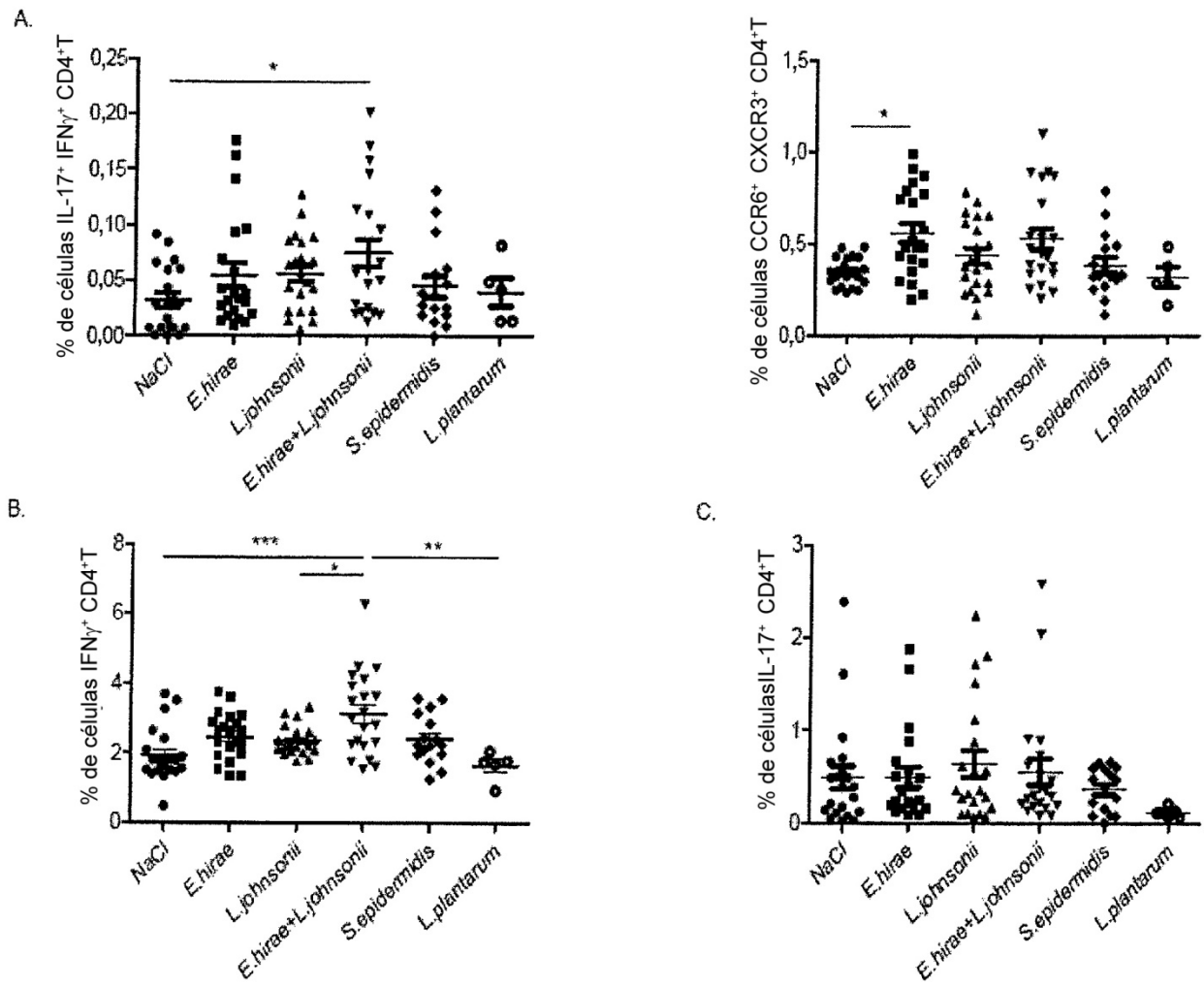


FIGURA 25

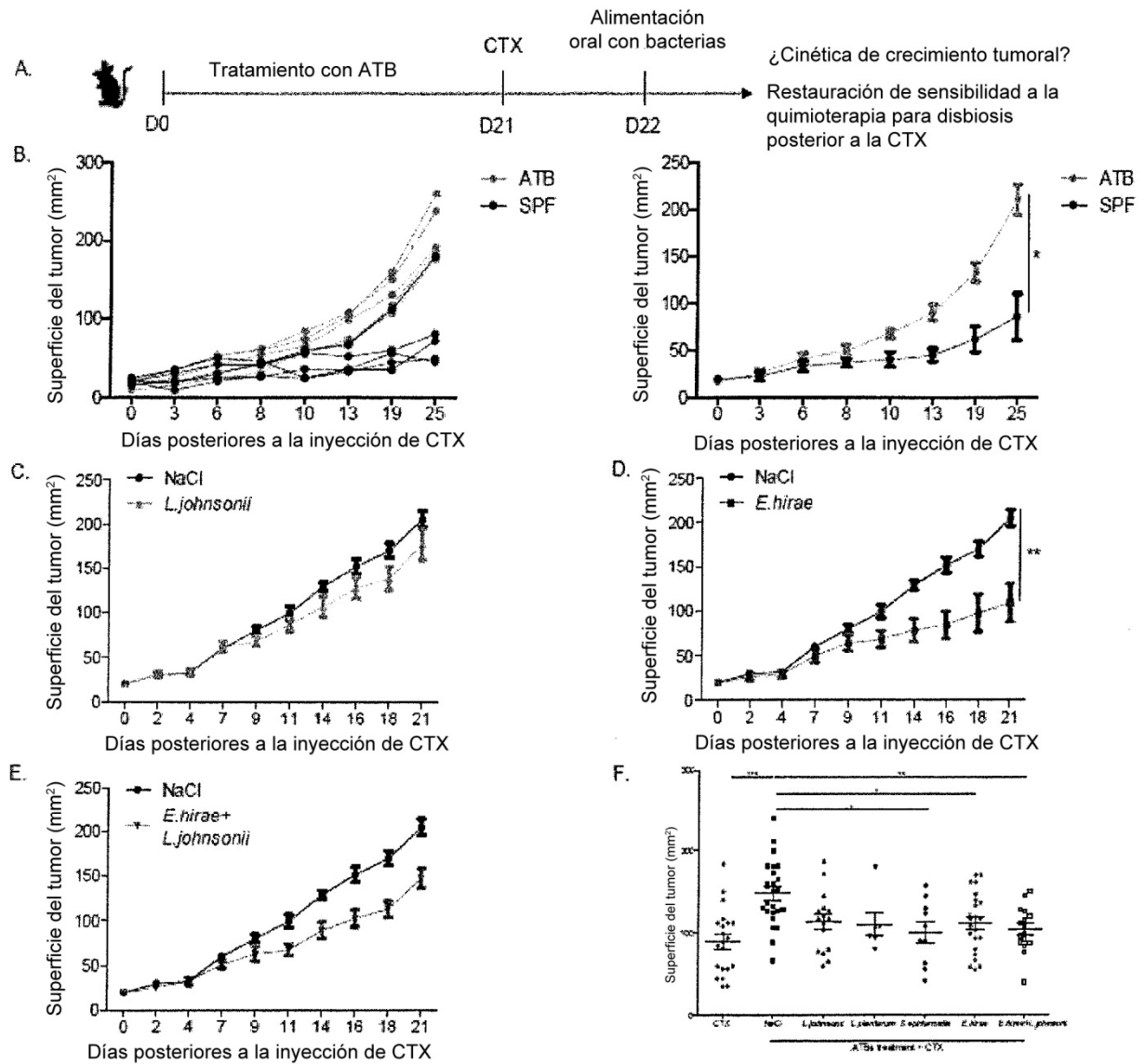


FIGURA 26

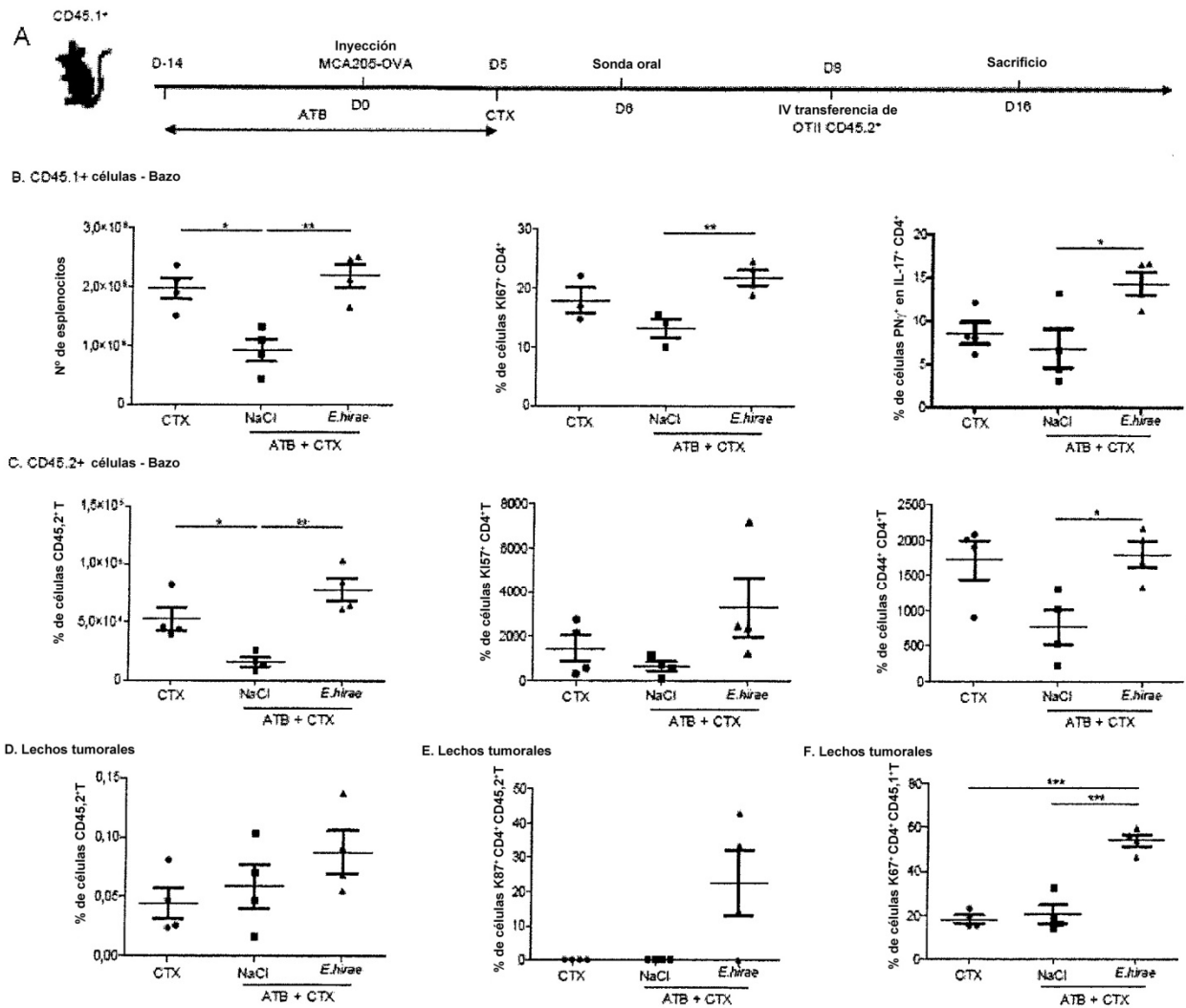


FIGURA 27

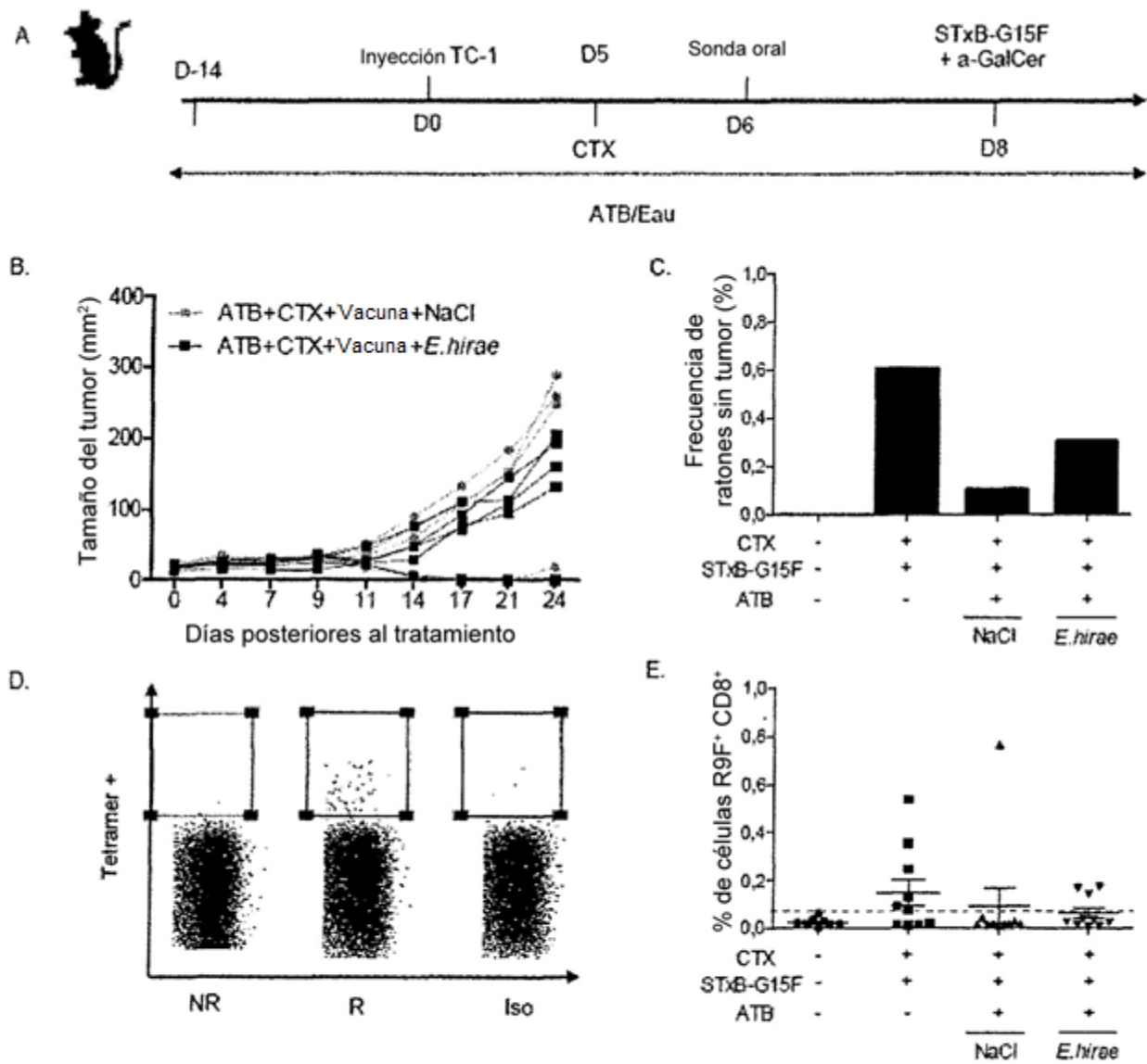


FIGURA 28

DiversiLab v3.4
PC
Informe de análisis #491

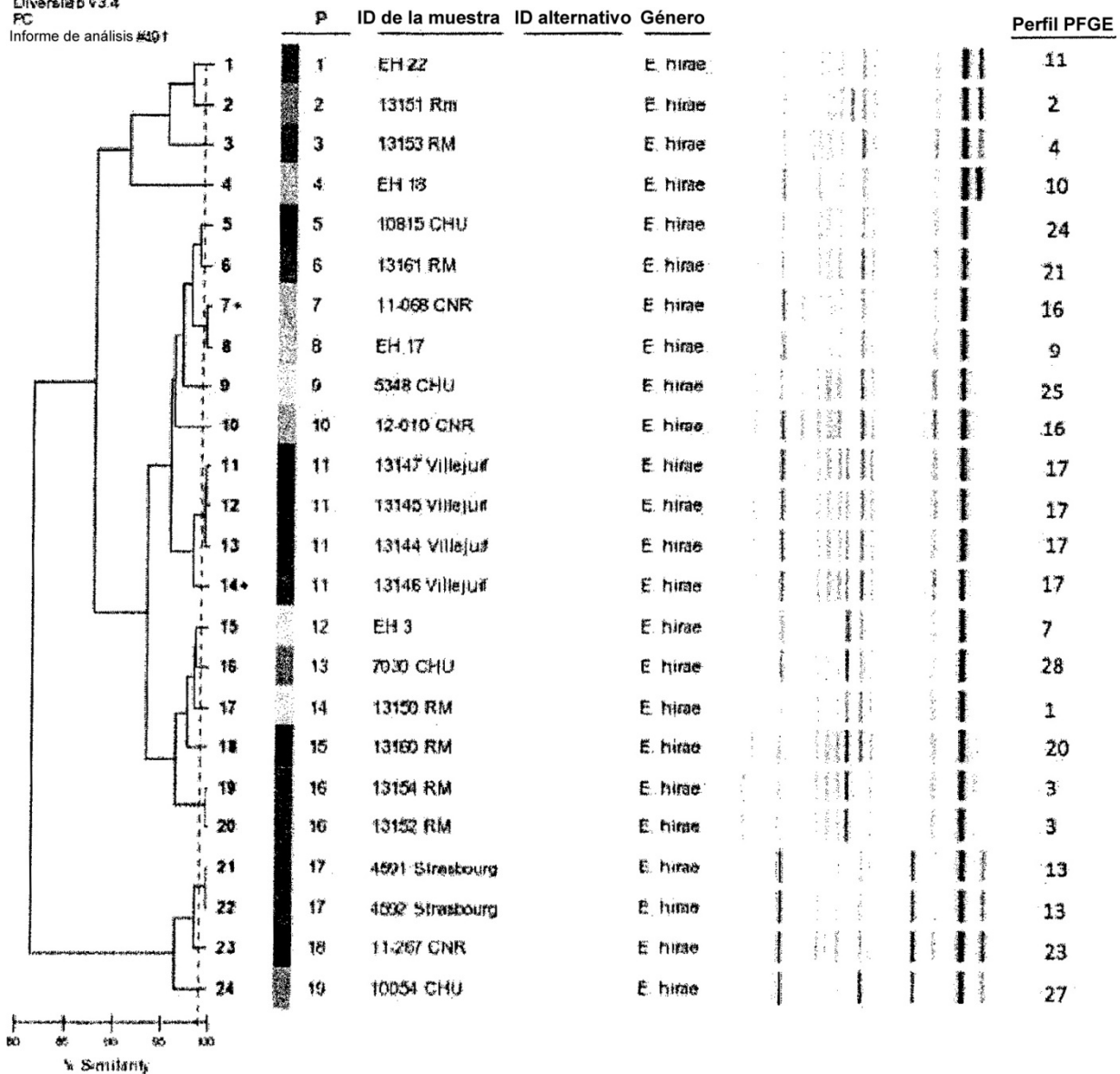


FIGURA 29

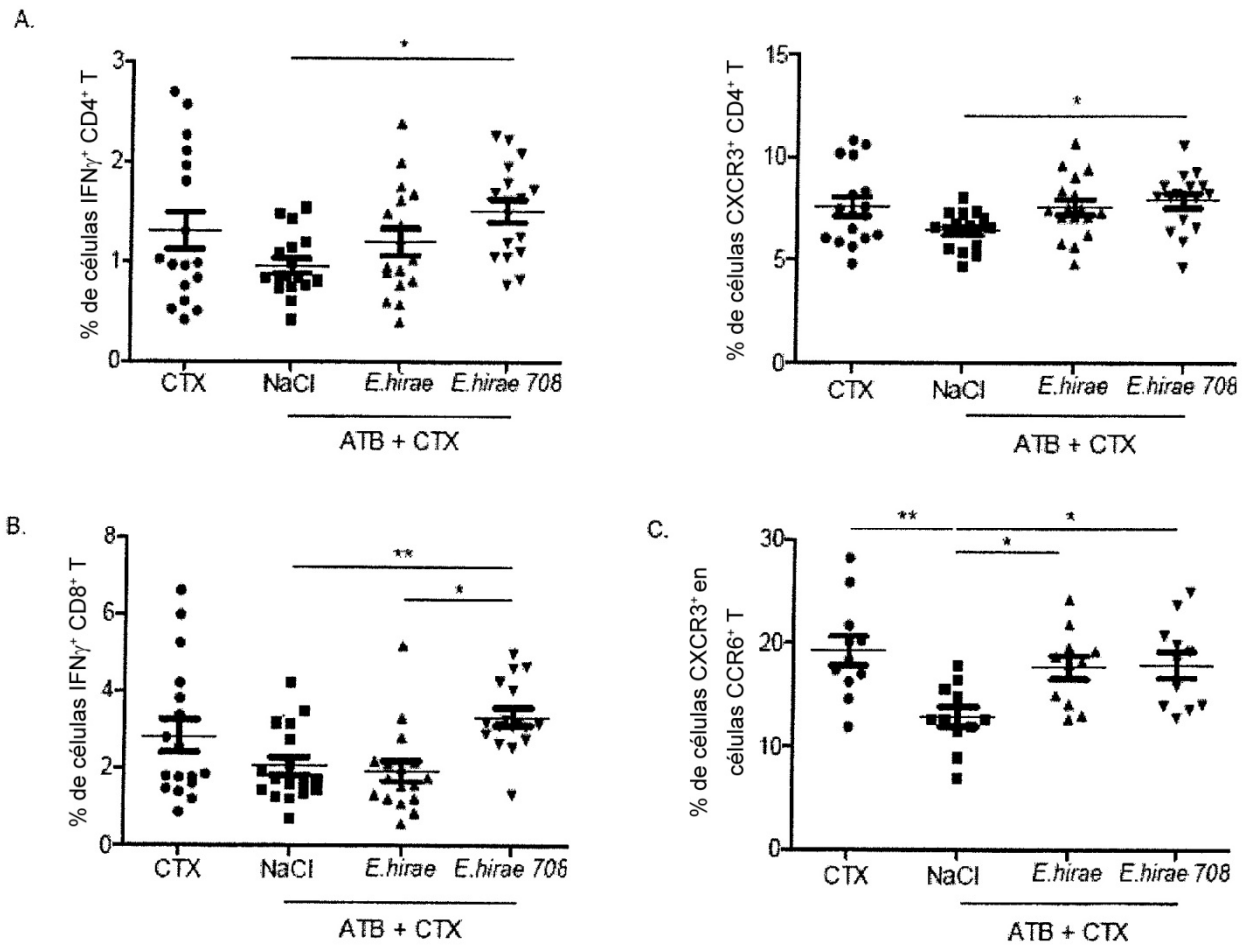


FIGURA 30

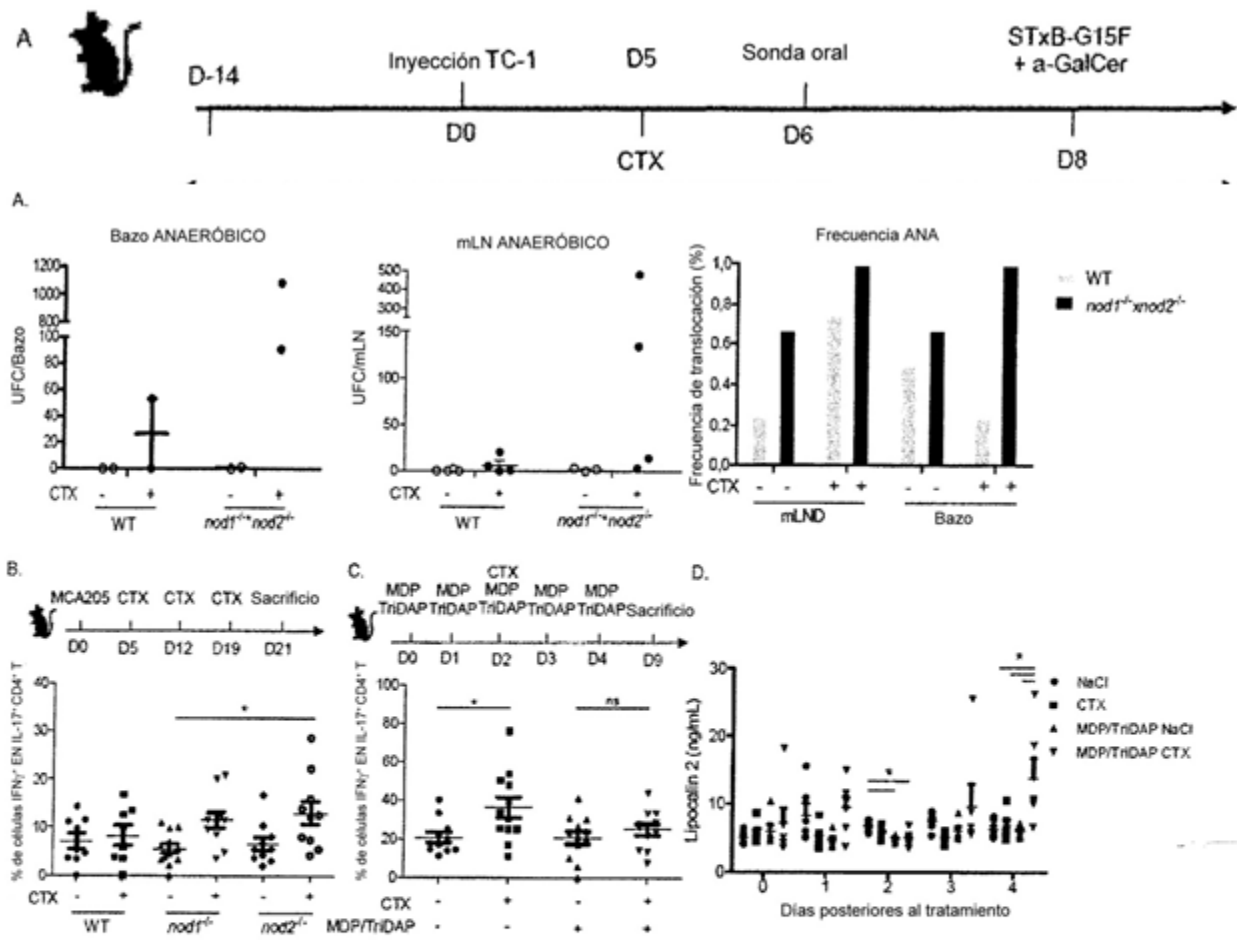


FIGURA 31

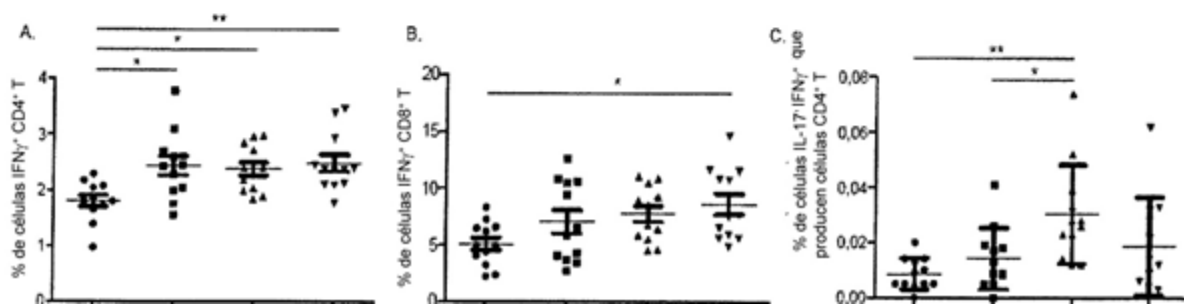


FIGURA 32

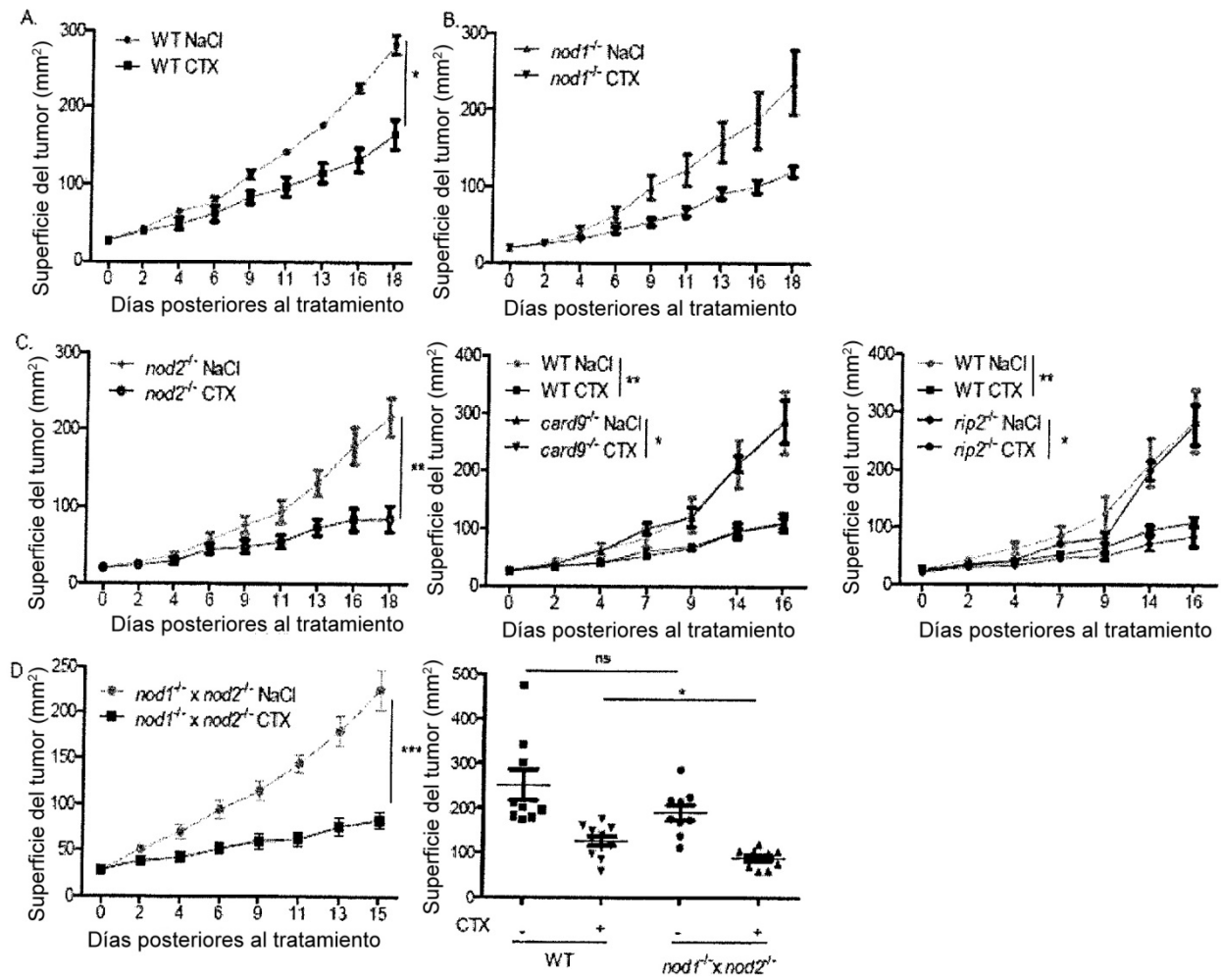


FIGURA 33

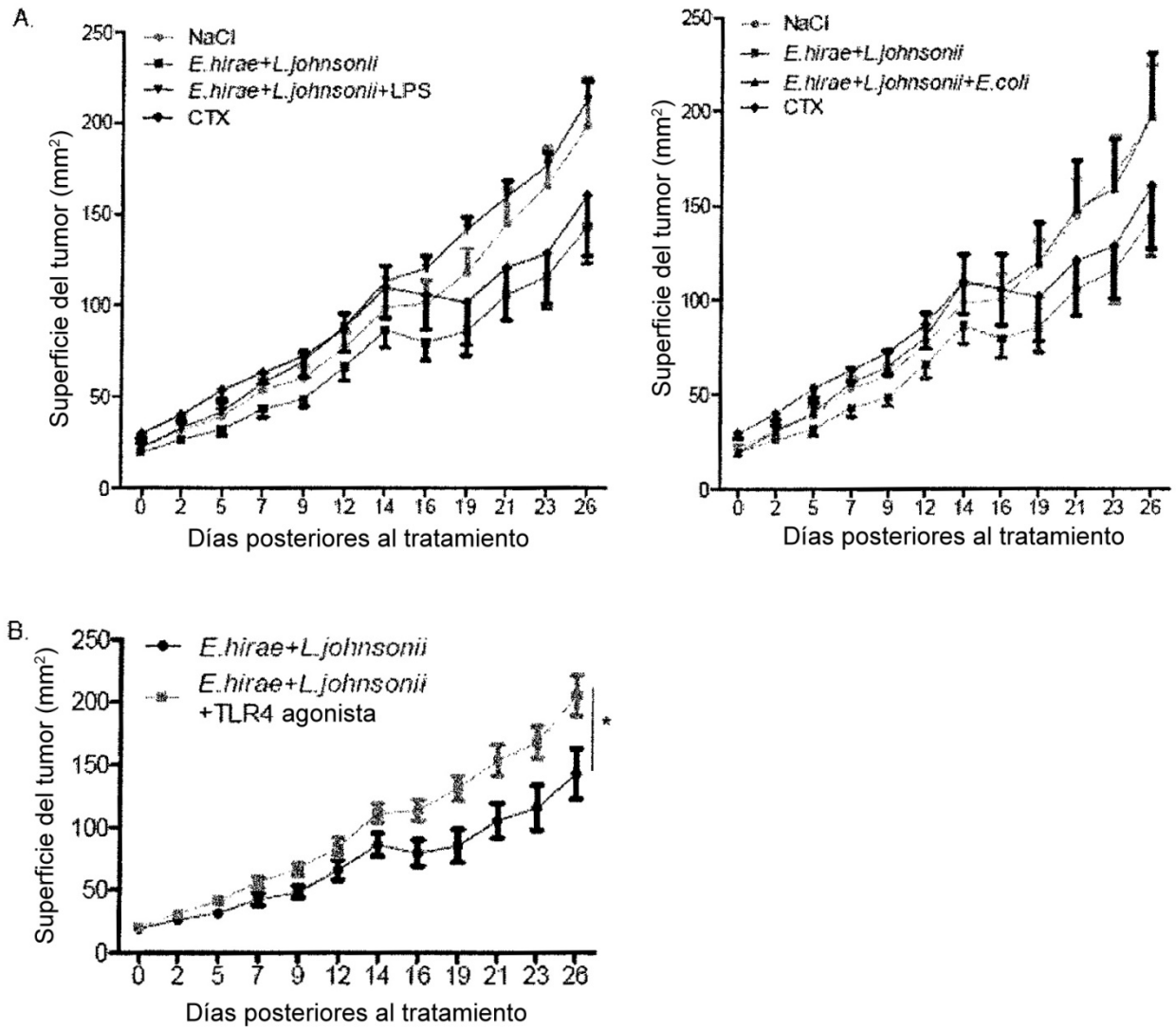


FIGURA 34

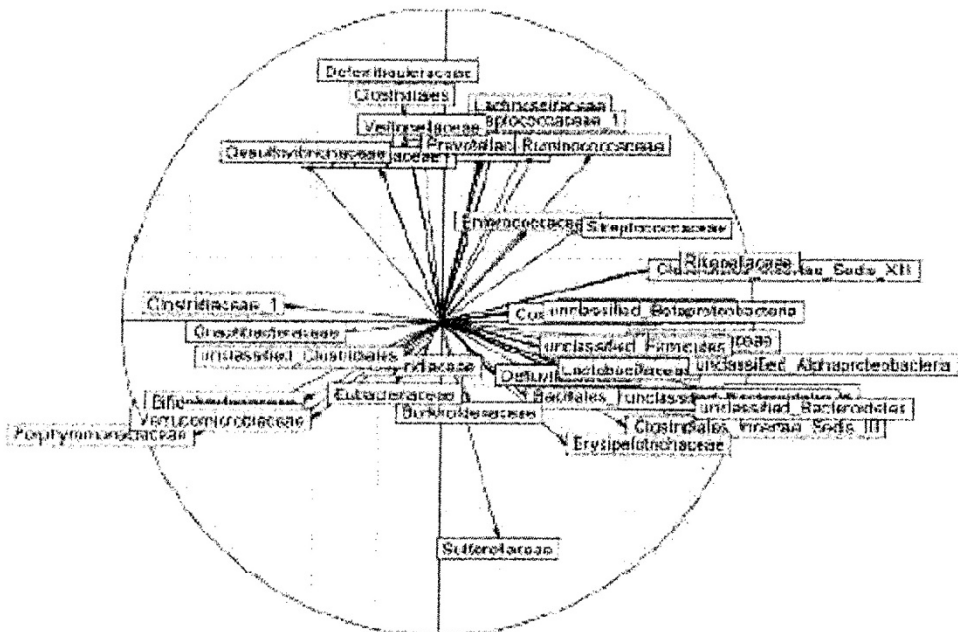
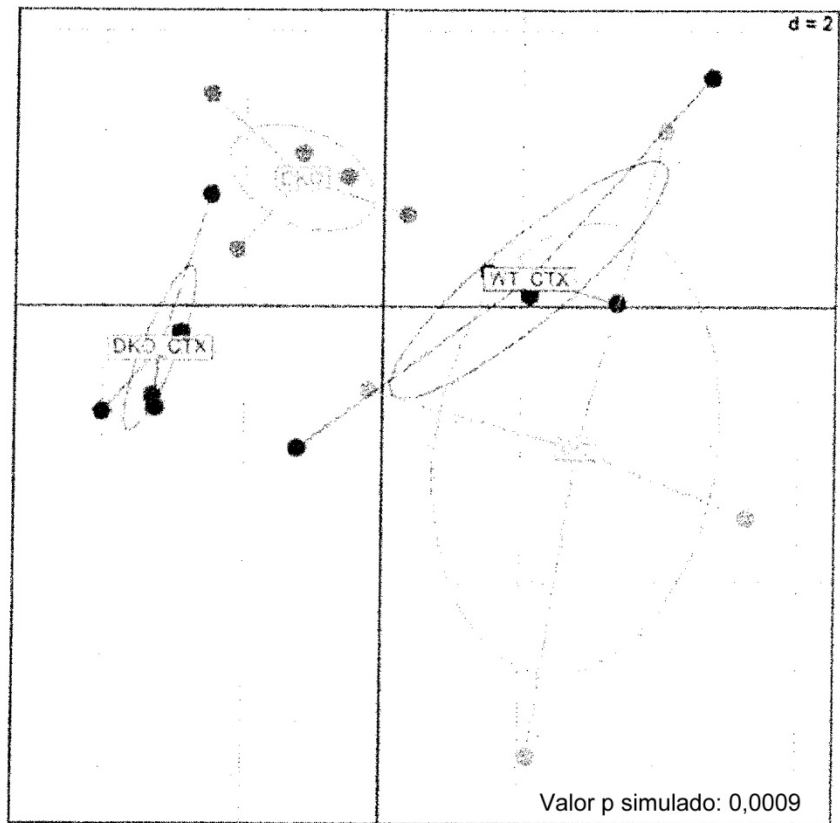


FIGURA 35A

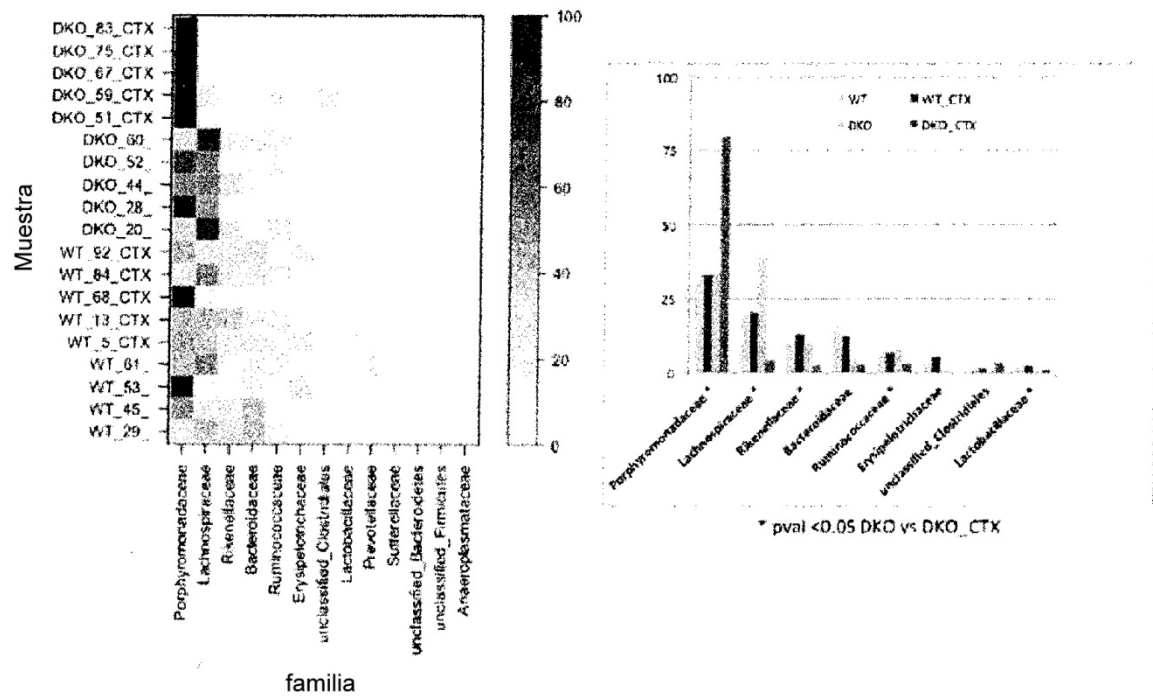


FIGURA 35B

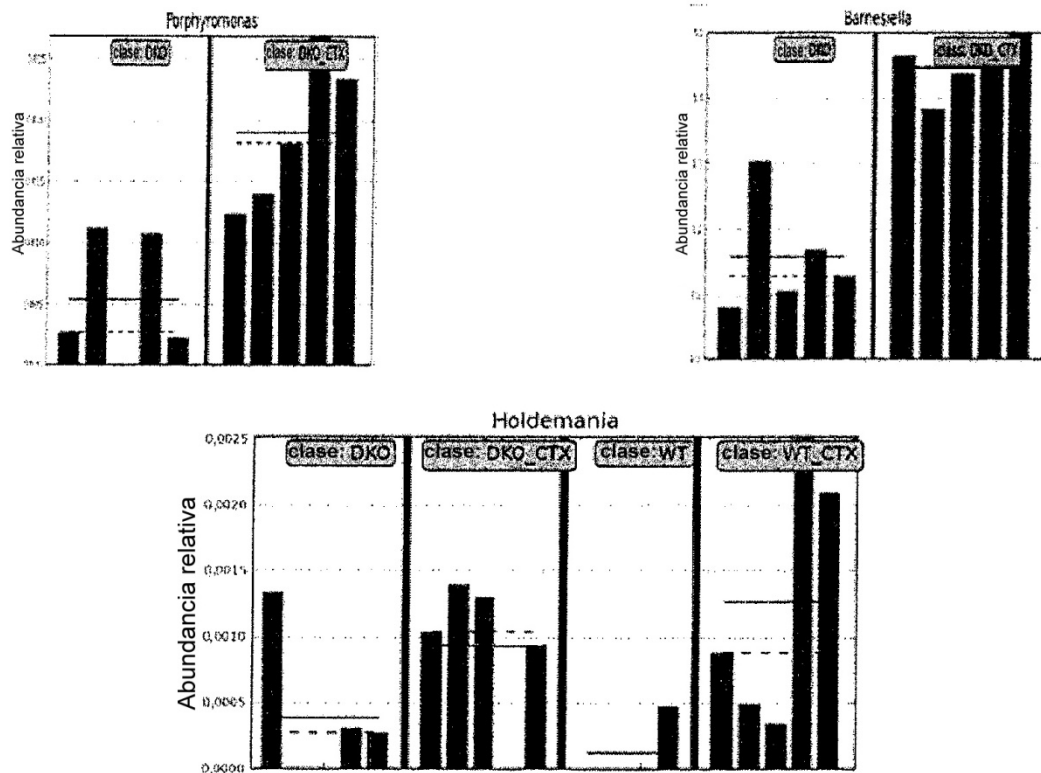


FIGURA 35C

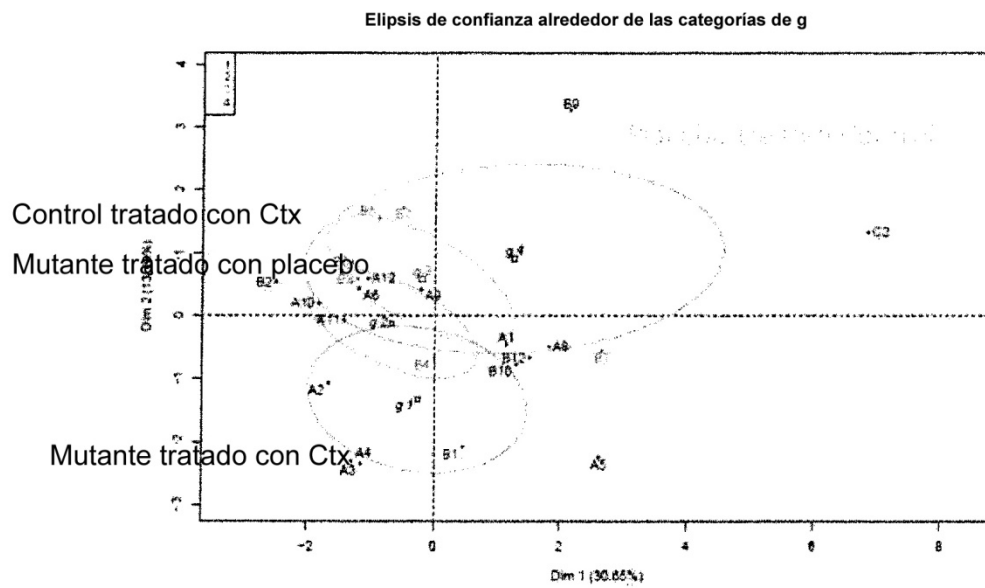
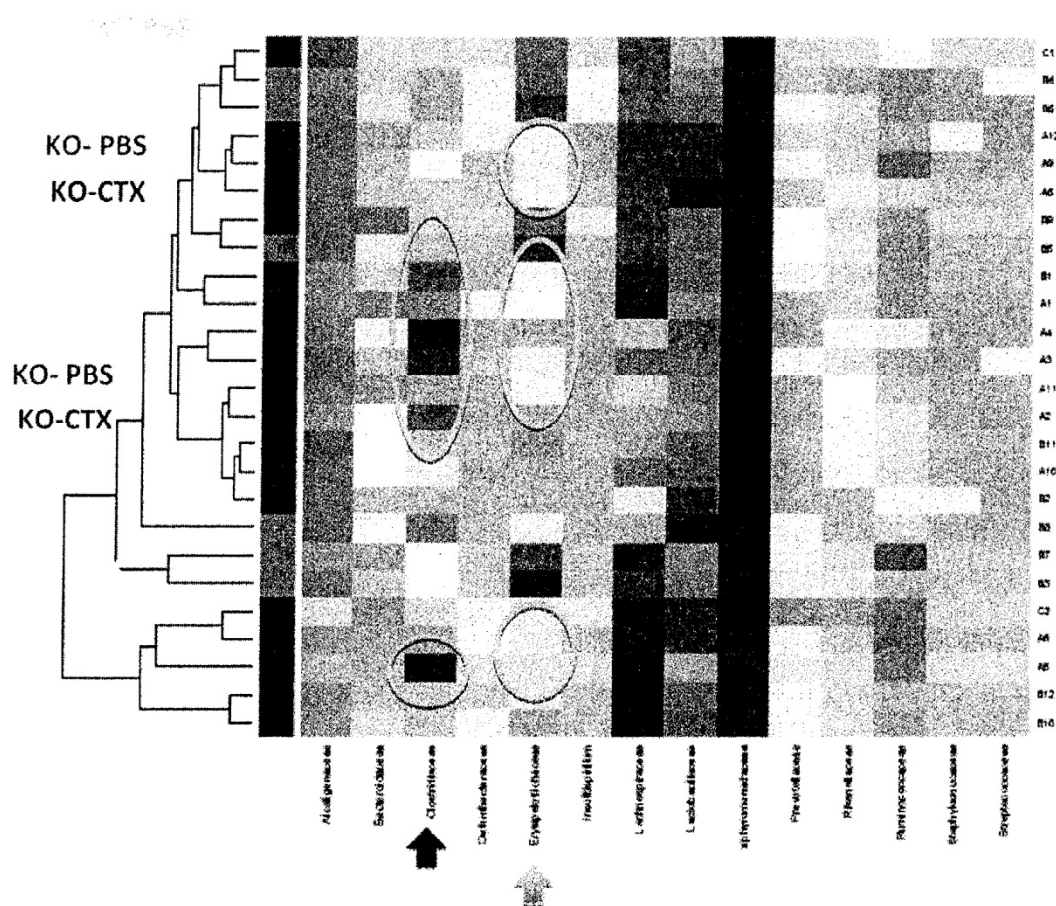
**FIGURA 36A**

FIGURA 36B

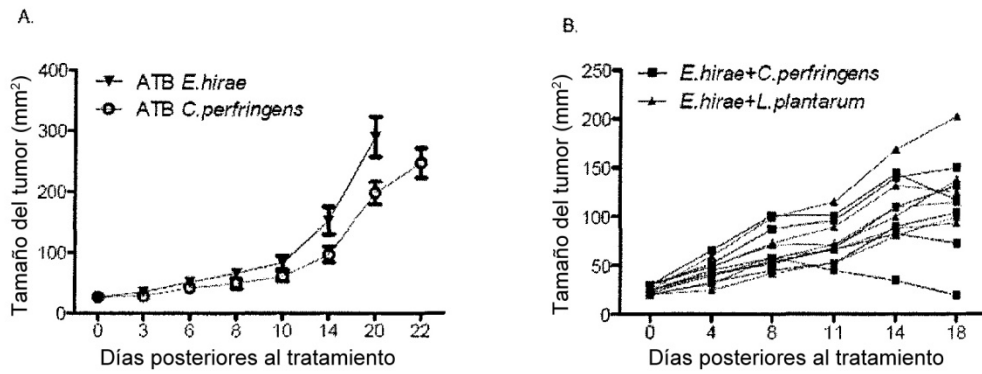


FIGURA 37

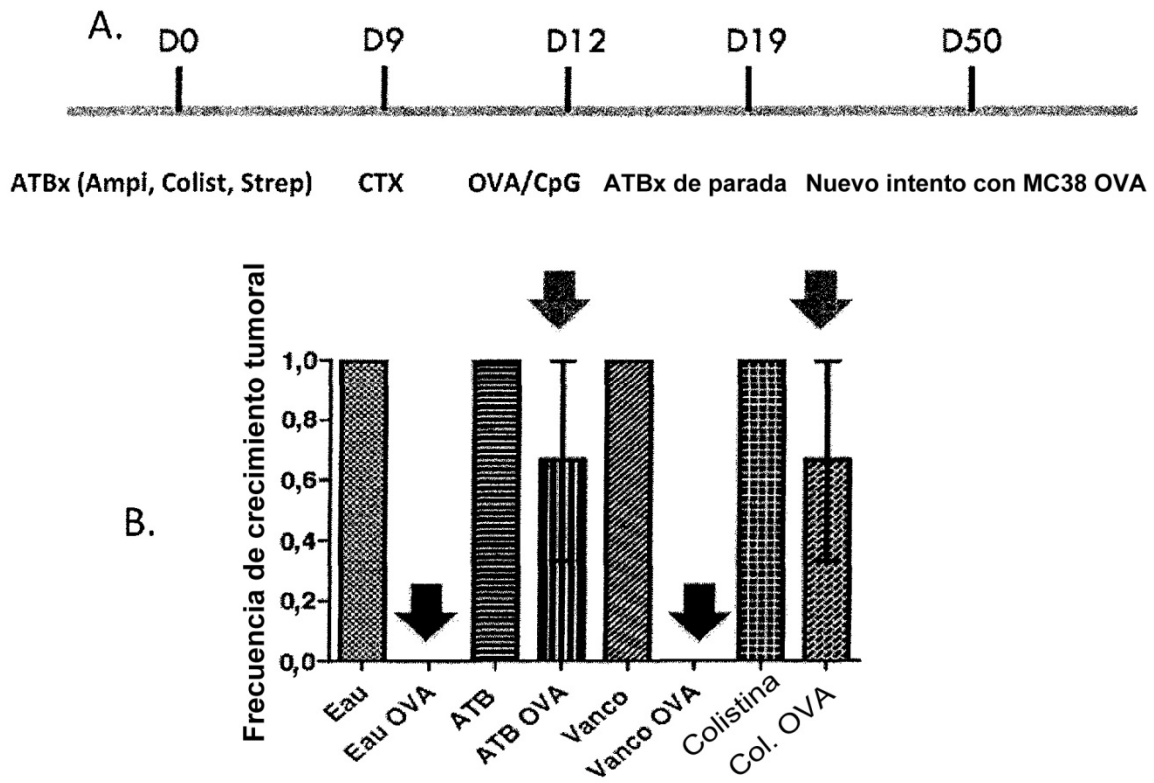


FIGURA 38

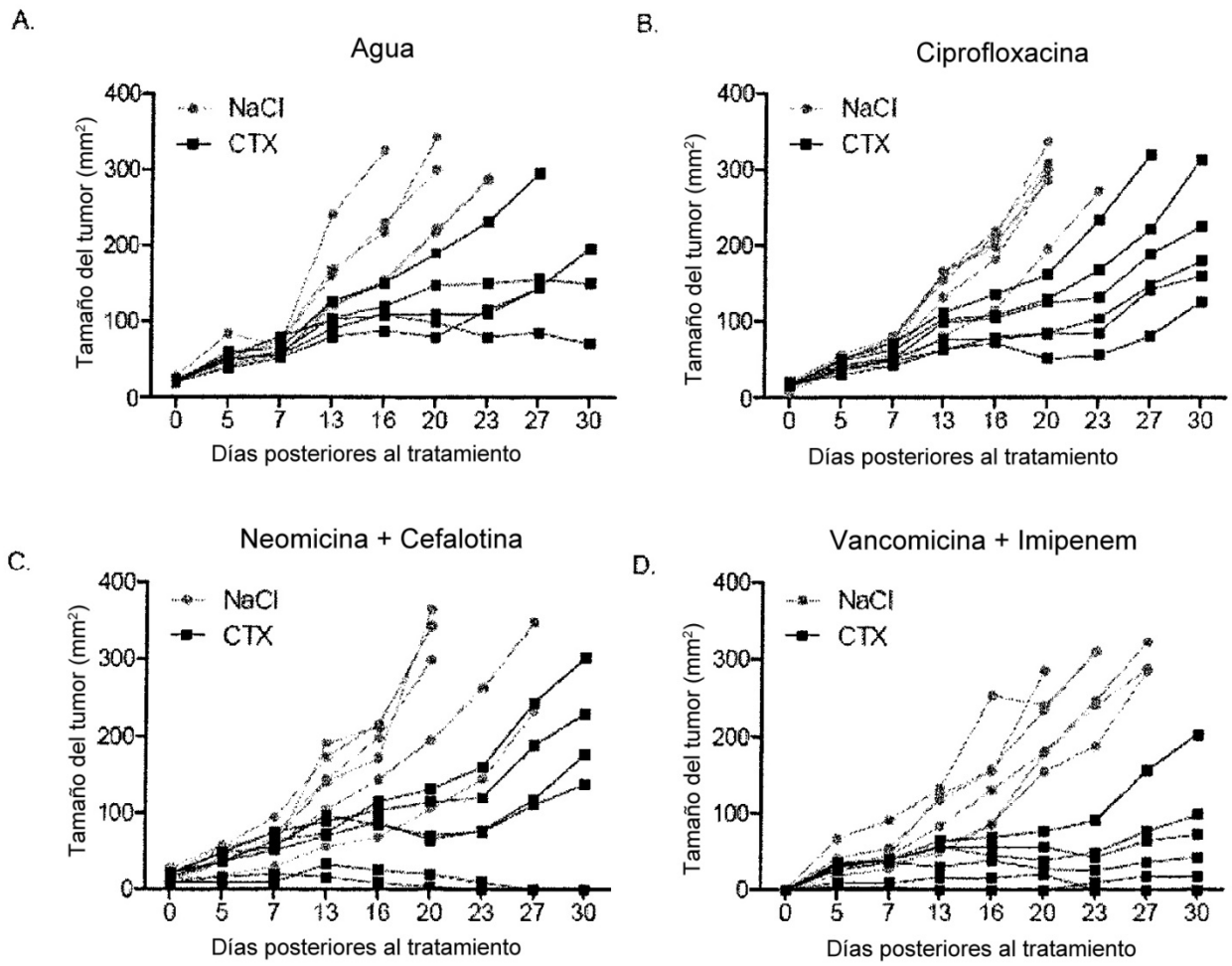


FIGURA 39