(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 582 932**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012** **E 12775538 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2763685**

(54) Título: **Bacterias para uso como un probiótico para aplicaciones médica y nutricional**

(30) Prioridad:

07.10.2011 GB 201117313

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2016

(73) Titular/es:

4D PHARMA RESEARCH LIMITED (100.0%)
Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road
Aberdeen AB25 2ZS, GB

(72) Inventor/es:

KELLY, DENISE y
MULDER, IMKE

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 582 932 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).

Bacterias para uso como un probiótico para aplicaciones médica y nutricional

Descripción

[0001] Este invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* y sus varios usos nutricionales y terapéuticos.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

[0002] El intestino humano, el cual se pensaba inicialmente que era estéril en el útero, está expuesto a una amplia variedad de microbios maternales y medioambientales inmediatamente después del nacimiento. La colonización subsiguiente y eventos sucesivos en los intestinos permanece siendo algo dinámico durante el primer año de vida, después del cual la microbiota se vuelve parecida a la adulta y relativamente estable (1). La microbiota humana contiene más de 500 filotipos diferentes que pertenecen esencialmente a 2 divisiones bacterianas importantes, los bacteroidetes y las firmicutes (2). Las relaciones simbióticas exitosas que surgen de colonizaciones bacterianas de los intestinos humanos ha generado una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales, protectoras y beneficiarias de otros tipos. Las actividades metabólicas mejoradas del intestino colonizado aseguran que los componentes dietarios, que de otra forma serían indigeribles, sean degradados con subproductos liberados suministrando una fuente nutricional importante para el anfitrión. Asimismo, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es bien reconocida y ejemplificada en animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunológico deshabitado que es reconstituido funcionalmente siguiendo la introducción de las bacterias comensales (3-5).

[0003] En un contraste drástico a la producción de IgA intestinal secretoria que es influenciada por la colonización microbiana per se (6, 7), el desarrollo y la diferenciación de células T parece requerir la colonización de microorganismos comensales específicos. La especie clostridium, en particular la bacteria filamentosa segmentada (SFB - segmented filamentous bacteria) que forma esporas, parece ser un controlador importante para la maduración de Th1, Th17 y Tregs intestinales (8, 9). Estudios recientes, sin embargo, han mostrado ahora que otras bacterias intestinales incluyendo a aquellas de la flora alterada de Schaedler pueden inducir a la generación desde cero de Tregs mientras que la mono-colonización con *Bacteroides fragilis* pueden corregir los desbalances de Th1/Th2 en ratones libres de gérmenes al promover la expansión de Tregs (5, 10).

[0004] Este invento busca elucidar a otras bacterias intestinales residentes que pueden regular la actividad metabólica en el intestino y/o jugar un rol en los procesos inmunoregulatorios.

DECLARACIÓN DEL INVENTO

[0005] Este invento se centra en la actividad de la especie bacteriana Roseburia hominis, un miembro de los Firmicutes phylum. Estudios realizados por la persona que está presentando esta aplicación han demostrado que esta especie bacteriana juega una parte importante en la inmunorregulación y en la actividad metabólica en los intestinos, y tiene un efecto en los genes del apetito y del hambre. Los roles de los genes bacterianos que participan en la colonización y en la adaptación a los intestinos bovinos, así como los genes anfitriones que responden a la colonización por esta bacteria son descritos en mayor detalle más adelante.

[0006] Aspectos del invento, junto con las secciones preferidas, se establecen en las reivindicaciones acompañantes.

[0007] Un primer aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la regulación del sistema neurológico de un sujeto.

[0008] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inmunológica y un trastorno intestinal.

[0009] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la promoción de la salud intestinal al restaurar la homeostasis inmunológica.

[0010] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la mejora de la microbiota intestinal en un sujeto.

[0011] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la regulación del sistema inmunológico innato de un sujeto.

[0012] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la regulación del sistema inmunológico adaptivo de un sujeto.

[0013] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la promoción de Tregs y tolerancia inmunológica de un sujeto.

[0014] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso en la medicina.

[0015] Otro aspecto de este invento se refiere a la composición farmacéutica que comprende a la especie bacteriana *Roseburia hominis* y a un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0016] Otro aspecto de este invento se refiere a un suplemento nutricional conformado de la especie bacteriana *Roseburia hominis* y un excipiente, portador o diluyente nutricionalmente aceptable.

[0017] Otro aspecto del invento se refiere a una composición probiótica que comprende a la especie bacteriana *Roseburia hominis*.

[0018] Otro aspecto del invento se refiere a un pienso, producto alimenticio, suplemento nutricional, suplemento dietario o un aditivo de comida que comprende a la especie bacteriana *Roseburia hominis.*

[0019] Otro aspecto del invento se refiere a un proceso para producir a una composición farmacéutica de acuerdo al invento, donde dicho proceso comprende la mezcla de la especie bacteriana *Roseburia hominis* junto con un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0020] Otro aspecto del invento se refiere a un proceso para producir a un suplemento nutricional de acuerdo al invento, donde dicho proceso comprende la mezcla de la especie bacteriana *Roseburia hominis* junto *c*on un excipiente, portador o diluyente nutricionalmente aceptable.

[0021] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para su uso para mantener la homeostasis inmunológica en un sujeto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

[0022] Tal como se mencionó anteriormente, un aspecto del invento se refiere a *Roseburia hominis* para su uso en uno o más de:

- el tratamiento de una enfermedad inmunológica;
- el tratamiento de una enfermedad intestinal;
- la mejora de la microbiota intestinal;
- la regulación del sistema inmunológico innato de un sujeto;
- la regulación del sistema inmunológico adaptivo de un sujeto;
- la promoción de Tregs y de la tolerancia inmunológica;
- la promoción de la salud intestinal en un sujeto; y/o
- el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en un sujeto.

Roseburia hominis

[0023] La *Roseburia hominis,* un anaerobio intestinal comensal que fue descrito recientemente de la agrupación filogenética XIVa dentro del Firmicutes phylum, pertenece a un grupo dominante de bacterias en el intestino humano y también es un productor importante de butirato (11). Los inventores de este invento han elucidado la secuencia genómica completa y los comentarios para esta bacteria. Estudios adicionales investigaron a la bacteria y a las respuestas de transcriptomas del anfitrión en ratones libres de gérmenes mono - colonizados con el R. Hominis. Los roles de los genes bacterianos participantes en la colonización y adaptación al intestino de ratones, así como los genes anfitriones que responden a la colonización por estas bacterias se describen en este documento.

[0024] Experimentos por las personas que están haciendo esta aplicación han demostrado que la actividad de la Roseburia hominis es altamente específica. Los estudios han demostrado que genomas importantes de la especie Roseburia son muy diferentes, indicando funcionalidades diversas. En efecto, los experimentos han demostrado que las bacterias de la agrupación clostridium XIVa, incluyendo a las especies bacterianas *Roseburia intestinalis, Roseburia hominis* y *Eubacterium rectale* (todas las cuales son productoras de butirato) inducen sorpresivamente efectos muy diferentes y distintos en las células intestinales.

[0025] En una sección preferida, la especie bacteriana es la cepa depositada bajo los términos del Tratado de Budapest de Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales, Alimenticias y Marinas (NCIMB – Budapest Treaty at National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria) en NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Reino Unido, AB21 9YA, el 21 de octubre de 2004 a nombre de Rowett Research Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen, Greenburn Road, Aberdeen, AB21 9SB, Escocia, Reino Unido, bajo el número de acceso NCIMB 14029T Roseburia hominis A2-183T (DSM = 16839T).

[0026] La especie bacteriana es preferiblemente la Roseburia hominis tal como se describe en Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T. B., & Flint, H. J. (2006) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2437-2441.

[0027] En una sección preferida, la especie bacteriana está en la forma de una población bacteriana viva, una población bacteriana liofilizada, y una preparación bacteriana no viable, o sus componentes celulares. Preferiblemente, en los casos en que la especie bacteriana está en la forma de una preparación bacteriana no viable, esta es seleccionada de bacterias matadas por el calor, bacterias irradiadas y bacterias lisadas.

[0028] En una sección importante, la especie bacteriana está en la forma de bacterias vivas o en sus componentes celulares.

[0029] En una sección importante, las especies bacterianas están en una forma aislada. Tal como se utiliza en este documento, el término “aislada” se refiere a que está aislada de su entorno nativo.

[0030] En una sección importante, la especie bacteriana está en una forma biológicamente pura. Tal como se utiliza en este documento, el término “biológicamente pura” se refiere a un cultivo de laboratorio que es sustancialmente libre de otras especies de organismos. Preferiblemente, la especie bacteriana está en la forma de un cultivo de una sola especie de organismo.

[0031] El invento también abarca el uso de mutantes de la especie bacteriana o de las cepas aquí descritas. Tal como se utiliza aquí, el término “mutante” incluye a cepas bacterianas derivadas que tienen por lo menos un 93% de homología, preferiblemente por lo menos un 96% de homología, más preferiblemente un 98% de homología con la secuencia de polinucleótidos de una cepa referencial, pero que contiene mutantes de otra forma en otras secuencias en el genoma bacteriano. Los mutantes pueden ser obtenidas por medio de técnicas de diseño genético que inducen alteraciones al material genético de las cepas del invento o que inducen una recombinación del material genético de las cepas del invento con otras moléculas. Comúnmente, para obtener a dichas cepas mutantes, una persona con conocimiento en la industria puede utilizar técnicas estándar de mutagénesis tales como radiación ultravioleta o exposición a productos químicos mutagénicos.

[0032] Tal como se utiliza en este documento, el término “mutaciones” incluye a mutaciones naturales o inducidas que comprenden alteraciones de por lo menos una sola base incluyendo eliminaciones, inserciones, sustituciones y otras modificaciones conocidas para aquellas personas con conocimiento en la industria, incluyendo a modificaciones genéticas introducidas a una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos padres mientras se mantiene por lo menos el 50% de homología con la secuencia madre. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones tiene por lo menos un 60%, más preferiblemente por lo menos un 75%, más preferiblemente a un 85% de homología con la secuencia madre. Tal como se utiliza en este documento, la “homología” secuencial puede determinarse utilizando técnicas estándar conocidas para aquellas personas con conocimiento en la industria. Por ejemplo, la homología puede determinarse utilizando el programa “BLAST” de algoritmo de homología en línea, disponible públicamente en http)://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

[0033] El invento también abarca el uso de homólogos de la especie bacteriana o de las cepas aquí descritas. Tal como se utiliza en este documento, el término “homólogos” se refiere a una cepa bacteriana que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un nivel de identidad secuencial u homología secuencial con la secuencia de nucleótidos de la cepa bacteriana madre (referido en este documento desde este punto como una “secuencia homóloga”). Aquí, el término “homólogo” se refiere a una entidad que tiene cierta homología con la secuencia de nucleótidos del sujeto. En este documento, el término “homología” puede ser equivalente a “identidad”.

[0034] En este contexto, una secuencia homóloga es tomada para incluir a una secuencia de nucleótidos que podría ser por lo menos un 50, un 60, un 70, un 75, un 80, un 85 o un 90% idéntica, preferiblemente por lo menos un 95%, un 97%, un 98% o un 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la cepa bacteriana madre (la secuencia sujeto).

[0035] Comparaciones de homología pueden conducirse visualmente o más usualmente junto con la ayuda de programas de comparación secuencial que son fáciles de encontrar. Estos programas informáticos que pueden encontrarse comercialmente pueden calcular la homología porcentual entre 2 o más secuencias.

[0036] La homología porcentual puede ser calculada para secuencias contiguas, es decir, una secuencia desalineada con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia es comparado directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto es llamado una alineación “sin vacíos”. Comúnmente, aquellas alineaciones sin vacíos son realizadas únicamente en un número relativamente corto de residuos.

[0037] Aunque esto es un método muy simple y consistente, no puede tomar en cuenta que, por ejemplo, en una pareja de secuencias que de otra forma serían idénticas, una inserción o eliminación causaría que los siguientes residuos de aminoácidos salgan de su alineación, potencialmente, por lo tanto, resultando en una reducción importante en la homología porcentual cuando se realiza una alineación global.

[0038] El cálculo de la homología porcentual máxima requiere, por lo tanto, primeramente, la producción de una alineación óptima, tomando en consideración penalidades por vacíos. Un programa informático adecuado para ejecutar aquella alineación es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Ejemplos de softwares que pueden realizar comparaciones secuenciales incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (refiérase a Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology (Protocolos Cortos de Biología Molecular)), 4ª Ed -capítulo 18), BLAST 2 (refiérase a FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX por ejemplo. Por lo menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (refiérase a Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a la 7-60).
Preferiblemente, el nivel de identidad en relación a una secuencia de nucleótidos es determinada para por lo menos 20 nucleótidos contiguos, preferiblemente para por lo menos 30 nucleótidos contiguos, preferiblemente para por lo menos 40 nucleótidos contiguos, preferiblemente para por lo menos 50 nucleótidos contiguos, preferiblemente para por lo menos 60 nucleótidos contiguos, preferiblemente para por lo menos 100 nucleótidos contiguos. Preferiblemente, el nivel de identidad en relación a una secuencia de nucleótidos podría determinarse para toda la secuencia.

[0039] La identificación tradicional de bacterias en base a las características fenotípicas generalmente no es precisa como la identificación que se basa en los métodos fenotípicos. La comparación de la secuencia genética bacteriana de 16S ARNr ha emergido como una técnica genética preferida y permite que las cepas sean identificadas por medio de la comparación de secuencias con secuencias conocidas de ADN bacteriano utilizando a BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.giov/Blast.cgi). La secuencia genética 16S ARNr es universal en las bacterias, así que las relaciones pueden ser medidas a lo largo de muchas bacterias diferentes. En general, la comparación de la secuencia 16S ARNr permite la diferenciación entre organismos a nivel de tipos a lo largo de todos los filos importantes de bacterias, adicionalmente al clasificar las cepas en varios niveles, incluyendo a nivel de especies y subespecies. La secuencia genética 16S ARNr ha sido determinada para varias cepas. El GenBank (Banco Genético), el banco de datos más grande de secuencias de nucleótidos, tiene más de 20’000.000 de secuencias depositadas, de las cuales más de 90.000 son genes 16S ARNr. Eso significa que muchas secuencias previamente depositadas existen en relación a las cuales la secuencia de una cepa desconocida podría ser comparada.

[0040] Tal como se utiliza en este documento, el término “identidad 16S ARNr” se refiere a la identidad porcentual con una cepa bacteriana conocida. En una sección preferida, la cepa bacteriana tiene una identidad 16S ARNr de por lo menos el 99.5 por ciento con la cepa depositada bajo el número de acceso ya mencionado.

[0041] El invento también abarca a cepas mutantes, que pueden ser obtenidas de la cepa depositada ya mencionada, y cepas que exhiben una homología ADN-ADN de por lo menos el 70% y/o una identidad 16S ARN de por lo menos el 99.5 por ciento con la cepa depositada bajo el número de acceso ya mencionado.

[0042] En el contexto de este invento, el término “homología ADN-ADN” se refiere a cuán de cerca están relacionados 2 o más cepas separadas de ADN entre sí, basándose en sus secuencias de nucleótidos. Comúnmente, esto es medido en los términos de su identidad porcentual. En una sección preferida, la cepa bacteriana tiene una homología ADN-ADN de por lo menos el 70% con la cepa depositada bajo el número de acceso ya mencionado.

[0043] En una sección altamente preferida, la cepa bacteriana tiene una homología ADN-ADN de por lo menos el 70% y una identidad 16S ARNr de por lo menos el 99.5 por ciento con la cepa depositada bajo el número de acceso ya mencionada.

Aplicaciones terapéuticas

[0044] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana R. Hominis para su uso en la medicina.

[0045] Más particularmente, la especie bacteriana Roseburia hominis es para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inmunológica y un trastorno intestinal en un sujeto.

[0046] Tal cómo se utiliza en este documento, el término “medicamentos” abarca a medicamentos para su uso en humanos y en animales en la medicina humana y veterinaria. Adicionalmente, el término “medicamento” tal como se utiliza en este documento significa cualquier sustancia, que suministra un efecto terapéutico y/o beneficioso. El término “medicamento” tal como se utiliza en este documento no se limitan necesariamente a sustancias, que necesitan una aprobación de comercialización, pero podrían incluir a sustancias que, pueden ser utilizadas en cosméticos, nutracéuticos, comida (incluyendo comidas y bebidas, por ejemplo), cultivos probióticos, suplementos nutricionales y remedios naturales. Adicionalmente, el término “medicamento” tal como se utiliza en este documento abarca a un producto diseñado para la incorporación en alimentos animales, por ejemplo, en alimentos de ganado y/o comida para mascotas.

[0047] En una sección preferida del invento, la enfermedad es seleccionada del síndrome de intestinos irritables (IBS - irritable bowel syndrome), colitis, la enfermedad de intestinos inflamatorios (IBD - inflammatory bowel

disorder), incluyendo a la enfermedad de Crohn y a colitis ulcerativa, pouchitis, dispepsia funcional, constipación funcional, diarrea funcional (incluyendo a diarrea asociada con antibióticos, diarrea de viajantes y diarrea pediátrica), dolores abdominales funcionales, gases abdominales funcionales, el síndrome de dolor epigástrico, el síndrome de estrés postprandial, la enfermedad de reflujo gastrointestinal (GERD - gastrointestinal reflux disease), enfermedades autoinmunes tales como la diabetes, la artritis, la esclerosis múltiple y alérgicas de soriasis, enfermedades utópicas, por ejemplo, la dermatitis atópica, la enterocolitis necrotizante, otras infecciones, y sus combinaciones.

[0048] En una sección particularmente preferida, la enfermedad es un trastorno inflamatorio. Preferiblemente, la expresión de genes pro-inflamatorios es regulada-reducida en el sujeto anfitrión. Detalles adicionales de estos estudios se presentan más adelante.

[0049] Más preferiblemente, el trastorno inflamatorio es colitis, y aún más preferiblemente, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa o la pouchitis.

[0050] En una sección particularmente preferida, el trastorno intestinal es IBS. La fisiopatología precisa de IBS sigue siendo pendiente de ser elucidada. Estudios recientes han descrito a la inflamación de la mucosa y alteraciones de la mucosa en la microbiota intestinal en pacientes con IBS y existe una correlación de la enfermedad con las infecciones intestinales.

[0051] En una sección particularmente preferida, la enfermedad intestinal es un IBD. Preferiblemente, la expresión de genes barrera es mejorada en el sujeto anfitrión. Detalles adicionales de estos estudios se presentan más adelante.

[0052] En una sección particularmente preferida, la enfermedad intestinal es la enfermedad de Crohn.

[0053] En una sección particularmente preferida, la enfermedad es una enfermedad inmunológica. Preferiblemente, la enfermedad inmunológica es seleccionada de colitis ulcerativa, pouchitis, otras condiciones autoinmunes incluyendo a la artritis reumatoide, la psoriasis, la esclerosis múltiple, alergias, incluyendo a la enfermedad celíaca, la dermatitis atópica y la rinitis.

[0054] En una sección, la especie bacteriana Roseburia hominis es usada para regular el sistema inmunológico de un sujeto. Se conoce que la regulación inmunológica por especies bacterianas es altamente específica en lo que se refiere a especies (8). En particular, el efecto regulatorio neurológico de las bacterias de las agrupaciones XIVa y VI es muy complicado, e independiente de la producción de butirato (41).

[0055] En una sección importante, el sistema inmunológico innato del sujeto es modulado.

[0056] En otra sección importante, el sistema inmunológico adaptivo del sujeto es modulado hacia una regulación inmunológica (y no una activación inmunológica, por lo tanto, reduciendo la inflamación).

[0057] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana Roseburia hominis para mejorar la microbiota intestinal en un sujeto.

[0058] La microbiota intestinal se refiere a microorganismos que viven en la tráquea digestiva de los animales anfitriones. Estos microorganismos realizan una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales, protectoras y beneficiosas de otro tipo. Tal como se utiliza en este documento, el término “mejorar la microbiota intestinal” se refiere a incrementar el número y/o el tipo de microorganismos presentes en el intestino de un anfitrión y/o incrementar la actividad de dichos microorganismos en los términos de sus funciones metabólicas, estructurales, protectoras y beneficiosas de otro tipo.

[0059] Preferiblemente, la Roseburia hominis coloniza el colon y/o el íleon, más preferiblemente el colon.

[0060] En una sección importante, la Roseburia hominis regula la expresión de por lo menos un agente de movilización o de quimiotaxis.

[0061] Más preferiblemente, la Roseburia hominis regula-incrementa la expresión de por lo menos un agente de movilización o de quimiotaxis. Más preferiblemente aún, el gen de movilización o de quimiotaxis es seleccionado de *MobA* y *MobL.*

[0062] En otra sección preferida, la *Roseburia hominis* regula la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *FlaA1, FlaA2, Fla3* y *FlaB.*

[0063] Anticuerpos séricos específicos para las proteínas de tipo FLA están presentes en la enfermedad intestinal inflamatoria. Por lo tanto, en una sección importante, la Roseburia hominis es utilizada para el tratamiento de una enfermedad intestinal inflamatoria.

[0064] En otra sección importante, la Roseburia hominis regula la expresión de uno o más de lo siguiente: la acetiltransferasa de acetil-CoA, la deshidrogenasa de 3-hidroxiacil-CoA, la deshidrogenasa de butiril-CoA, la subunidad beta de flavoproteína de transferencia de electrones, y la subunidad alfa de flavoproteína de transferencia de electrones.

[0065] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana *Roseburia hominis* para regular el sistema inmunológico innato de un sujeto.

[0066] Tal como se utiliza en este documento, el término “sistema inmunológico innato”, también conocido como el sistema inmunológico no específico, comprende a las células y mecanismos que suministran al anfitrión con una defensa inmediata en contra de infecciones por otros organismos en una forma no específica. Esto significa que las células del sistema innato reconocen y responden a patógenos en una forma genérica, pero a diferencia del sistema inmunológico adaptivo, nos otorga una inmunidad a largo plazo o protectora al anfitrión.

[0067] Tal como se utiliza en este documento, el término “regular al sistema inmunológico innato” significa inducir la actividad del sistema inmunológico innato, y/o incrementar el nivel de actividad en relación al nivel de la línea base de la actividad de tal forma que se promueve la homeostasis inmunológica.

[0068] La pérdida o la desregulación de la función inmunológica innata, ya sea por la pérdida de la barrera epitelial, de péptidos inmunológicos innatos tales como las defensinas, las quinasas y las citocinas o la señalización TLR defectuosa son asociadas con un riesgo incrementado de enfermedades inflamatorias, en algunos órganos corporales incluyendo el intestino. Aquellas enfermedades incluyen a la enfermedad intestinal inflamatoria. Por lo tanto, en una sección altamente preferida, la Roseburia hominis es utilizada en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria.

[0069] En una sección preferida, la Roseburia hominis regula la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *Tlr5, Tlr1, Vnn1, Defb37, Pla2g, Muc16, ltln, Sprr1a, Cldn4, Pmp22, Crb3, Magi3, Marveld3, Mpp7, Defcr20, Pcgf2, Ltbp4, Igsf8* y *Tcfe2a.* Muchos de estos genes son genes de la barrera intestinal y son antimicrobianos y por lo tanto funcionan para reducir la invasividad de los patógenos intestinales y también reduce el número de patógenos viables.

[0070] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana Roseburia hominis para regular el sistema inmunológico adaptivo de un sujeto.

[0071] Tal como se utiliza en este documento, el término “sistema inmunológico adaptivo”, conocido de otra forma como el “sistema inmunológico específico” se refiere a células y procesos altamente especializados y sistémicos que eliminan o previenen el crecimiento patogénico. La respuesta inmunológica adaptiva suministra al sistema inmunológico vertebrado la capacidad de reconocer y recordar a patógenos específicos (para generar inmunidad), y para montar ataques más fuertes cada vez que el patógeno es encontrado.

[0072] Tal como se utiliza en este documento, el término “regular al sistema inmunológico adaptivo” se refiere a inducir la actividad del sistema inmunológico adaptivo, y/o promover mecanismos homeostáticos inmunológicos al incrementar el nivel de actividad en relación al nivel de la línea base de la actividad. Preferiblemente, el sistema inmunológico adaptivo es modulado hacia la regulación inmunológica (y no la activación inmunológica reduciendo, por lo tanto, la inflamación).

[0073] Defectos y enfermedades asociadas con el sistema inmunológico adaptivo, particularmente relacionadas con la función de las células T, son asociados con muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Las respuestas de las células T asociadas con Th1, Th2 y Th17 son identificadas con enfermedades a tópicas, inflamatorias y autoinmunes. Las terapias que mejoran o incrementan las poblaciones de células regulatorias T (Tregs - T regulatory) son importantes para controlar enfermedades impulsadas por respuestas celulares excesivas de Th1, Th2 y Th17.

[0074] En una sección preferida, la Roseburia hominis activa a por lo menos un gen de respuestas inmunológicas en el colon o en el íleon.

[0075] En una sección preferida, la Roseburia hominis regula el sistema inmunológico adaptivo al modular la expresión de genes asociados con la regulación de las células T, más preferiblemente en el colon. Más preferiblemente, la Roseburia hominis induce a células regulatorias T (Tregs - Tregulatory cells). Un incremento en el número de Tregs combatirá los efectos de otras células T ejecutoras, tal como Th1, Th17 y Th2 que controlan las condiciones de inflamación, autoinmunidad y alérgicas/atópicas. Por lo tanto, esta propiedad de la R. Hominis puede ser aprovechada para abordar muchas enfermedades en las cuales un balance celular Teff/Treg que ha sido perdido, por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa.

[0076] En una sección preferida en particular, la Roseburia hominis regula-incrementa la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *Ly6g6c* y *Ly6g6e* en el colon ascendente.

La reducción de Ly6g6c y ly6g6e incrementa el riesgo de infección, en la tráquea intestinal y respiratoria y se asocia con enfermedades tales como la neutropenia. Por lo tanto, en una sección importante, la Roseburia hominis es para su uso en un tratamiento de la neutropenia.

[0077] Otro aspecto del invento se refiere a la especie bacteriana Roseburia hominis para su uso en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en un sujeto. Tal como se utiliza en este documento, el término "mantener la homeostasis inmunológica" se refiere a la autorregulación del sistema inmunológico del cuerpo para mantener una tolerancia oral o una estabilidad inmunológica en respuesta a las condiciones cambiantes. La tolerancia oral se refiere a las respuestas inmunológicas normales a la comida y a las bacterias comensales en un intestino saludable. Estas se pierden con la enfermedad celíaca y con enfermedades intestinales inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Por lo tanto, en una sección particularmente preferida, la Roseburia hominis es para su uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca y enfermedades intestinales inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa.

[0078] Tal como se utiliza en este documento, el término "regular el apetito" se refiere a la capacidad de modular (es decir, incrementar o reducir) el deseo de un anfitrión de comer alimentos. Preferiblemente, la Roseburia hominis ejerce un efecto estimulatorio en el apetito del anfitrión al regular-reducir la expresión de los genes asociados con la supresión del apetito. Preferiblemente, la Roseburia hominis regula-reduce la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *Agt, Cartpt, Cck, Cxcl12* y *Gcg*. Más preferiblemente, la Roseburia hominis regula-reduce, la expresión de las hormonas de la saciedad *Cck* y *Gcg.*

[0079] La especie bacteriana de acuerdo al invento podría ser utilizada para aplicaciones profilácticas. En las aplicaciones profilácticas, la especie o composiciones bacterianas de acuerdo al invento son administradas a un paciente susceptible, o que de otra forma tiene riesgo de, una enfermedad particular en un monto que es suficiente para reducir por lo menos parcialmente el riesgo de desarrollar una enfermedad. Un monto como ese es definido como "una dosis profilácticamente efectiva". Los montos precisos dependen de un número de factores específicos del paciente tales como el estado de salud del paciente y su masa.

[0080] Este invento es descrito aún más siguiendo las figuras a continuación, donde:

La figura 1 muestra la abundancia y localización de R. Hominis en el colon ascendente. (A) el colon ascendente de ratón colonizado por la R. Hominis que muestra una asociación cercana con la bacteria con el epitelio anfitrión, utilizando una sonda A2-183 FISH. Magnificación original x630. (B) Un PCR utilizando a cebadores específicos de R. Hominis mostró una fuerte señal positiva en la post-colonización de ADN fecal, mientras que las heces de animales GF tuvieron resultados negativos en relación a la presencia de cualquier bacteria. (C) Un análisis PCR en tiempo real que muestra los niveles de colonización de R. Hominis/miligramo de heces.

La figura 2 muestra la secuencia y anotaciones del genoma de la R. Hominis. (A) el mapa de genoma circular de la R. Hominis con la ubicación de los experimentos PCR indicados en las regiones objetivo de los cebadores. Las pistas en el mapa genómico, empezando en la pista exterior 0, son: pista 0-(azul) los experimentos PCR en tiempo real son indicados por marcas de momentos numerados; pista 1-(celeste) CDS hacia delante; pista 2-(celeste) CDS en reversa; pista 3-(azul) ARNr; pista 4-(verde) ARNt; pista 5-(rojo) regiones que marcan a STS dirigidas por PCRs en tiempo real; gráfico 1-contenido GC; gráfico 2-parcialidad GC. (B) anotación funcional del genoma R. Hominis.

La figura 3 identifica a transcripciones expresadas diferencialmente en la R. Hominis después de la colonización y adaptación en el intestino de los ratones. (A) el ARN bacteriano fue aislado de contenidos del intestino ciego de ratones, marcados con dCTP-Cy3 o dCTP-Cy5 durante la síntesis de la ADNc e hibridada a diapositivas de microformaciones que se incorporan un intercambio de colorantes. Los datos fueron considerados significativos cuando existió un cambio superior a 2 veces y $P<0.05$. 50 genes expresados diferencialmente (in vivo versus in vitro) fueron descubiertos por el análisis de la microformación. (B) la validación PCR en tiempo real de los genes involucrados en la transferencia de conjugación/movilización. (C) la validación PCR en tiempo real de los genes involucrados en la motilidad y quimiotaxis. (D) Western blot de los contenidos del intestino ascendente inmuno-manchados con anticuerpos Fla2 purificados en lo que se refiere a su afinidad en 14d (línea uno: escalera, líneas 2-6: contenidos intestinales de los animales 1-5, líneas 7-8: vacías, líneas 9-10: biomasa de R. Hominis (control positivo)). La imagen de R. Hominis mostrando a flagelos (flechas negras) y (E) validación PCR en tiempo real de los genes involucrados en el metabolismo del butirato. (Efe) análisis PCR en tiempo real de las transcripciones de R. Hominis durante su exposición in vitro a células epiteliales intestinales. Los resultados del PCR en tiempo real son las medias de los triplicados, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

La figura 4 identifica a transcripciones expresadas diferencialmente en el intestino de ratones después de su mono-asociación con R. Hominis. (A) Un análisis de micro ensayos Affymetrix de genes expresados diferencialmente de ratones colonizados por R. Hominis en relación a GF. Los gráficos de barras representan el número de genes superiores e inferiores expresados después de 14 y 28 días. (B) Un mapa

de calor generado a partir de genes expresados diferencialmente con significancia funcional-entre ratones GF y colonizados por R. Hominis a los 14 y 28 días. Las columnas representan a formaciones individuales, y las columnas a genes específicos de interés. El puntaje Z describe una medida de distancia, en desviaciones estándar, que se aleja de la media. El valor relativo para cada gen es descrito por su intensidad de color, con el color verde indicando una expresión más alta y el rojo describiendo una expresión más baja. (C) La validación PCR en tiempo real de genes que demostraron ser significativamente diferentes entre los ratones colonizados por R. Hominis y GF. Los resultados PCR en tiempo real son las medias de los triplicados, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

La figura 5 muestra la expresión y localización de marcadores de células T en el colon. La inmunofluorescencia y el análisis de células de lámina propia con anti-Ly6G (A), anti-CD3 (B) y anti-CD11b (C) en lámina propia de ratones GF y ratones tratados con R. Hominis. *P<0.05.

La figura 6 muestra los efectos antiinflamatorios de R. Hominis en un modelo experimental de colitis. A los ratones IL-10KO se les administraron dosis 3 veces a la semana durante 14 semanas. (A) Los ratones IL-10KO no tratados tuvieron una alta elevación de todos los genes en comparación a los ratones de tipo silvestre, mientras que la expresión genética diferencial fue inferior en animales tratados con R. Hominis. Los resultados PCR en tiempo real son las medias de los las triplicas, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. (B) Las masas corporales de los animales IL-10KO no tratados e IL-10KO tratados con R. Hominis al final del estudio. (C) Colon ascendente (manchado con hematoxilina/eosina) de animales IL-10KO y animales IL-10KO tratados con R. Hominis. Magnificación original x100.

La figura 7 muestra un análisis PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de IL-10, IL-17 y IFN-γ. El PCR en tiempo real fue realizado en tejidos de colon ascendente para la medición de los marcadores de las células T. Los resultados PCR en tiempo real son las medias de las triplicas, *P<0.05, **P<0.01.

La figura 8 muestra los efectos de la mono-asociación de ratones GF con R. Hominis en la composición de la masa corporal. Se realizó el análisis de la masa corporal y del armazón de lípidos en seco. (A) Las masas de las carcasas secas de los ratones asociados con R. Hominis fueron significativamente más pesados en comparación con los animales GF. (B) Análisis adicionales de lípidos de la carcasa mostraron que la adiposidad total también fue significativamente más alta en animales tratados con R. Hominis en el día 14.

La figura 9 ilustra una comparación de la información de expresión genética para 3 cepas de bacterias provenientes de la agrupación XIVa (firmicutes), en específico la Roseburia hominis, la E. rectale y Roseburia intestinalis.

La figura 10 muestra que la Roseburia hominis induce a A20, un regulador negativo de la señalización NF-κB con una actividad anti-inflamatoria potente, mientras que otras cepas bacterianas no tienen efectos. La partícula flagelina de la Roseburia hominis (FLA1 de la R. Hominis) también induce a A20 a diferencia del *Eubacterium rectale, una bacteria relacionada. En más detalle, la figura 10 muestra* las múltiples veces de inducción de A20 para *E. rectale, R. hominis,* el FLA de *E. rectale,* el FLA1 de R. Hominis, EAV9, FLA de SV1400 en relación a los controles.

La figura 11 muestra la distribución categórica de los subsistemas para *R. hominis* A2-183 tal como fue determinado por RAST, mostrando sus sistemas funcionales y el número de genes en cada subcategoría.

La figura 12 muestra la distribución categórica de los subsistemas para R. *inulinivorans* DSM 16841 A2-183 tal como fue determinado por RAST, mostrando a sus sistemas funcionales y al número de genes en cada subcategoría.

La figura1 3 muestra la distribución categórica de subsistemas para *R. intestinalis* L1-82 tal como fue determinado por RAST, mostrando a los subsistemas funcionales y el número de genes en cada subcategoría.

La figura 14 muestra la distribución categórica de subsistemas para *R. intestinalis* M50/1 tal como fue determinado por RAST, mostrando a los subsistemas funcionales y el número de genes en cada subcategoría.

La figura 15 muestra la distribución categórica de subsistemas para *Eubacterium rectale* ATCC 33656 tal como fue determinado por RAST, mostrando a los subsistemas funcionales y el número de genes en cada subcategoría.

R. Hominis coloniza preferencialmente al colon

[0081] Ratones libres de gérmenes (GF - germfree) C3H/HeN adultos saludables fueron inoculados con 3 dispositivos de alimentación de R. Hominis en días consecutivos. La colonización exitosa se logró utilizando un

medio de inoculación que contenía un 3% de ácido ascórbico y un 2% de cisteína para proteger a la bacteria de la exposición al oxígeno. Análisis de tejidos intestinales por medio de hibridación fluorescente in situ (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) revelaron que el R. Hominis colonizó el íleon y el colon, pero se encontraron números mucho más grandes en el colon. También se encontró que las bacterias estaban asociadas de cerca en la mucosa del colon (figura 1A). La colonización fue validada además y cuantificada por medio de PCR utilizando cebadores específicos para R. Hominis con números aproximándose a 1x1010 bacterias/gramo de heces (figura 1B y 1C). Las heces de los animales GF dieron resultados negativos cuando se trató de detectar la presencia de cualquier bacteria.

El genoma de R. Hominis revela a genes únicos que promueven las interacciones del anfitrión

[0082] La secuencia genómica completa del R. Hominis A2-183 fue dilucidada (figura 2A, la cual es representada por un solo cromosoma 3,592, 125-bp (figura 2B). Anotaciones automatizadas y manuales del genoma utilizando a la plataforma RAST revelaron la presencia de 4 operones, y 66 ARNs y 3,273 proteínas pronosticadas. El grupo más grande de genes perteneció a los carbohidratos categóricos de los subsistemas (271 genes), proteínas codificadas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, seguido por metabolismos proteínicos (197) y aminoácidos y derivados (175) (figura 2B). Otras categorías funcionales importantes incluyen a la motilidad y a la quimiotaxis (49) y a la dormancia y la esporulación (12). El análisis genómico comparativo estableció que el pariente más cercano en términos de estructura y función genómica entre los genomas bacterianos completos es el *Eubacterium rectale* (12), lo cual no es sorprendente dado el parentesco taxonómico cercano de estos organismos (11, 13). La reconstrucción comparativa de estos 2 genomas con 1095 genes reveló que estos se diferencian por aproximadamente el 25% de los genes. En particular, estas diferencias abarcaron a genes que codifican a funciones importantes para la interacción con el anfitrión. Por ejemplo, los genes de motilidad y de quimiotaxis que codifican a las proteínas de ensamblaje fimbrial de tipo IV PilB y PilC estuvieron presentes en el *E. rectale* pero estuvieron ausentes en el R. Hominis mientras que la proteína de filamentos de cuerpo basal flagelar FlgC (flagellar basal-body rod protein), la proteína del complejo gancho-cuerpo basal flagelar FliE (flagellar hook-basal body complex protein), la proteína flagelina FlaB y la proteína de conmutación motriz flagelar FliG fueron únicas para R. Hominis. Los 2 genomas bacterianos también difirieron por 42 genes carbohidratos, reflejando sus diferentes requerimientos nutricionales.

R. Hominis responde al entorno intestinal al regular-incrementar los genes de movilización y de quimiotaxis

[0083] Para determinar los genes expresados diferencialmente por R. Hominis en respuesta a la asociación con el anfitrión y con la dieta, una microformación fue construida utilizando 6000 fragmentos PCR de la biblioteca de secuenciación de inserciones de tamaño pequeño. La subsiguiente validación PCR en tiempo real fue realizada en 42 genes expresados diferencialmente que se aglutinaron en regiones específicas del genoma de R. Hominis tal como se ilustró en la figura 2B. Para distinguir entre los efectos del entorno intestinal y los componentes dietarios, el ARN bacteriano fue aislado de 4 condiciones experimentales diferentes: (i) in vivo, del intestino ciego de ratones mono-asociados; (ii) in vitro, del crecimiento de bacterias en medios de cultivos; (iii) in vitro, del crecimiento de bacterias en la presencia de componentes dietarios; y (iv) de bacterias incubadas en la superficie de células Caco-2 y HT-29 confluyentes.

[0084] 50 genes expresados diferencialmente fueron identificados (in vivo versus in vitro) (figura 3A). El descubrimiento más sorprendente fue una regulación-incremento extremadamente alta in vivo de los genes involucrados en la transferencia de conjugación/movilización, los genes similares a *mobA*- y *mobL* (figura 3B). La presencia de aquellos genes en los estudios de transcripciones fue sorprendente puesto que ningún gen identificable fue asignado a los fagos, profagos, transposones y plásmidos en la característica categórica de los subsistemas. Esta diferencia en la detección y asignación genética se debe posiblemente a las limitaciones reconocidas de las anotaciones categóricas de los subsistemas. El efecto estimulatorio de los compuestos dietarios fue mucho menos pronunciado, sugiriendo que el entorno intestinal per se es un inductor importante de los genes involucrados en la transferencia genética horizontal.

[0085] Otros subsistemas inducidos por el entorno intestinal incluyen al transporte de la membrana, en particular el transporte de magnesio, y motilidad y quimiotaxis incluyendo a varias proteínas y genes de quimiotaxis que aceptan al metilo del operón flagelar (figura 3C). La R. Hominis posee múltiples genes de flagelina *flaA1, flaA2, flaA3,* y *flaB* y un crecimiento interesante en la expresión promovida del entorno intestinal en los ratones en relación a esta bacteria tal como fue observado por los Western blots de bacterias aisladas a partir de ratones colonizados in vivo que utilizan anticuerpos de flagelina específica de R. Hominis (figura 3D). Esto es consistente con informes previos indicando que sólo ciertos subconjuntos de firmicutes producen a flagelos in vivo (14).
Así mismo, la expresión de genes del metabolismo catabólico de R. Hominis en el entorno intestinal fue afectada principalmente por los compuestos dietarios (figura 3E). Los genes involucrados incluyeron a la acetiltransferasa de acetil-CoA, la deshidrogenasa de 3-hidroxiacil-CoA, la deshidrogenasa de butiril-CoA y la carboxiquinasa de fosfoenolpiruvato [ATP - phosphoenolpyruvate carboxykinase]. Aunque la regulación de estos genes fue controlada principalmente por la dieta, en un punto posterior de tomas de muestras el efecto del anfitrión también fue aparente. Inesperadamente, el entorno anfitrión reguló-redujo a algunos genes que participaron en el metabolismo de las sustancias derivadas del anfitrión tales como el glucuronato, que es común en las cadenas de carbohidratos de los proteoglicanos de la mucosa.

[0086] Para investigar aún más los efectos de la adaptación del anfitrión en el transcriptoma humano, una estimulación in vitro de las células epiteliales intestinales humanas (Caco-2 y HT-29) fue realizada. Esto demostró que el gen de transferencia de conjugación/movilización *mobAlmobL proteína1,* lo cual fue inducido por la adaptación del intestino de los ratones, también se incrementó en ambas líneas celulares (Fig. 3F). En una forma consistente con la información in vivo, el gen de flagelina *MotA* fue regulado-incrementado en las células Caco-2. Los genes involucrados en el metabolismo del butirato demostraron diferencias entre las 2 líneas celulares, con una regulación-reducción observada en las células Caco-2 y una regulación-incremento en las células HT-29.

La R. Hominis afecta a los senderos de células T, principalmente en el colon

[0087] La colonización de ratones GF con R. Hominis es correlacionada con una expresión genética intestinal incrementada la cual fue la más grande en el colon (figura 4A). Una expresión diferencial fue más profunda a los 28 días después de la colonización, con 159 genes regulados-incrementados y 143 genes regulados-reducidos. El número de genes expresados diferencialmente en el íleon en el día 14 fue similar al colon ascendente, con 79 genes regulados-incrementados y 119 genes regulados-reducidos. La expresión diferencial en el íleon fue muy baja en el día 28, consistente con los niveles reducidos de colonización. La respuesta de transcriptomas fue diferente en los 2 momentos diferentes, tal como se mostró por la separación clara de transcripciones significativas por medio del análisis de mapa de calor (figura 4B). Una validación PCR en tiempo real positiva de los datos Affymetrix se muestran en la figura 4C.

[0088] La mayoría de senderos afectados a los 14 días en el íleon y en el colon ascendente son agrupados en las categorías de diferenciación celular, regulación del ciclo celular y remodelación de tejidos. En una forma importante, la respuesta inmunológica fue el grupo de senderos más importante inducido a los 28 días en el colon ascendente. Los 36 senderos que fueron afectados significativamente en esta categoría estuvieron involucrados principalmente en la función de células T e incluyeron al sendero de señalización IL-10, el sendero ICOS en la célula aisladora T y la regulación de la función de las células T por CTLA-4. Los genes involucrados en estos senderos demostraron una regulación-incremento y una regulación-reducción, así que mientras que estos senderos fueron afectados significativamente por la presencia de la R. Hominis, los efectos funcionales netos precisos en la diferenciación de células T requiere más investigación. Sin embargo, IL-10, CD3ε y IL-13 mejorados y la expresión cambiada de IFN-γ fueron confirmadas por PCR en tiempo real (figura 7), sugiriendo que la colonización de R. Hominis podría favorecer a los senderos de diferenciación celular de Treg y Th2. Un análisis ontológico genético fue aplicado para obtener información adicional acerca de la clasificación funcional de genes regulados diferencialmente. El proceso GO para la 'polimerización de actina' (GO:0030041) (*Arpc3, Capg, Cdc42ep5* y *Rhoc*) fue regulada-incrementada en el día 28 en el colon en ratones colonizados con R. Hominis (figura 8) la polimerización de actina en la sinapsis inmunológica es requerida para la activación de células T y para la función ejecutada. La inducción genética fue confirmada aún más por PCRs en tiempo real (figura 4C). En general, estos datos indican que R. Hominis efectúa activamente la respuesta inmunológica adaptiva en el colon al influenciar positivamente a la regulación de las células T.

[0089] En relación a estos resultados se puede mencionar a la inducción de miembros de la familia Ly6 en el colon ascendente. En particular, el producto genético anclado a GPI de *Ly6g6c* fue regulado-incrementado en 25 veces, y el gen relacionado *Ly6g6e* fue regulado-incrementado en 2 veces en el día 28. La mayoría de células hematopoyéticas expresan a uno o más miembros de la familia Ly6 incluyendo a neutrófilos y a células dendríticas plasmocitoides. Además, un posible rol de Ly6 en la activación, diferenciación y maduración de las células T ha sido planteado (15).

[0090] La inmunocitoquímica confirmada incrementó la presencia de células $Ly6G^+$, $CD11b^+$ y $CD3^+$ en ratones colonizados por R. Hominis (figura 5). Consistente con los datos que muestran a senderos de células T que son dominados principalmente por las respuestas Treg, existió un incremento estadísticamente significativo en células T que mostraron resultados doblemente positivos de $CD3^+$ $FoxP3^+$ en el colon de ratones inoculados con R. Hominis. Claramente, la colonización de R. Hominis, como una sola especie bacteriana, indujo un incremento significativo en la población de las células $CD3^+FoxP3^+$, particularmente en el colon de estos ratones.

R. Hominis modula a los genes de respuesta inmunológica innata en el íleon y en el colon y atenúa la colitis en los ratones IL10KO

[0091] Los genes involucrados en la inmunidad innata y en la función de barrera intestinal fueron inducidos significativamente por la presencia de R. Hominis en el colon ascendente. El proceso GO 'respuesta inmunológica innata' (GO:0045087) fue regulado-incrementado e incluyó a los genes relacionados con TLR, *Tlr5, Tlr1* y *Vnn1.* La regulación-incremento de *Tlr5* fue particularmente interesante puesto que la inducción correspondiente de genes flagelares y la presencia de la proteína de flagelina en R. Hominis durante la colonización intestinal, y puesto que podría inferir a un rol para este sendero innato de señalización para regular otras respuestas inmunológicas innatas y activas. El acoplamiento entre la señalización TLR5 y las respuestas de células $CD4^+$ T han sido demostradas recientemente para patógenos flagelantes (16). Asimismo, el rol de TLR2 para facilitar la colonización de los bacteroides fragilis, la propagación de Treg y la homeostasis inmunológica han sido demostradas (17).

[0092] Otros genes inmunológicos innatos afectados en el colon por la R. Hominis incluyeron a los péptidos

antimicrobianos *Defb37, Pla2g3, Muc16* e *ltln* y los genes de la función de barrera intestinal *Sprr1a, Cldn4, Pmp22, Crb3* y *Magi3.* Los genes inmunológicos innatos que mostraron una regulación-incremento en el íleon en respuesta a la R. Hominis incluyeron a *Defcr20, Pcgf2, Ltbp4, Igsf8* y *Tcfe2a.* Interesantemente, *Pcgf2* regula negativamente a la expresión de diferentes citoquinas, quimiocinas, y los receptores de quimiocinas y podrían jugar un rol importante en el control de respuestas inflamatorias en tejidos intestinales como respuesta a esta bacteria comensal. Interesantemente, también demostramos una regulación negativa del sendero NF-κB (GO:0043124) por el R. Hominis, que, similarmente al B. *thetaiotaomicron* (19), podría contribuir a la homeostasis inmunológica al regular-reducir este proceso inflamatorio.

[0093] El modelo de ratón IL-10 Knockout fue utilizado para probar la eficacia terapéutica de la R. Hominis, debido al control de los senderos inflamatorios así como los efectos positivos en la inducción de Treg en ratones mono-asociados. A los ratones se les dieron dosis (~ 50 µl, 1010CFU) 3 veces a la semana desde el momento en que se destetaron a los 20 días de edad durante un periodo de 14 semanas. La expresión genética de un panel de marcadores biológicos pro-inflamatorios mostró que ratones IL-10KO tuvieron una fuerte elevación de todos los genes investigados en comparación a los ratones de tipo silvestre, con una inducción genética que variaba desde en 4 a 49 veces (figura 6A). La inducción genética pro-inflamatoria fue significativamente más baja en ratones tratados con R. Hominis en comparación a ratones que no fueron tratados, indicando beneficios terapéuticos fuertes de la administración oral de R. Hominis. Las masas corporales de los animales tratados con R. Hominis también fueron más pesadas al final del estudio en comparación a animales no tratados, y este efecto fue estadísticamente significativo en los machos (figura 6B). Finalmente, un análisis histológico mostró la presencia de inflamaciones severas en el colon ascendente de los animales IL-10KO que no fueron tratados, mientras que los animales que fueron tratados con R. Hominis tuvieron una mucosa del colon que se veía relativamente saludable.

La colonización de R. Hominis influencia a los genes de saciedad y a la composición corporal

[0094] Las acciones metabólicas significativas de R. Hominis en ratones mono-asociados también fueron evidentes. Los procesos GO 'regulación negativa de la respuesta a los alimentos' (GO:0032096), 'regulación relativa del apetito' (GO:0032099), y 'regulación de la secreción de catecolamina' (GO:0050433) fueron reguladas-reducidas en el colon ascendente después de la colonización con R. Hominis. Esta información infiere que R. Hominis ejerce un efecto estimulatorio en el apetito del anfitrión. Los genes involucrados en estos procesos fueron *Agt, Cartpt, Cck* y *Cxcl12,* con cambios que variaron de 2 a 12 veces su monto. *Cck,* en particular, juega un rol importante en la digestión y saciedad como un supresor del hambre. Gcg también demostró una regulación-reducción en este lugar intestinal.

[0095] Para establecer si estos cambios genéticos tuvieron una importancia fisiológica en relación al consumo alimenticio y a la composición corporal, análisis de la masa y de la composición de carcasa secas fueron realizadas. Interesantemente, las masas de carcasa secas de ratones asociados con R. Hominis fueron significativamente más pesadas en comparación a los animales GF, y las diferencias fueron más discernibles a los 14 días. Análisis adicionales de lípidos de las carcasas mostraron que la adiposidad total también fue significativamente más alta en animales tratados con R. Hominis a los 14 días. Este hallazgo es consistente con datos recientes que revelan el rol de Firmicutes en la recaudación de energía a través de fermentaciones dietarios, pero también apoyan a la noción de que las bacterias intestinales pueden, de hecho, modular al eje cerebro-intestino y a las hormonas regulatorias del apetito.
Debate

[0096] La co-evolución a largo plazo del mutualismo anfitrión-microbio ha controlado posiblemente la selección de especies bacterianas funcionalmente importantes en el intestino, la mayoría de las cuales no son representadas altamente en otros ecosistemas. Actualmente, existe información limitada en relación a la contribución de miembros individuales de la comunidad microbiana a las funciones intestinales, particularmente en relación al desarrollo del sistema inmunológico de la mucosa.

[0097] Trabajo reciente utilizando un modelo de colonización reversible basado en E. coli (HA 107) ha demostrado que bacterias vivas son requeridas en montos que se aproximan a los 10^8 CFUs por gramo de contenido para los efectos que inducen inmunidad en IgA (20). Recientemente, las funciones específicas de SFB y los *Bacteroides fragilis* han sido investigados en el intestino de ratones para definir sus contribuciones individuales a la biología de las células T y estas bacterias han demostrado ser inductoras potentes de células Tregs y Th17 (5, 8, 9). Los efectos de miembros individuales de Firmicutes de la agrupación XIVa no se han reportado previamente, aunque su presencia en el ASF, que también afecta a la diferenciación de células T ha sido mencionada (10).

[0098] La personas que están haciendo la aplicación han demostrado en este documento la primera mono-asociación exitosa del intestino de ratones libres de gérmenes con una bacteria anaeróbica, R. Hominis, que es un miembro de los Firmicutes phylum. La sensibilidad extrema al oxígeno de bacterias como la Roseburia requiere técnicas estrictas de cultivos aeróbicos, haciendo difícil realizar una caracterización funcional. La persona que está haciendo la aplicación estableció una mono-colonización estable de R. Hominis en ratones libres de gérmenes y produjo a la secuencia genómica mencionada completa para descubrir su organización metabólica, su fisiología y sus unidades simbióticas. Se descubrió que las respuestas de transcripciones de R. Hominis después de la colonización podría ser atribuidas al entorno intestinal del anfitrión y a la dieta. Los efectos impulsados por el

anfitrión dominaron la respuesta de R. Hominis después de la mono-asociación. Esto incluyó la transferencia genética, el transporte de membranas, los subsistemas de quimiotaxis y de motilidad. La regulación-incremento fuerte de genes involucrados en la transferencia de movilización apoya la teoría de que el entorno intestinal es altamente conductivo para el intercambio genético horizontal entre los miembros de la microbiota intestinal. Por lo tanto, este entorno podría acelerar la diseminación de genes importantes para la supervivencia, colonización y función bacterianas dentro del ecosistema intestinal.

[0099] El rol del aparato de motilidad y flagelar en la colonización del anfitrión está bien elaborada para bacterias patogénicas, pero se conoce mucho menos acerca del rol de las proteínas flagelares en bacterias comensales. Experimentos in vivo revelaron un efecto estimulatorio del entorno intestinal anfitrión en la expresión de genes de flagelina. Las señales de flagelina son percibidas por los receptores TLR4 del anfitrión (24) y muchas estructuras patogénicas de flagelina inducen respuestas pro-inflamatorias fuertes (24). La señalización a través de TLR5 en respuesta a los comensales flagelados residentes podría ser importante para la homeostasis, puesto que la eliminación de TLR5 resulta en la colitis espontánea en ratones (25). La expresión mejorada de la flagelina de R hominis in vivo es, por lo tanto, de potencial interés. Otro trabajo ha demostrado que mutantes de flagelina de E. coli tienen una ventaja de colonización sobre cepas flageladas de tipo silvestre, posiblemente debido a la ausencia de reconocimiento innato por la señalización de TLR5 (26, 27). La persona que está haciendo la aplicación ha demostrado para ciertos Firmicutes, que la regulación-incremento de la flagelina es una respuesta natural a la colonización intestinal. La proteína de flagelina de R. Hominis permanece siendo expresada in vivo y se correlaciona con una colonización sostenida, con la ausencia de una inflamación visible y una expansión de las células T de fenotipo regulatorio. Por lo tanto, las estructuras de flagelina de comensales a través de TLR5 podrían ayudar a dirigir las respuestas de tolerancia inmunológica. Datos adicionales que se basan en mutantes de TLR5KO y de flagelina de R. Hominis calificarán aún más la importancia de las flagelinas comensales en relación a la homeostasis inmunológica pero el efecto protector observado de R. Hominis en ratones IL-10 KO apoya esta hipótesis, aunque otras partículas de señalización tales como el butirato también podrían contribuir a la regulación inmunológica.

[0100] Un rol claro fue establecido para R. Hominis en la promoción de la función de la barrera intestinal y la inmunidad innata en el colon de ratones. Uniones ajustadas, uniones con vacíos y uniones adherentes operan para limitar la traslocación bacteriana de la capa subepitelial (28). La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa se caracterizan por la pérdida de la función de barrera y la integridad de unión ajustada. Interesantemente, la disbiosis de la microbiota intestinal en IBD es asociada con una reducción en los Firmicutes (1, 29). La observación que R. Hominis mejora activamente a la expresión de los genes barrera sugiere que su pérdida en los pacientes con IBD podría ser funcionalmente significativa. La activación de complejos de uniones ajustadas no solamente es la prerrogativa de R. Hominis; otros comensales, tales como *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Lactobacillus acidophilus,* también mejoran la función de la barrera de la mucosa (18, 30), infiriendo oportunidades probióticas con estas bacterias en el IBD humano.

[0101] Los efectos de R. Hominis en el sistema inmunológico intestinal fueron intrigantes. Los efectos más fuertes fueron tomados en cuenta en el colon ascendente y genes tales como el *Ly6g6c* fueron fuertemente regulados-incrementados, así como los senderos involucrados en la regulación de las células T y en la diferenciación y de la polimerización de la actina en la sinapsis inmunológica, que están implicadas en la activación de las células T y en las funciones ejecutoras. Aunque la expresión de los genes Treg en respuesta a la colonización del R. Hominis no fue muy fuerte, los senderos de células T más afectados incluyeron a aquellos para IL-10, ICOS y CTLA-4, los cuales todos están involucrados en el soporte a la diferenciación de Tregs. En una forma importante, las personas que están haciendo esta aplicación fueron capaces de demostrar incrementos significativos en las células $CD3^{+}FoxP3^{+}$ en los colones de estos ratones. Estos hallazgos complementan la información reciente de otras especies de Clostridium que controlan la diferenciación de Tregs. Claramente, el R. Hominis puede promover la expansión de las células T en la mucosa y afecta a la diferenciación de las células T.

[0102] Fue interesante el tomar en cuenta los efectos inmunológicos fuertes en el colon en comparación al íleon, especialmente en el día 28 después de la mono-colonización con R. Hominis. Los datos transcriptómicos a los 14 días sugieren que algún cebado inmunológico podría ser iniciado en el íleon ese momento. Los efectos en los diferentes subconjuntos de células T en el colon ascendente a los 28 días podrían, reflejar, por lo tanto, un tráfico y una migración dirigida de células desde el íleon hacia el ganglio linfático mesentérico y hacia el colon.

[0103] Un efecto biológico adicional interesante de la colonización de R. Hominis fue la regulación de genes que afectan las respuestas a la comida y al control del apetito. En particular, las hormonas de saciedad Cck y Gcg fueron reducidas significativamente. Los efectos de Cck en el consumo de comida fueron regulados por medio de un sendero aferente vagal. Este es el sendero neural importante por el cual la información acerca de los nutrientes ingeridos alcanza al sistema nervioso central para influenciar a la función intestinal y al comportamiento de alimentación. Cck actúa en el sistema vagal para reducir la expresión de moléculas que estimulan al apetito y a la alimentación, y para incrementar la expresión de moléculas que inhiben a la alimentación y reducen el apetito (*Npy2r* y *Cartpt,* fueron regulados-reducidos en 2 veces en este estudio). No se ha encontrado hasta ahora ningún enlace entre Cck, y Gcg y bacterias comensales, sin embargo, los ácidos grasos y las proteínas son inductores potentes de *Cck* y *Gcg* (31). R. Hominis produce ácidos grasos de cadenas cortas tales como el butirato con colas alifáticas de menos de 6 carbonos; existen informes de que esta actividad metabólica reduce el efecto estimulatorio en el Cck

plástico observado con ácidos grasos de cadenas más largas (32). En una forma interesante, el análisis de la masa de la carcasa reveló que el contenido de masa y lípidos corporales fue, en efecto, incrementada significativamente con R. Hominis, en una forma consistente a los incrementos de masa corporal observados en el convencionalismo de los ratones libres de gérmenes (33). Ya sea que este es un efecto directo de una reducción en las hormonas de saciedad tal como fue observado en el estudio actual permanece por verse, puesto que la interacción de *Cck* y *Gcg* no ha sido reportada previamente. Sin embargo, es importante reconocer que un vínculo entre la colonización de la microbiota y el cultivo de energía a partir de la dieta, en parte a través de la liberación de SCFAs, ha sido demostrado previamente (34). Dado que R. Hominis es un productor importante de butirato, este mecanismo posiblemente también contribuye a la eficiencia metabólica observada después del tratamiento de R. Hominis.

[0104] En resumen, la mono-asociación de intestino de ratones con *R. hominis* indujo eventos fuertes de expresión genética bidireccional consistentes con los cambios en el transporte de membranas bacterianas, quimiotaxis y motilidad de esta bacteria adaptada a los intestinos y una activación concurrente del sistema inmunológico innato y adaptable del anfitrión. Esta bacteria metabólicamente activa también ejerce efectos importantes sobre los genes de apetito y saciedad relacionados con el aumento de masa corporal en ratones colonizados.

Composiciones

[0105] Otro aspecto del invento se relaciona a una composición compuesta de las especies de bacterias descritas previamente y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente adecuado. Los excipientes, diluyentes y portadores adecuados se describen a continuación.

[0106] La composición puede ser cualquier composición, pero es preferible que sea una composición que pueda ser administrada de forma enteramente oral o rectal. Por ejemplo, la composición puede ser comestible. “Comestible” significa que es un material aprobado para su consumo humano o animal.

[0107] Otro aspecto de este invento se relaciona a la composición probiótica que comprende las especies bacterianas tal como se describieron previamente.

[0108] Tal como se entiende en el presente documento, el término "probiótico” se refiere a preparados de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso en la salud o en el bienestar del anfitrión. (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined" (“Probióticos: ¿Cómo deben ser definidos?”) Trends Food (Alimentos Tendencias) Sci. Technol. 1999:10 107-10).

[0109] Preferiblemente, la composición probiótica es una composición metabólicamente activa de administración oral, por ejemplo, bacteria viva y/o liofilizada, o bacteria no viable eliminada por medio de calor, o bacteria probiótica irradiada o lisada. La composición probiótica puede contener a otros ingredientes. La composición probiótica del invento puede ser administrada de forma oral, por ejemplo, en forma de una tableta, cápsula o polvo. Los productos encapsulados son preferidos para R. *hominis* ya que es anaeróbica. Otros ingredientes (tales como la vitamina C, por ejemplo), pueden ser incluidos como eliminadores de oxígeno. Los sustratos prebióticos como estos mejoran la colonización y supervivencia *in vivo.* Alternamente, la composición probiótica del invento puede ser administrada de forma oral como alimento o producto nutricional, como, por ejemplo, leche o suero fermentado a partir de productos lácteos, o como un producto farmacéutico.

[0110] Se considera que la dosis apropiada de bacteria probiótica se encuentra entre 1×10^3 hasta cerca de 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU - colony forming units), más preferible entre aproximadamente 1×10^7 hasta aproximadamente 1×10^{10} CFU, más preferible, aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{10} CFU.

[0111] En una sección importante, la composición contiene a las especies bacterianas y/o a sus componentes celulares en calidad de ingredientes activos, en un monto que va desde alrededor de 1×10^6 a alrededor de 1×10^{11} CFU/g, en relación a la masa de la composición, preferiblemente desde alrededor de 1×10^8 a alrededor de 1×10^{10} CFU/g, La dosis podría ser de 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

[0112] Comúnmente, un probiótico es combinado opcionalmente con por lo menos un compuesto prebiótico adecuado. Un prebiótico es usualmente un carbohidrato no digerible tal como un oligo- o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no es degradado o absorbido en la tráquea digestiva superior. Prebióticos conocidos incluyen a productos comerciales tales como la insulina y los transgalacto-oligosacáridos.

[0113] Preferiblemente, la composición de este invento incluye a un prebiótico en un monto que va desde alrededor del 1 a alrededor del 30% masa, en relación a la masa total de la composición, preferiblemente desde el 5 al 20% masa. Carbohidratos importantes son seleccionados de: fructo-oligosacáridos (o FOS), fructo-oligosacáridos de cadenas cortas, la insulina, isomalt-oligosacáridos, pectinas, xilo-oligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS - chitosan-oligosaccharides), beta-glucanos, gomas cultivables modificadas y almidones resistentes, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarrobo, maicenas y fibras cíclicas. Prebióticos particularmente preferidos son los fructo-oligosacáridos de cadenas cortas (por simplicidad mostrados desde este punto en adelante en este documento como FOSs-c.c); donde dichos FOSs-c.c. no son carbohidratos digeribles, obtenidos

generalmente por medio de la conversión del azúcar de remolacha e incluyen a una molécula de sacarosa a la cual están enlazadas 3 moléculas glucosas.

Piensos/productos

[0114] Un aspecto adicional del invento se refiere a productos alimenticios, suplementos dietarios, nutraceúticos, fórmulas nutricionales, bebidas y medicamentos que contienen a especies bacterianas y sus usos tal como se definieron anteriormente.

[0115] En una sección preferida, la composición comprende adicionalmente a por lo menos un tipo de otra bacteria de nivel alimenticio, donde la bacteria de nivel alimenticio es seleccionada preferiblemente de un grupo que consiste de bacterias ácidas lácticas, bífidobacterias, propionibacterium o sus mezclas

[0116] Un aspecto del invento se refiere a un producto alimenticio que comprende a las especies bacterianas definidas anteriormente. El término “producto alimenticio” tiene la intención de abarcar a todos los productos consumibles que pueden ser sólidos, en forma de gelatina o en forma líquida. Productos alimenticios adecuados podrían incluir, por ejemplo, a productos alimenticios funcionales, composiciones alimenticias, comidas de mascotas, alimentos para ganado, comidas saludables, piensos, y similares. En una sección preferida, el producto alimenticio es comida orientada a la salud.

[0117] Tal como se utiliza en este documento, el término “producto alimenticio funcional” se refiere a comida que es capaz de suministrar no solamente un efecto nutricional, pero también es capaz de entregar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Asimismo, las comidas funcionales son comidas ordinarias que tienen componentes o ingredientes (tales como aquellos aquí descritos) incorporados a estos que imparten al alimento un beneficio funcional (por ejemplo, médico o fisiológico) específico aparte de puramente el efecto nutricional.

[0118] Ejemplos de productos alimenticios específicos que son aplicables para este invento incluyen a productos lácteos, postres que están listos para ser consumidos, polvos para su re-constitución con, por ejemplo, leche o agua, bebidas lácteas de chocolate, bebidas de malta, alimentos que están listos para ser consumidos, platos o bebidas instantáneas para humanos o composiciones alimenticias que representan a una dieta completa o parcial dirigida a mascotas o a ganado.

[0119] En una sección importante la composición de acuerdo a este invento es un producto alimenticio dirigido a humanos, mascotas o ganado. La composición podría ser dirigida a animales seleccionados de un grupo que consiste de perros, gatos, puercos, ganado, caballos, cabras, ovejas o aves de corral. En una sección importante, la composición es un producto alimenticio dirigido a especies adultas, en particular a humanos adultos.

[0120] En este invento, el término “producto que se basa en la leche” significa cualquier producto que se basa en leche o sueros líquidos o semisólidos que tienen un contenido graso variable. El producto que se basa en la leche puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche descremada, leche completa, leche re - combinada con leche en polvo y sueros sin ningún procesamiento, o un producto procesado, tal como yogur, leche cuajada, cuajados, leche agria, leche agria completa, leche de mantequilla y otros productos de leche agria. Otros grupos importantes incluyen a bebidas lácteas, tales como bebidas séricas, leches fermentadas, leches condensadas, leches para infantes o bebés; leches con sabores, helados; alimentos que contienen leche tales como dulces.

[0121] Un aspecto del invento se refiere a un pienso o alimento animal que comprende a las especies bacterianas ya mencionadas.

[0122] Las composiciones de este invento podrían ser - o podrían ser agregadas a - suplementos alimenticios, también referidos en este documento como suplementos y dietarios o nutricionales o aditivos alimenticios. Por lo tanto, otro aspecto del invento se refiere a un suplemento dietario o aditivo alimenticio que comprende a una o más cepas bacterianas de acuerdo al invento.

[0123] Las especies bacterianas y composiciones probióticas de acuerdo al invento también podrían ser utilizadas en la nutrición animal (por ejemplo, en la nutrición de cerdos), particularmente en el período de destetado temprano y en el período de crecimiento y engolamiento. Se espera que los probióticos mejoren la función inmunológica, reduzcan y eviten enfermedades infecciosas, alteren beneficiosamente a la composición de la microbiota, y mejoren el crecimiento y el rendimiento de los animales, por ejemplo, a través de una eficiencia incrementada de la conversión de los alimentos.

Diluyentes, excipientes y portadores

[0124] Tal como se mencionó anteriormente, el invento también se refiere a composiciones, más preferiblemente a composiciones farmacéuticas o suplementos nutricionales, que comprenden a las especies bacterianas y sus usos ya definidos. Las especies bacterianas son generalmente administradas en una mezcla con un portador, excipiente o

diluyente farmacéuticamente y nutricionalmente aceptable, particularmente para terapias humanas. Las composiciones farmacéuticas podrían ser para el uso humano o animal en medicina humana y veterinaria.

[0125] Ejemplos de aquellos excipientes para las varias formas diferentes de composiciones farmacéuticas aquí descritas podrían encontrarse en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients (Manual de Excipientes Farmacéuticos), 2ª edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

[0126] Portadores o diluyentes aceptables para su uso terapéutico son bien conocidos en la industria farmacéutica, y son descritos, por ejemplo, en Remington's pharmaceutical Sciences (Ciencias farmacéuticas de Remington), Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

[0127] Ejemplos de portadores adecuados incluyen a la lactosa, almidones, a la glucosa, a la metilcelulosa, al estearato de magnesio, al manitol, al sorbitol, y similares. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen a etanol, glicerol y agua.

[0128] La opción de portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede ser seleccionada dependiendo de la ruta deseada de administración y a la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas podrían comprender, o ser agregadas al, portador, excipiente o diluyentes, cualquier enlazador adecuado, lubricante, agente suspensor, agente cobertor, o agente de disolución.

[0129] Ejemplos de enlazadores adecuados incluyen a almidón, gelatina, azúcares naturales tales como la glucosa, la lactosa anhídrida, la lactosa de flujo libre, la beta-lactosa, endulzantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como la acacia, el tragacanto o el aliginato de sodio, la celulosa de carboximetilo y el glicol de polietileno.

[0130] Ejemplos de lubricantes adecuados incluyen al oleato de sodio, al estearato de sodio, al estearato de magnesio, al benzoato de sodio, al acetato de sodio, al cloruro de sodio y similares.

[0131] Agentes conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso saborizantes podrían ser suministrados en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen al benzoato de sodio, al ácido sórbico, y a ésteres del ácido p-hidroxibenzóico. Agentes antioxidantes y suspensores también podrían ser utilizados.

[0132] Portadores, diluyentes y excipientes nutricionalmente aceptables incluyen aquellos adecuados para el consumo humano o animal y que son utilizados como estándar en la industria alimenticia. Portadores, diluyentes y excipientes nutricionalmente aceptables comunes serán conocidos para una persona con conocimiento en la industria.

Administración

[0133] Las composiciones de este invento podría ser adaptadas para rutas orales, rectales, vaginales, parenterales, intramusculares, intraperitoneales, intraarteriales, intratecales, intrabronquiales, subcutáneas, intradérmicas, intravenosas, nasales, bucales o sublinguales de administración. Preferiblemente, las composiciones de este invento son adaptadas para rutas orales, rectales, vaginales, parenterales, nasales, bucales o sublinguales de administración.

[0134] Para la administración oral, un uso particular es hecho para tabletas, pastillas, cápsulas, gotas y píldoras.

[0135] Otras formas de administración comprenden a soluciones o emulsiones que podrían ser inyectadas intravenosamente, intraarterialmente, intratecalmente, subcutáneamente, intradérmicamente, intraperitonealmente o intramuscularmente, y que son preparadas a partir de soluciones estériles o esterilizarles. Las composiciones farmacéuticas de este invento también podrían estar en la forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, aerosoles, soluciones o polvos.

[0136] Un medio alterno de administración transdérmica es por medio del uso de parches dérmicos. Por ejemplo, el ingrediente activo puede ser incorporado a una crema que consiste de una emulsión acuosa de glicoles de polietileno o de parafina líquida. La cepa bacteriana también puede ser incorporada a un ungüento consistiendo de una base de cera blanca o de parafina suave blanca junto con otros estabilizadores y conservantes tal como pudiese ser requerido.

[0137] Las composiciones pueden ser formuladas en formas de dosis, es decir, en la forma de porciones discretas que contengan una dosis unitaria, o una subunidad o un múltiplo de una dosis unitaria.

Dosis

[0138] Una persona con conocimiento normal en la industria puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas que se va a administrar a un sujeto sin experimentaciones indebidas. Comúnmente, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un paciente individual y

dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad de la cepa bacteriana específica utilizada, la estabilidad metabólica y la duración de acción de aquella cepa, la edad, la masa corporal, la salud general, el género, la dieta, la modalidad y el tiempo de administración, la tasa de deposición, la combinación de medicamentos, la gravedad de la condición específica, y la terapia actual del individuo. Las dosis aquí presentadas son de ejemplos de los casos promedio. Pueden, desde luego, ocurrir instancias individuales donde rangos de dosis más altos o más bajos son necesarios, y aquellos están dentro del enfoque de este invento.

[0139] La dosis diaria efectiva usual en humanos va desde alrededor de 1 x 10^3 a alrededor de 1 x 10^{11}, más preferiblemente, desde alrededor de 1 x 10^7 a alrededor de 1 x 10^{11}, y más preferiblemente, desde alrededor de 1 x 10^6 a alrededor de 1 x 10^{10} CFU.

Combinaciones

[0140] En una sección particularmente importante, las composiciones del invento son administradas en combinación con uno o más agentes activos. En esos casos, las composiciones del invento podrían administrarse consecutivamente, simultáneamente o secuencialmente con uno o más agentes activos.

[0141] Este invento es descrito aún más en forma de los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Condiciones de crecimiento bacteriano

[0142] El R. Hominis A2-183T (=DSM 16839^T=NCIMB 14029^T) fue combinado anaeróbica mente en YCFA sintético o un medio M2GSC de complejos. El cultivo fue inoculado a partir de un inventario congelado en tubos Hungate e incubado durante la noche a 37 °C. Las bacterias fueron cultivadas en placas de agarosa M2GSC durante 48 horas en una estación de trabajo anaeróbica MACS-MG-1000 (Don Whitley Scientific) bajo un 80% de N2, un 10% de CO2, y un 10% de H2 a 37 °C. El efecto de la mucina fue investigado al agregar 0.5 por ciento (masa/volumen) de mucina proveniente de estómagos porcinos de tipo III (Sigma-Aldrich) al medio YCFA.
Para la colonización de ratones libres de gérmenes, se cultivó R. Hominis en un medio YCFA durante la noche a 27 °C. El cultivo fue atemperado y el pellet fue re - suspendido en 1 ml de medio YCFA, suplementado con un 2% de cisteína (masa/volumen, Sigma-Aldrich) y un 3% de ácido ascórbico (masa/volumen, Sigma-Aldrich).

Experimentos animales

[0143] Experimentos en animales libres de gérmenes fueron realizados en las instalaciones de reproducción de animales gnotobióticos INRA en Jouy-en-Josas (ANAXEM plateform, Institut Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, Francia). Todos los experimentos animales fueron aprobados por el Comité ético local. 18 ratones machos C3H/HeN libres de gérmenes fueron ubicados en los grupos de control (N = 8) y de tratamiento (N = 10) y se enjaularon individualmente en aisladores plásticos. Los ratones fueron alimentados ad libitum en una dieta comercial esterilizada (R03-40; UAR). En el día cero, a los animales en el grupo de tratamiento se les dio 100 µl de cultivos de R. Hominis por medio de alimentación forzada, mientras que a los animales de control se les dio 100 µl de un medio YCFA. En el día 14 y en el día 28, 4 animales de control y 5 animales tratados con R. Hominis fueron sacrificados. Los experimentos C57/BL6 IL-10KO fueron realizados en Rowet Institute of Nation and Health (Aberdeen, Escocia, Reino Unido). Ratones de tipo silvestre (N = 8), IL-10KO (N=12) e IL-10KO + R. *hominis* (N=11) fueron analizados 14 semanas después del inicio del experimento. Brevemente, se administró R. hominis 3 veces a la semana a 10^9 cfu/día.

[0144] El íleon, el colon ascendente y el colon descendente fueron divididos en 4 partes iguales y transferidas a RNAlater (Ambiona), formalina amortiguada neutral (Sigma-Aldrich) o nitrógeno líquido. El intestino ciego y el colon transversal completos fueron transferidos a RNAlater. La histopatología también fue evaluada en los ratones IL-10KO.

Experimentos de cultivos de tejidos

[0145] Todos los reactivos de cultivos celulares, a menos que se especifique de otra forma, fueron suplementados por Sigma-Aldrich. 2x105 células Caco-2 o HT29 en 1.5 ml de un medio de DMEM (glucosa alta, HEPES) suplementado con un suero bovino fetal desactivado por el calor (Gibco), penicilina, estreptomicina, anfotericina B y L-glutamina fueron sembrados en los compartimientos superiores de una placa transwell de 6 pozos (Corning). Los compartimentos inferiores contenían 3.0 ml del mismo medio. Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO_2 hasta 3 días después de la confluencia, se lavaron con la solución de Hank para remover antibióticos y FCS y se atemperaron en DMEM suplementado con L-glutamina, selenito de sodio y transferrina durante 24 horas sin antibióticos. Las inserciones transwell fueron transferidas entonces a una caja de cultivo anaeróbico dentro de la estación de trabajo anaeróbica a 37 °C. Los compartimientos superiores de cada inserción fueron llenados con un medio celular DMEM anaeróbico, mientras que el compartimiento inferior fue

llenado con DMEM oxigenado.

[0146] El cultivo A2-183 de R. Hominis fue cosechado en la fase exponencial por medio de centrifugación a 3500 x g durante 5 minutos. El pellet e fue lavado y re - suspendido en 0.8 mililitros de DMEM anaeróbico. 100 µl de una suspensión bacteriana (108 CFU/mililitro) fueron agregados a pozos experimentales. Los pozos de control recibieron el mismo monto de medio sin células bacterianas. Un control adicional incluyó a células bacterianas incubadas sin las células Caco-2 o HT29.

[0147] Las células bacterianas y procariotas fueron cosechadas después de 2 horas y 4 horas de incubación. Ambas bacterias no adherentes y adherentes fueron aspiradas y almacenadas en RNAlater. La viabilidad de las células R. Hominis fue aprobada al untarlas en placas YCFA. Células Caco-2 o células HT-29 fueron cosechadas de los pozos y también fueron almacenadas en RNAlater.

Construcción de bibliotecas R. Hominis

[0148] El ADN cromosómico de R. Hominis para una construcción y pirosecuenciación de bibliotecas de tamaño pequeño fue aislado utilizando un botiquín de aislamiento de ADN microbiano ultraClean^{tm} (Mo Bio Laboratories Inc) y un ADN de masa molecular alta para bibliotecas de fásmidos fue aislado utilizando un botiquín de purificación de ADN genómico Wizard (Promega). La integridad del ADN fue revisada por medio de electroforesis de gel.

[0149] El ADN fue triturado mecánicamente utilizando un botiquín Nebulizer (Invitrogen) y fraccionado por medio de electroforesis de gel. Fragmentos de ADN del tamaño deseado fueron extirpados del gel y purificados utilizando un gel Wizard® SV y un sistema de limpieza PCR (Promega). Una reparación terminal fue hecha con un botiquín de reparación terminal Terminator (Lucigen). Fragmentos de 1.5-3.5 kb fueron clonados utilizando el botiquín CloneSmart® LCAmp (Lucigen) y una biblioteca de 4-8 kb fue construida utilizando al vector pJAZZ®-OC (Lucigen). Bibliotecas de fásmidos fueron construidas utilizando al botiquín de producción de bibliotecas de fásmidos CopyControl™ (Epicentre Biotechnologies). Las colonias fueron escogidas utilizando a un seleccionador automatizado de colonias (BioRobotics BioPick, Genomic Solutions) y guardadas en placas de micro titulación de 384 pozos que contenían 70 µl de medio 2xLB suplementado con un 10% de glicerol y antibióticos correspondientes. Las células fueron cultivadas durante la noche a 37 °C con agitación y se almacenaron a -80 °C.

Secuenciación, ensamblaje y comentarios

[0150] Plantillas para la secuenciación de bibliotecas de tamaños pequeños fueron generadas por medio de PCR utilizando 1 µl de biomasa clónica y los cebadores SL1 y SR2 rodeando al hogar de clonaje de pSMART-LCAmp. Los productos PCR fueron purificados utilizando placas de filtración de limpieza PCR Multiscreen (Millipore). ADN recombinante de los clones pJAZZ®-OC fue aislada utilizando el sistema de purificación de ADN de plásmidos Wizard® SV 96 (Promega). El ADN de fásmidos fue aislado utilizando el botiquín de purificación de ADN FosmidMAX™ (Epicentre). Las lecturas finales de los fragmentos de ADN provenientes de las bibliotecas WGS de R. Hominis con diferentes tamaños de inserción fueron obtenidas utilizando a los secuenciadores de ADN CEQ8000 (Beckman Coulter) y ABI 3770 (Applied Biosystems). El ADN genómico proveniente de R. Hominis también fue secuenciado utilizando a los secuenciadores 454 GS20 (454 Life Sciences) y 454 FLX (Roche). La información de Sanger y de 454 fue ensamblada con la versión 3 de MIRA (http://chevreux.org/projects mira.html; (35). El proceso de comentarios RAST (http://rast.nmpdr.org;(36)) utilizada para anotaciones automáticas y manuales del genoma y para análisis genómicos. La secuencia genómica anotada para R. Hominis A2-183 fue entregada al GenBank (Banco Genético) bajo el número de acceso CP003040.

Análisis de microformaciones

Microformaciones bacterianas

[0151] El ARN bacteriano fue aislado a partir de contenidos del intestino ciego de ratones utilizando el mini - botiquín RNeasy, y se procesó aún más con el botiquín ICROBEnrich™ (Ambion), el botiquín de enriquecimiento de ARNm bacteriano MICROBExpress™ (Ambion), y el botiquín de amplificación de ARN bacteriano MessageAmp™ II (Applied Biosystems). El ARN fue etiquetado con dCTP-Cy3 o dCTPCy5 durante la síntesis de la ADNc (botiquín de marcación de ADNc de cepas CyScribe First; Amersham). Los productos etiquetados fueron purificados utilizando el botiquín de purificación CyScribe GFX (Amersham). Los productos PCR amplificados de 6000 clones en la biblioteca RA8 fueron puestos en ensayos por duplicado en diapositivas de microscopios cubiertas con aminosilano (Corning) utilizando un MicroGrid II TAS (BioRobotics). Fragmentos amplificados de los genes de limpieza rpoD y gyrA fueron distribuidos aleatoriamente en la formación en calidad de controles. La hibridación de las microformaciones fue realizada en la estación de hibridación GeneTAC (Genomic Solutions). La marcación por medio de colorantes fue intercambiada por una 2ª hibridación, y una purificación separada del ARN también fue marcada e hibridada 2 veces, para asegurar la reproductibilidad y obtener resultados estadísticamente significativos. En total, 4 diapositivas fueron hibridadas para cada comparación, para un total de 12 lugares hibridados por clon amplificado. La presencia fue medida en 2 canales utilizando un GeneTAC LS IV (Genomic Solutions) con un integrador GeneTac versión de software 3.0.1. Las intensidades de los lugares fueron transformadas por logaritmos y la normalización Loess

fabricada para remover diferencias en las deficiencias de marcación y de hibridación de sondas. Pruebas t de una muestra fueron utilizadas en los valores de tasas logarítmicas para examinar y detectar la expresión diferencial. La información fue considerada significativa cuando habían cambios superiores a 2 veces y cuando P<0.05.

Análisis de microformaciones de ratones

[0152] Se removió tejido del íleon y del colon ascendente de RNAlater y se liso en Trizol (Invitrogen). El ARN fue aislado utilizando pasos estándar de cloroformilsopropanol. El ARN total fue purificado aún más con el botiquín RNeasy (Qiagen) incluyendo un paso de digestión de DNasa I libre de RNasa (Qiagen). La integridad del ARN fue determinada utilizando al bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). El ARN total fue procesado en ARNc marcado con biotina utilizando el botiquín de marcación de objetivos One-Cycle (Affymetrix). La hibridación a la formación de genoma del ratón de GenChip (Affymetrix) en una GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) fue realizada en las instalaciones principales de micro formaciones del Institute of Medical Sciences (University of Aberdeen, Reino Unido). Los chips fueron examinados con un Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Análisis de la calidad imágenes fueron realizadas utilizando el Software Operativo Gene Chip (GCOS - Gene Chip Operating Software) (Affymetrix). Análisis adicionales de datos fueron realizados con los paquetes de software disponibles gratuitamente de R (http://www.r-proiect.org) y Bioconductor (hftp://www.bioconductor.org). La prueba F moderada suministrada por el paquete bioconductor limma utilizado para probar la expresión diferencial. Los datos fueron considerados significativos cuando P<0.05 utilizando el método de descubrimiento falso de Benjamini y Hochberg. Análisis estadísticos fueron realizados por separado para cada uno de los 2 momentos diferentes. Todos los genes expresados diferencialmente (P<0.05) fueron importados del software analítico MetaCore (GeneGo, St Joseph, MI) para generar mapas de senderos. El análisis de enriquecimiento de senderos integrados fue realizado utilizando a los senderos canónicos que se basan en el conocimiento y senderos metabólicos endógenos. La clasificación de senderos integrados relevantes se basó en los valores p calculados utilizando distribuciones híper - geométricas. Los valores p representaron la probabilidad de un número dado de genes proveniente de una lista de entrada para cuadrar aleatoriamente con un número cierto de genes en el mapa, considerando el número de genes en el experimento versus el número de genes en el mapa dentro del conjunto completo de todos los genes en los mapas.
La interpretación funcional que se basa en Ontología Genética (GO - Gene Ontology) de la información fue realizada utilizando a DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov), una versión expandida del programa original que se puede acceder la web (37). Transcripciones significativamente diferentes (P <0.05) fueron ubicadas en el 'proceso biológico' de categoría GO para desenterrar patrones de expresión genética enriquecida significativamente para términos específicos de GO.
La información de microensayos fue entregada al National Center for Biotechnology Information (NCBI - Centro Nacional de Información Biotecnológica), Gene Expression Omnibus (Expresión Genética General) (número de acceso GSE25544;http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo).

Análisis RT-PCR

[0153] Los cebadores PCR bacterianos fueron diseñados utilizando la herramienta en línea Primer3Plus (38) y comprados de Sigma-Aldrich. Los análisis PCR en tiempo real fueron realizados utilizando el sistema PCR en tiempo real rápido 7500 (Applied Biosystems) con la mezcla maestra verde PCR Power SYBR (Applied Biosystems). El PCR fue realizado de la siguiente manera: un ciclo a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante un minuto, finalizando con un paso de disociación. Todas las muestras fueron ejecutadas por triplicado. GyrA fue utilizada como un gen referencial para efectos de normalización debido a su baja variación entre muestras.

[0154] Para la expresión genética del anfitrión, 2 µg de ARN eucariota total aislado del íleon y del colon ascendente fueron transcritos en reversa a una ADNc usando el botiquín de transcripción en reversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) con cebadores aleatorios. El análisis PCR en tiempo real fue realizado utilizando un sistema PCR en tiempo real rápido 7500 (Applied Biosystems) con el botiquín de PCR verde QuantiFast SYBR (Qiagen) y ensayos de cebadores QuantiTect (Qiagen). Las condiciones de ciclación de PCR fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 10 segundos y a 60 °C durante 30 segundos, finalizando con un paso de disociación. Todas las muestras fueron ejecutadas por triplicado. Se seleccionó a Hprt como un gen referencial para efectos de normalización por su baja variación entre las muestras. Toda la información RT-PCT fue analizada en una escala logarítmicas con una base 2 por una prueba t de estudiantes permitiendo variaciones inequitativas con un corte de significancia de P <0.05. Las diferencias con otras formas de vuelta para calcular cambios en veces.

Western blot

[0155] Anticuerpos policlónicos de conejo inmuno-purificados en contra de la Roseburia hominis Fla2 fueron producidos tal como se describió en Duck *et al* (39). Brevemente, conejos blancos hembra de Nueva Zelanda fueron inmunizados con péptidos sintéticos en adyuvantes completos de Freund y fueron impulsados algunas veces. Se utilizaron los péptidos 261-275 (C-AQYNDDAKSVLEILK-COOH) y 58-71 (C-GLNKASRNSQDGIS-CONH2) fla2 para el R. Hominis. Después de la inmunización los anticuerpos fueron purificados en una columna de inmunoafinidad

preparada al acoplar a los péptidos a 1 ml de micropartículas activadas de sefarosa.

[0156] Para el western blot, contenidos intestinales del colon ascendente fueron suspendidos en un amortiguador laemmli que contenía 8M de urea. La biomasa de R. Hominis (el control positivo) fue diluida en el mismo amortiguador. 30 µl de cada muestra fueron cargados en pozos de un NuPAGE® Novex® con 4-12% de gel Bis-Tris (Invitrogen) y expuestas a electroforesis, seguido por procesamientos adicionales utilizando al sistema de inmunodetección de quimioluminiscencia WesternBreeze (Invitrogen). Los anticuerpos Fla2 fueron diluidos a 1:1000 en un diluyente de anticuerpos y fueron incubados durante la noche a 4 °C, seguido por una hora la temperatura del cuarto con anticuerpos de ratón conjugadas con fosfatasas alcalinas. La detección fue lograda utilizando el sistema de imágenes Fuji LAS3000.

Análisis de masa corporal y de carcasa de lípidos en seco

[0157] Las carcasas de ratones eviscerados fueron pesadas, liofilizadas a una masa constante y luego trituradas para su análisis. El contenido de lípidos fue determinado por medio de extracción (1:100 masa/volumen) con cloroformo/metanol (2:1 volumen/volumen) tal como se describió anteriormente (40).

Análisis FISH

[0158] El análisis FISH fue realizado en secciones de tejido intestinal utilizando una sonda bacteriana general Eub338 y una sonda recientemente diseñada específica para R. Hominis A2-183.

[0159] Los tejidos fijados en formalina amortiguada neutral fueron adheridos a Technovit 8100 (Heraeus Kulzer). 2 secciones micrónicas fueron cortadas utilizando un micrótomo rotatorio (Leica/Reichert Autocut). 3 secciones fueron tomadas por diapositiva a 100 µm, 200 µm y 300 µm en el tejido, resultando en 9 secciones por animal.

[0160] Las diapositivas fueron deshidratadas por medio de incubaciones consecutivas en un 50% (volumen/volumen), un 80% y un 96% de etanol y secadas a la temperatura del cuarto. Las sondas 16S ARNr FISH utilizadas fueron sondas bacterianas generales Eub338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT; Cy3) y una sonda diseñada recientemente específica para *R. hominis* A2-183 (GTACATTACATACTCTGTCAGTG; FITC), la cual fue probada extensivamente para detectar su especificidad en contra de un panel de aislamientos bacterianos intestinales. Una sonda de 10 µl (30 ng/microlitro) en 100 µl de un amortiguador de hibridación fueron aplicados a la muestra deshidratada y fueron incubados a la temperatura específica de la sonda. Las diapositivas fueron lavadas en un amortiguador de lavado a 50 °C durante 30 minutos, sumergidas en agua helada para remover a residuos del amortiguador de lavado y secada bajo un flujo de aire comprimido. Se quitaron los colorantes con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories Inc) y las diapositivas fueron montadas con un medio de montaje Vectashield para florescencia (Vector Laboratories Inc) para prevenir desvanecimientos. Las bacterias fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM RBE (Leitz GMBH) y fotografiadas con una cámara Penguin 600CL (Piera) y el software Viewfinder 3.0 (Studio Lite). Las imágenes de alta magnificación (x63) fueron recuperadas utilizando el sistema Apochromatics (Leica).

Inmunofluorescencia

[0161] La inmuno - localización de los marcadores de células fue examinada en secciones criogénicas secuenciales (8 µm). Las secciones fueron fijadas en metanol pre-enfriado durante 30 minutos a 20 °C (Ly6G FITC, CD3 FITC, CD11b FITC, todas 1: 50 (BD Biosciences)), o, para la FoxP3 doblemente marcada (1: 500, Abcam) con CD3 FITC (1:100, BD Biosciences) fijados en un 1% de paraformaldehído (PFA) durante 2 minutos a la temperatura del cuarto seguido por 3 minutos en un 0.01 por ciento de Tritón X en PBS. Todas las secciones fueron bloqueadas con un 10% de BSA (Sigma) que contenía un 10% de suero pre-inmunológico relevante en PBS (pH 7.4). Los tejidos fijados con metanol fueron incubados con anticuerpos primarios durante una hora a la temperatura del cuarto. Las secciones fijadas con PFA fueron incubadas con anticuerpos durante la noche a 4 °C. El FoxP3 fue visualizado utilizando Alexa 594 de cabra anti - ratón (1: 1000, Molecular Probes). Las secciones fueron contra etiquetadas con DAPI y montadas con Vectashield (Vector Laboratories). Para fines de cuantificación de las células positivas, un mínimo de 5 campos de visión de cada sección de ratón fueron examinadas, utilizando los softwares de imágenes y las configuraciones de microscopios ya mencionadas.

Histología

[0162] Las muestras de tejidos fueron fijadas durante 3 horas en etanol fijador de Carnoy (60% (volumen/volumen) de etanol, un 30% (volumen/volumen) de cloroformo y un 10% (volumen/volumen) de ácido acético glacial) a la temperatura del cuarto con agitación constante. Las muestras fueron transferidas a un 70% de etanol y almacenadas a la temperatura del cuarto hasta que fueron orientadas para un seccionamiento transversal y adheridas en resina de curación en frío utilizando a Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El tejido adherido fue montado en bloques histológicos utilizando a Technovit 3040 (Heraeus Kulzer). 4 secciones micrónicas fueron cortadas utilizando a un micrótomo rotatorio (Leica Autocut) encajados con un cuchillo de vidrio (TAAB Laboratories Equipment Ltd.). Las secciones de los tejidos fueron manchadas utilizando métodos estándar de

hematoxilina/eosina y fueron examinadas con un microscopio Zeiss Axioskop equipado con x10 y x20 objetivos. Las imágenes fueron tomadas utilizando una cámara QImaging y el software Image Pro Plus.

Comparación de genomas de especies de cepas relacionadas a la Roseburia.

[0163] La persona que está haciendo esta aplicación produjo una secuencia genómica completa de R. Hominis A2-183, la cual es representada por un solo cromosoma 3,592,125-bp. Anotaciones automatizadas y manuales del genoma utilizando a la plataforma RAST revelaron la presencia de 4 operones ribosómicos, 55 ARNs y 3273 proteínas pronosticadas. La distribución categórica del subsistema para R hominis A2-183, *R. inulinivorans* DSM 16841, *R. intestinalis* L1-82, *R. intestinalis* M50/1 y *Eubacterium rectale* ATCC 33656 se muestran en las figuras 11-15 respectivamente.

[0164] Esta información muestra las diferencias en número de genes (presentadas en corchetes) en cada sub-sistema funcional. Estos genes son muy importantes para regular la respuesta de la afición a cada bacteria individual. En una forma importante, estos genes, en número y en función, son diferentes entre las varias cepas. Los resultados son resumidos a continuación:

R. Hominis A2-183
Pared y cápsula celular (57)
Transporte de membranas (24)
Motilidad y quimiotaxis (49)
Regulación y señalización celular (16)
Dormancia y esporulación (12)
Carbohidratos (271)
E. Rectale ATCC 33656
Pared y cápsula celular (41)
Transporte de membranas (13)
Motilidad y quimiotaxis (16)
Regulación y señalización celular (9)
Dormancia y esporulación (6)
Carbohidratos (172)

R. Intestinalis l1- 82
Pared y cápsula celular (35)
Transporte de membranas (36)
Motilidad y quimiotaxis (15)
Regulación y señalización celular (10)
Dormancia y esporulación (17)

R. ***Intestinalis* m50/1**
Pared y cápsula celular (28)
Transporte de membranas (37)
Motilidad y quimiotaxis (17)
Regulación y señalización celular (10)
Dormancia y esporulación (17)
Carbohidratos (201)

R. ***Inulinovorans*** dsm 16841
Pared y cápsula celular (69)
Transporte de membranas (26)
Motilidad y quimiotaxis (14)
Regulación y señalización celular (9)
Dormancia y esporulación (17)
Carbohidratos (160)

La identidad secuencial porcentual de más de 3000 genes encontrada en el cóntigo 1 resalta las diferencias entre los genomas bacterianos de R. Hominis y las bacterias de *E. rectale, R. intestinalis* y *R. inulinivorans*

[0165] Se realizaron comparaciones entre los genomas de varias especies de Roseburia y las especies relacionadas de *Eubacterium rectale,* el pariente más cercano a la R. Hominis.

Genoma referencial de R. Hominis 585394.12
Genoma de E. Rectale ATCC336556 515619.3
R. Intestinalis L1-82166486.4
R. intestinalis M50/1166486.5
R. inulinovorans DSM16841 622312.3

[0166] La identidad porcentual de genes potenciales entre los varios genomas de la Roseburia varían desde el 0% a alrededor del 90% de identidad secuencial. Muchos genes son hipotéticos y varían entre las cepas. Montos grandes de genes están presentes en los genomas del R. Hominis que están ausentes de genomas en las otras especies de Roseburia.

[0167] La Roseburia hominis tiene 924 genes que no se encuentran en los otros genomas de las otras especies de Roseburia (0% de identidad) indicando que casi el 25% de su genoma es único para el R. Hominis. Además, la baja homología entre los otros genes (<10-70%) indica que las funciones de muchos otros genes muy posiblemente difieran también.

[0168] La información suministra evidencia convincente de que estas bacterias son muy diferentes a una perspectiva genómica y funcional, y no pueden agruparse por otro factor aparte de su parentesco filogenético, que generalmente se basa en el gen ribosómico 16S conservado que es una pieza conservada de ADN procariota encontrada en todas las bacterias. Las secuencias genéticas del ARNr de 16S son utilizadas para estudios de la filogenia y taxonomía bacteriana (un marcador genético compartido).

Funcionalidad en relación a la respuesta y a la inmunidad del anfitrión es específica para la cepa bacteriana

[0169] La figura 9 ilustra una comparación de información de expresión genética para 3 cepas de bacterias provenientes del agrupamiento XIVa (firmicutes), específicamente la Roseburia hominis, la E. Rectale y la Roseburia intestinalis. La información indica el número de genes únicos expresados por las cepas bacterianas relacionadas filogenéticamente después de su exposición a las células epiteliales humanas. La expresión genética fue determinada al usar microformaciones humanas Affymetrix que contenían a 56,000 genes. Esta diferencia refleja las diferencias en sus genomas respectivos. [Estos experimentos son similares a aquellos descritos en otras secciones en la especificación utilizando microformaciones de ratones, pero se usó microformaciones humanas específicas. El ensayo Plus 2.0 de genoma humano U133 GeneChip® es la primera y más integrada formación de expresión genómica humana completa. La microformación de la formación Plus 2.0 de genoma humano U133 Affymetrix GeneChip® (HG-U133 Plus 2.0) comprende a 1'300.000 características únicas de oligonucleótidos que abarcan a 47.000 transcripciones y variaciones, que, a su vez, representan aproximadamente 39.000 de los genes humanos mejormente caracterizados. Las líneas celulares utilizadas para evaluar las respuestas de señalización inducidas por las diferentes bacterias comensales incluyen a las células Caco-2 de la línea celular del colon humano y células HT-29 y bacterias incluyendo a *R. hominis, E. rectale* y *R. intestinalis* y comparadas en contra de la *Salmonella enteritidis,* un patógeno entérico.

Diferencias funcionales en las bacterias de la agrupación XIVa de acuerdo a la comparación entre el R. Hominis y el E. rectale

[0170] La figura 10 muestra que la Roseburia hominis induce a A20, un regulador negativo de la señalización de NF-κB con actividades anti-inflamatorias potentes mientras que otras cepas bacterianas no tuvieron ningún efecto. La partícula flagelina de la Roseburia hominis también induce a A20 a diferencia del Eubacterium rectale, una bacteria relacionada.

[0171] Los reactivos de los cultivos celulares, a menos que se especifique otra forma, fueron suministrados por Sigma-Aldrich, las líneas celulares Caco-2 (ECACC Cat No. 860102002) y HT29 (ATCC) cultivadas en un Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementadas con un 10% de Suero Bovino Fetal (FBS - Fetal Bovine Serum) (Gibco, Reino Unido), 200 mM de L-glutamina y 1% de antibióticos/antimicóticos fueron sembrados en placas transwell de 6 pozos (Corning). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO_2 hasta 3 días después de la confluencia, lavadas con la solución de Hanks para remover antibióticos y FCS y se atemperó en DMEM suplementado con el E-glutamina, selenito de sodio y transferrina durante 24 horas sin antibióticos. Las inserciones transwell fueron transferidas a una caja de cultivo anaeróbico dentro de la estación de trabajo anaeróbica a 37 °C. El compartimiento superior de cada inserción fue llenado con un medio celular DMEM anaeróbico, mientras que el compartimiento inferior fue llenado con DMEM oxigenado.

[0172] La roseburia hominis A2-183 y E. rectale ATCC336556 en un medio de cultivo YCFA y M2 estándar y salmonella entérica serovar *enteritidis* cultivada en un caldo LB fue cosechada a la fase exponencial por medio de centrifugación a 3500xg durante 5 minutos. El pelete fue lavado y suspendido en DMEM anaeróbico. 100 µl de suspensión bacteriana (108 CFU/mL) fueron agregados a los pozos experimentales. Los pozos de control recibieron el mismo monto de medio sin células bacterianas. El control adicional incluyó a células bacterianas incubadas sin las células Caco-2 o HT29.

[0173] Las células bacterianas y eucariotas fueron cosechada después de 2 horas y 4 horas de incubación. Ambas bacterias no adherentes y adherentes fueron aspiradas y almacenadas en RNAlater. Las células Caco-2 o las células HT-29 fueron cosechadas de los pozos y también fueron almacenadas en RNAlater.

Formación de luciferasas para determinar la expresión genética de luciferasas A20

[0174] El reactivo de transfección Fugene® 6 (Roche, Reino Unido) fue utilizado para la transfección de células HT29 con los plásmidos que portaban al gen reportado de luciferasas bajo el control del promotor A20 pLuc-A20 y pLuc-A20A NF-κB (mutados en 3 nucleótidos en la región promotora A20) y el agente portador GFP bajo el control del promotor A20 pCAGGSGFP1A20 y pLuc-GL2\ NF-κB. Después de 48 horas, las células fueron estimuladas con bacterias vivas de las especies R. hominis, E. rectale y S. enteritidis y flagelinas recombinantes; *S. enteritidis* y *R. hominis (Fla 1)* (100 ng/ml) durante 9, 12 y 24 horas. La flagelina recombinante fue generada utilizando secuencias de longitud completa clonadas en vectores apropiados y expresadas en E. Coli JM109, BL21 y Rosetta. Las actividades de las luciferasas (luciérnaga - f-Luc y renilla - r-Luc) fueron determinadas utilizando el sistema de ensayos de luciferasa Dual-Glo® (Promega, Reino Unido) y un lector de varias etiquetas Envision 2102. La actividad reportadora relativa de la luciferasa fue obtenida por medio de una normalización al control de renilla.

[0175] Varias modificaciones y variaciones de los aspectos descritos del invento serán aparentes para aquellas personas con conocimiento en la industria sin apartarse del enfoque y del espíritu del invento. Aunque el invento ha sido descrito en conexión con secciones preferidas específicas, debe entenderse que el invento tal como es declarado no deberá ser limitado indebidamente a aquellas secciones específicas. De hecho, varias modificaciones de las modalidades descritas para ejecutar el invento, que son obvias para aquellas personas con conocimiento en la industria en los campó relevantes tienen la intención de estar dentro del enfoque de las siguientes reivindicaciones.

REFERENCIAS

[0176]

1. Spor, A., Koren, O., & Ley, R. (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut
microbiome (Esclareciendo los efectos del entorno y del genotipo anfitrión en la microbioma intestinal). Nat. Rev. Microbiol. 9: 279-290.

2. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., &
Relman, D. A. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora (Diversidad de la flora microbiana intestinal humana). Ciencia 308: 1635-1638.

3. Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., & Lamarre, A. (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against
pathogenic and non-pathogenic microorganisms (Respuestas IgA en la mucosa intestinal en contra de microorganismos patogénicos y no patogénicos). Microbes. Infect. 3: 1021-1035.

4. Macpherson, A. J., Martinic, M. M., & Harris, N. (2002) The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine (Las funciones de las células T de la mucosa para contener a la flora comensal originaria del intestino). Cell (célula) Mol. Life (vida) Sci. 59: 2088-2096.

5. Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005) An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system (Una molécula inmunomoduladora de bacterias simbióticas dirige la maduración del sistema inmunológico anfitrión). Cell (Célula) 122: 107-118.

6. Chung, H. & Kasper, D. L. (2010) Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis (Mecanismos inmunológicos estimulados por la microbiota para mantener la homeostasis intestinal). Curr.
Opin. Immunol. 22: 455-460.

7. Macpherson, A. J. (2006) IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine (Adaptación del IgA a la presencia de bacterias comensales en el intestino). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 308: 117-136.

8. Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De,
P. M., Brandi, G. et al. (2009) The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut
helper T cell responses (El rol clave de bacterias filamentosas segmentadas en la maduración coordinada de las respuestas de las células T que apoyan al intestino). Immunity (Inmunidad). 31: 677-689.

9. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A.,

Lynch, S. V. et al. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria (Inducción de las células Th17 intestinales por las bacterias filamentosas segmentadas). Cell (Célula) 139: 485-498.

10. Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A., Ng, D. C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D., y Macpherson,
A. J. (2011) Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. Impunity (La colonización bacteriana intestinal induce respuestas regulatorias mutuas de las células T. Impunidad).

11. Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., y Flint, H. J. (2006) Proposal of Roseburia
faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces. (Propuesta de Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. y Roseburia inulinivorans sp. nov., basada en aislamientos provenientes de heces humanas) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2437-2441.

12. Mahowald, M. A., Rey, F. E., Seedorf, H., Turnbaugh, P. J., Fulton, R. S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C.,
Magrini, V., Wilson, R. K. et al. (2009) Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its
two dominant bacterial phyla (Caracterización de una microbiota intestinal humana modelo compuesta de miembros de sus 2 filos bacterianos dominantes). Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 106: 5859-5864.

13. Aminov, R. I., Walker, A. W., Duncan, S. H., Harmsen, H. J., Welling, G. W., & Flint, H. J. (2006) Molecular
diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut
bacteria related to Roseburia spp. or Eubacterium rectale (Diversidad, cultivos y detección mejorada molecular por medio de una hibridación fluorescente in situ de un grupo dominante de bacterias intestinales humanas relacionadas a la Roseburia spp. o a la Eubacterium rectale). Appl. Environ. Microbiol. 72: 6371-6376.

14. Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but
reversible alterations in the mouse distal gut microbiome (Obesidad inducida por la dieta es ligada a alteraciones marcadas pero reversibles en el microbioma intestinal distal de los ratones). Cell Host (Anfitrión Celular). Microbe (Microbio) 3: 213-223.

15. Mallya, M., Campbell, R. D., y Aguado, B. (2006) Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members
encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands (Caracterización de los 5 miembros nuevos de la súper familia Ly-6 codificados en el MHC, y detección de células que expresan a sus ligandos potenciales). Protein (Proteína) Sci. 15: 2244-2256.

16. Letran, S. E., Lee, S. J., Atif, S. M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A. F., & McSorley,
S. J. (2011) TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell
responses to a flagellated pathogen (Ratones con deficiencias de TLR5 no tienen defectos inflamatorios ni metabólicos basales, pero muestran respuestas discapacitadas de las células T CD4 en relación a un patógeno flagelado). J Immunol. 186: 5406-5412.

17. Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., y Mazmanian, S. K. (2011) The Toll-like receptor
2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota (El sendero del receptor 2 similar a un peaje establece la colonización por un comensal de la microbiota humana). Science (ciencia) 332: 974-977.

18. Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001) Molecular analysis of
commensal host-microbial relationships in the intestine (Análisis molecular de las relaciones de microbios anfitriones y comensales en el intestino). Science (Ciencia) 291: 881-884.

19. Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S., y Conway, S.
(2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic

shuttling of PPAR-gamma and ReIA (Las bacterias intestinales anaeróbicas comensales atenúan inflamaciones al regular la movilidad nuclear-citoplásmica de PPAR-gama y ReIA). Nat. Immunol. 5: 104-112.

20. Hapfelmeier, S., Lawson, M. A., Slack, E., Kirundi, J. K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M. L., Endt, K. et al. (2010) Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses (Colonización microbiana reversible de ratones libres de gérmenes revela la dinámica de las respuestas inmunológicas de IgA). Science (Ciencia) 328: 1705-1709.

21. Elkins, C. A., Moser, S. A., y Savage, D. C. (2001) Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in Lactobacillus johnsonii 100-100 and other Lactobacillus species (Genes que codifican a hidrolasas de sal biliar y que conjugan a los transportadores de sales biliares en el Lactobacillus johnsonii 100-100 y otras especies Lactobacillus). Microbiology (Microbiología) 147: 3403-3412.

22. Louis, P., McCrae, S. I., Charrier, C., y Flint, H. J. (2007) Organization of butyrate synthetic genes in human colonic bacteria: phylogenetic conservation and horizontal gene transfer (Organización de los genes sintéticos de butirato en las bacterias colonizadoras humanas: Conservación filogenética y transferencia genética horizontal). FEMS Microbiol. Lett. 269: 240-247.

23. Peterson, G., Kumar, A., Gart, E., y Narayanan, S. (2011) Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria (Las catecolaminas incrementan la transferencia genética de conjugaciones entre las bacterias entéricas). Microb. Pathog.

24. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., y Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 (La respuesta inmunológica innata a la flagelina bacteriana es mediada por el receptor 5 similar a un peaje). Nature (Naturaleza) 410: 1099-1103.

25. Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R. et al. (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice (Eliminación de TLR5 resulta en colitis espontánea en ratones). J Clin. Invest 117:3909-3921.

26. De, P. M., Gaboriau-Routhiau, V., Rainteau, D., Rakotobe, S., Taddei, F., y Cerf-Bensussan, N. (2011) Tradeoff between bile resistance and nutritional competence drives Escherichia coli diversification in the mouse gut (Compensación entre la resistencia biliar y la competencia nutricional impulsa la diversificación de escherichia coli en el intestino de los ratones). PLoS Genet. 7: e1002107.

27. Giraud, A., Arous, S., De, P. M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J. C., Rakotobe, S., Lindner, A. B., Taddei, F., & Cerf-Bensussan, N. (2008) Dissecting the genetic components of adaptation of Escherichia coli to the mouse gut (Disección de los componentes genéticos de adaptación del escherichia coli al intestino de los ratones). PLoS Genet. 4: e2.

28. Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schonheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M. et al. (2010) The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex (El factor de transcripción cabeza granosa similar a 2 regula la composición molecular del complejo de unión apical epitelial). Development (Desarrollo) 137: 3835-3845.

29. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing (Un catálogo genético microbiano intestinal humano establecido por secuenciaciones metagenómicas). Nature (Naturaleza) 464: 59-65.

30. Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G. et al. (2007) Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity (La escherichia coli probiótica Nissle 1917 inhibe fugas intestinales al mejorar la integridad de la

mucosa). PLoS. One. 2: e1308.
31. Geraedts, M. C., Troost, F. J., Tinnemans, R., Soderholm, J. D., Brummer, R. J., & Saris, W. H. (2010) Release
of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal
mucosa (La liberación de hormonas de saciedad en respuesta a proteínas dietéticas específicas es diferente entre la mucosa intestinal delgada humana y de ratones). Ann. Nutr. Metab 56: 308-313.
32. McLaughlin, J., Grazia, L. M., Jones, M. N., D'Amato, M., Dockray, G. J., y Thompson, D. G. (1999) Fatty acid
chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility (La longitud de la cadena de ácidos grasos determina la secreción de colecistoquinina y el efecto en la motilidad gástrica humana). Gastroenterology (Gastroenterología) 116: 46-53.
33. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006) An obesityassociated gut microbiome with increased capacity for energy harvest (Una obesidad asociada con el microbioma intestinal con una capacidad incrementada para la cosecha energética). Nature (Naturaleza) 444: 1027-1031.
34. Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., & Backhed, F. (2010) A role for the gut microbiota in energy harvesting? (¿Un rol para la microbiota intestinal en la cosecha de energía?) Gut (Intestinos) 59: 1589-1590.
35. Chevreux, B., Wetter, T., y Suhai, S. (1999) Genome sequence assembly using trace signals and additional
sequence information (Ensamblaje de secuencias genómicas utilizando señales de rastreo e información secuencial adicional). Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (Informática y Biología: Actas de la Conferencia Alemana de Bioinformática) (GCB) 99: 45-56.
36. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.
M., Kubal, M. et al. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology (El servidor RAST: anotaciones rápidas utilizando tecnología de subsistemas). BMC Genomics (Genómica) 9: 75.
37. Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., y Lempicki, R. A. (2003) DAVID:
Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (Base de datos de anotaciones, visualizaciones y descubrimientos integrados). Genome (Genomas) Biol. 4: 3.
38. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., y Leunissen, J. A. (2007) Primer3Plus, an
enhanced web interface to Primer3 (Primer3Plus un interfaz web mejorado para Primer3). Nucleic Acids (Ácidos Nucleicos) Res. 35: W71-W74.

39. Duck, L. W., Walter, M. R., Novak, J., Kelly, D., Tomasi, M., Cong, Y., y Elson, C. O. (2007) Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease (Aislamiento de bacterias flageladas implicadas en la enfermedad de Crohn). Inflamm. Bowel (Intestinos). Dis. 13: 1191-1201.

40. Olivera, L., Canul, R. R., Pereira-Pacheco, F., Cockburn, J., Soldani, F., McKenzie, N. H., Duncan, M., OlveraNovoa, M. A., & Grant, G. (2003) Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins), or starch (Respuestas nutricionales y fisiológicas de ratas jóvenes en desarrollo a dietas que contienen comidas de semillas de caupí cruda, aislados proteínicos (globulinas), o almidón). J Agric. Food (Alimento) Chem. 51: 319-325.
41. Sokol H., et al, PNAS, 28 de octubre de 2008, Vol 105, No 43, 16731-16736.

LISTAS DE SECUENCIAS

[0177]

<110> GT Biologies Ltd
<120> Bacterias para su uso como probióticos para aplicaciones nutricionales y médicas

<130> P043712PCT

<140> PCT/GB2012/05249

<141> 2012-10-08
<150> GB 1117313.5
<151> 2011-10-07
<160> 4
<170> Versión de patentes 3.5
<210> 1
<211> 15

<212> PRT
<213> Roseburia hominis
<400> 1

Ala Gln Tyr Asn Asp Asp Ala Lys Ser Val Leu Glu Ile Leu Lys
15

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Roseburia hominis

<400> 2

Gly Leu Asn Lys Ala Ser Arg Asn Ser Gln Asp Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 18

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda bacteriana general Eub338
<400> 3
gctgcctccc gtaggagt 18
<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda específica de Roseburia hominis A2-183
<400> 4
gtacattaca tactctgtca gtg 23

Reivindicaciones

1. La especie bacteriana Roseburia hominis para su uso en la medicina.

2. Una composición farmacéutica que comprende a la especie bacteriana Roseburia hominis en un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

3. Un suplemento nutricional que comprende a la especie bacteriana Roseburia hominis y a un excipiente, portador o diluyente nutricionalmente aceptable.

4. Una composición probiótica que comprende a la especie bacteriana Roseburia hominis.

5. Un pienso, un producto alimenticio, un suplemento dietario, un suplemento nutricional o un aditivo alimenticio que comprende a la especie bacteriana Roseburia hominis.

6. La especie bacteriana Roseburia hominis para su uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la especie bacteriana es usada en la regulación del sistema inmunológico de un sujeto.

7. La especie bacteriana para su uso de acuerdo a la reivindicación 6 donde la regulación del sistema inmunológico es la regulación del sistema inmunológico adaptivo de un sujeto.

8. La especie bacteriana para su uso de acuerdo a la reivindicación 6 donde la regulación del sistema inmunológico es la regulación del sistema inmunológico innato de un sujeto.

9. La especie bacteriana Roseburia hominis para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la especie bacteriana es usada en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica de un sujeto.

10. La especie bacteriana Roseburia hominis para su uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la especie bacteriana es utilizada en el tratamiento de un trastorno inmunológico en un sujeto.

11. La especie bacteriana ser usada de acuerdo a la reivindicación 10, donde el trastorno inmunológico es seleccionado de colitis ulcerativa, pouchitis, otras condiciones autoinmunes incluyendo a la artritis reumatoide, a la psoriasis, a la esclerosis múltiple, a alergias incluyendo a la enfermedad celíaca, a la dermatitis atópica y a la rinitis.

12. La especie bacteriana Roseburia hominis para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la especie bacteriana es utilizada en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de un trastorno inflamatorio, un trastorno inmunológico y un trastorno intestinal en un sujeto.

13. La especie bacteriana para su uso de acuerdo a la reivindicación 12, donde la enfermedad es seleccionada del síndrome de intestino irritable (IBS - irritable bowel syndrome), colitis, trastorno intestinal inflamatorio (IBD - inflammatory bowel disorder), incluyendo a la enfermedad de Crohn y a la colitis ulcerativa, pouchitis, dispepsia funcional, constipación funcional, diarrea funcional (incluyendo a diarrea asociada con antibióticos, diarrea de viajeros y diarrea pediátrica), dolores abdominales funcionales, gases abdominales funcionales, el síndrome de dolor epigástrico, el síndrome de estrés postprandial, la enfermedad de reflujo gastrointestinal (GERD - gastrointestinal reflux disease), enfermedades autoinmunes tales como la diabetes, la artritis, la esclerosis múltiple y alérgicas de soriasis, enfermedades utópicas, por ejemplo, la dermatitis atópica, la enterocolitis necrotizante, otras infecciones, y sus combinaciones.

14. La especie bacteriana Roseburia hominis para su uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la especie bacteriana es utilizada para mejorar la microbiota intestinal en un sujeto.

15. La especie bacteriana Roseburia hominis para ser usada de acuerdo a la reivindicación 1 donde la especie bacteriana es utilizada para promover la salud intestinal en un sujeto.

16. La especie bacteriana Roseburia hominis para ser usada de acuerdo a la reivindicación 1 donde la especie bacteriana es utilizada para promover las células Tregs y los mecanismos de tolerancia en el sistema inmunológico de un sujeto.

17. La especie bacteriana para ser usada de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 16, donde la especie bacteriana:

    (i) regula la inducción y/o la expresión de por lo menos un gene de movilización o de quimiotaxis, más preferiblemente la regulación-incremento de la expresión de un gen seleccionado de *MobA* y *MobL;* o
    (ii) regula por lo menos a un gen seleccionado de *FlaA1, Fla2, FlaA3,* y *FlaB;* o

(iii) regula la expresión de por lo menos uno de los siguiente: La acetiltransferasa de acetil-CoA, la deshidrogenasa de 3-hidroxiacil-CoA, la deshidrogenasa de butiril-CoA, la subunidad beta flavoproteínica de transferencia de electrones, la subunidad alfa flavorpoteínica de transferencia de electrones; o

(iv) regula-reduce la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *gt, Cartpt, Cck, Cxcl12* y *Gcg;* o

(v) activa por lo menos un gen de respuesta inmunológica en el colon o en el íleon; o

(vi) activa la respuesta inmunológica adaptiva al regular la inducción y/o la expresión de los genes asociados con la regulación de las células T; o

(vii) regula-incrementa la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *Ly6g6c* y *Ly6g6e en el colon ascendente; o*

(viii) regula la expresión de por lo menos un gen seleccionado de *Tlr5, Tlr1, Vnn1, Defb37, Pla2g, Muc16, Itln, Sprr1a, Cldn4, Pmp22, Crb3, Magi3, Marveld3, Mpp7, Defcr20, Pcgf2, Ltbp4, Igsf8* y *Tcfe2a.*

18. La especie bacteriana para ser usada de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un humano.

19. Un proceso para producir a una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho proceso comprende la mezcla de la especie bacteriana Roseuria hominis con un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20. Un proceso para producir un suplemento nutricional de acuerdo a la reivindicación 3, donde dicho proceso comprende la mezcla de la especie bacteriana Roseburia hominis con un excipiente, portador o diluyente nutricionalmente aceptable.

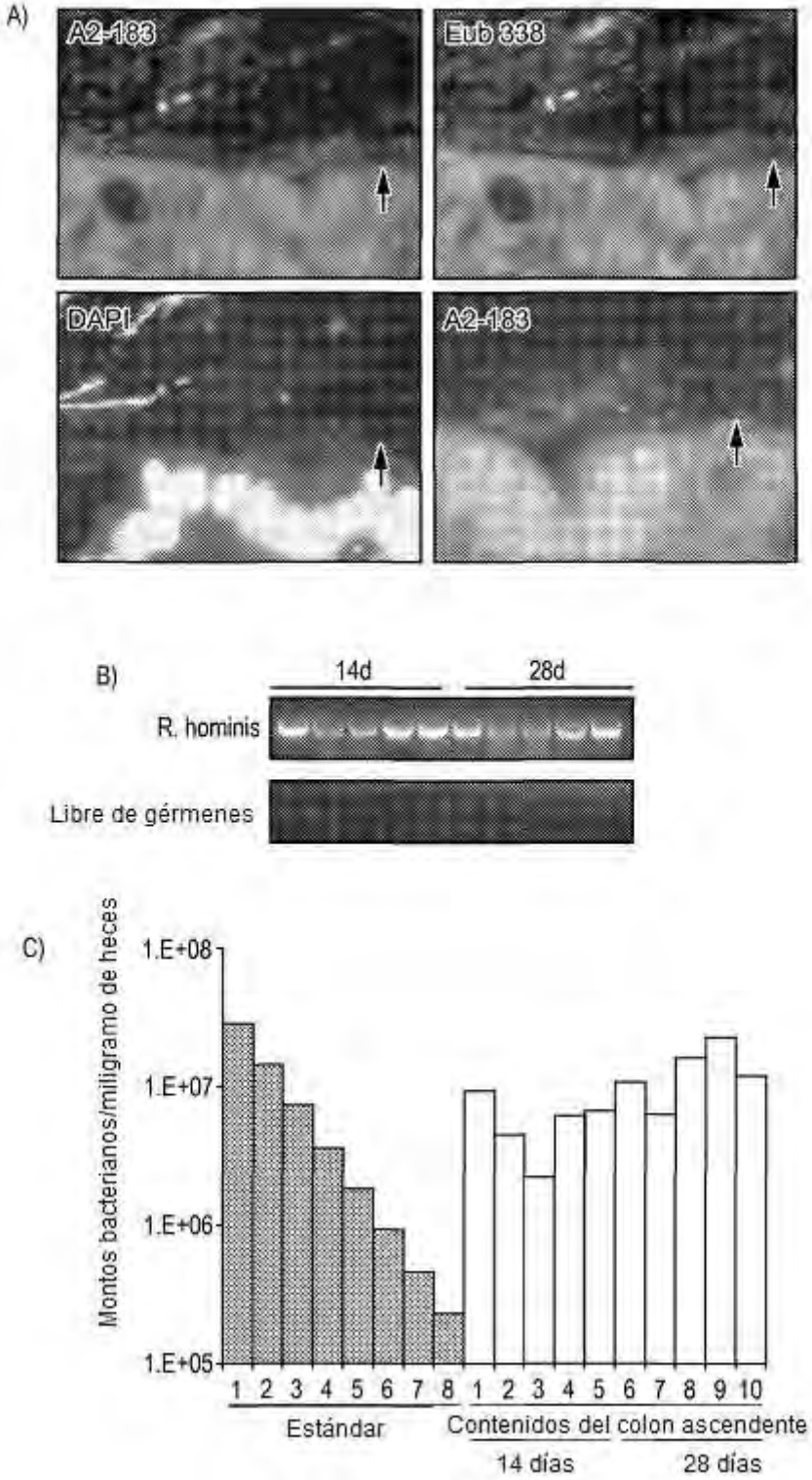

A)
A2-183
Eub 338
DAPI
A2-183
B)
14d
28d
R. hominis
Libre de gérmenes
C)
Montos bacterianos/miligramo de heces
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Estándar
Contenidos del colon ascendente
14 días
28 días

FIG. 1

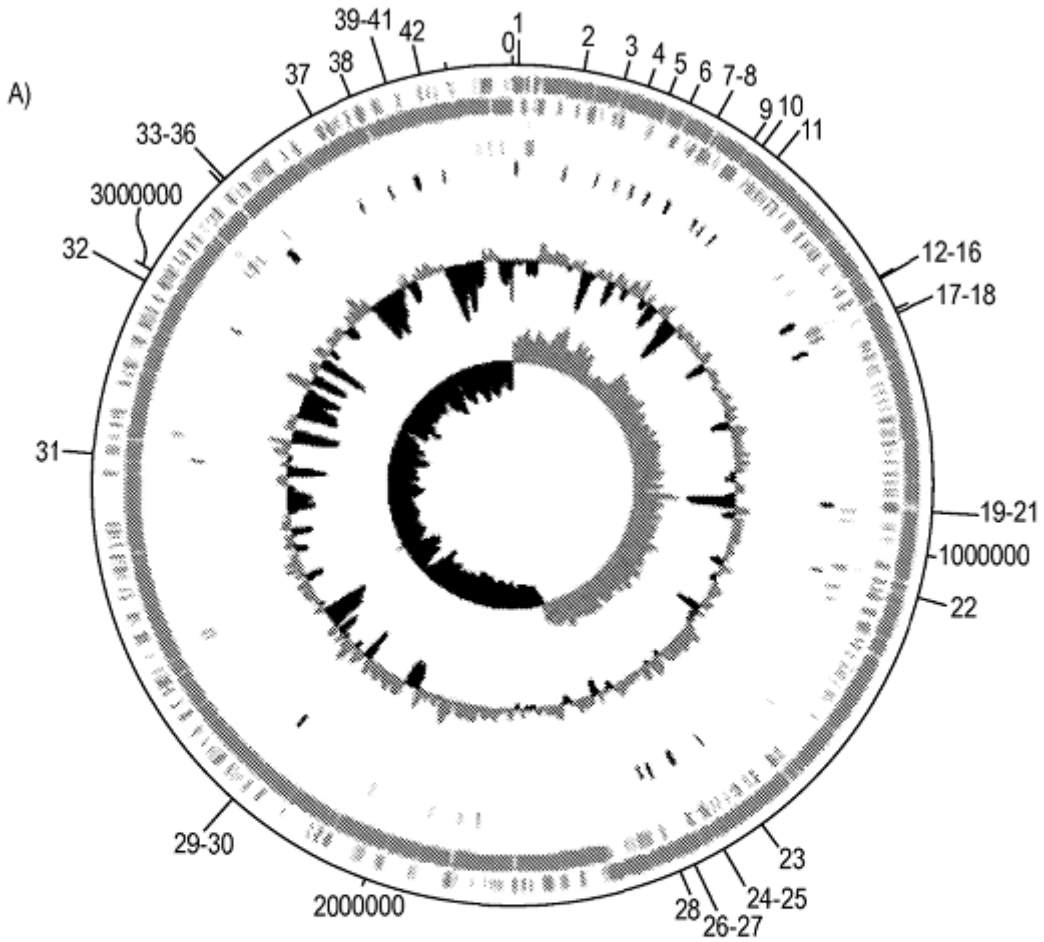

A)
0
1
2
3
4
5
6
7-8
9
10
11
12-16
17-18
19-21
1000000
22
23
24-25
26-27
28
2000000
29-30
31
32
3000000
33-36
37
38
39-41
42

FIG. 2

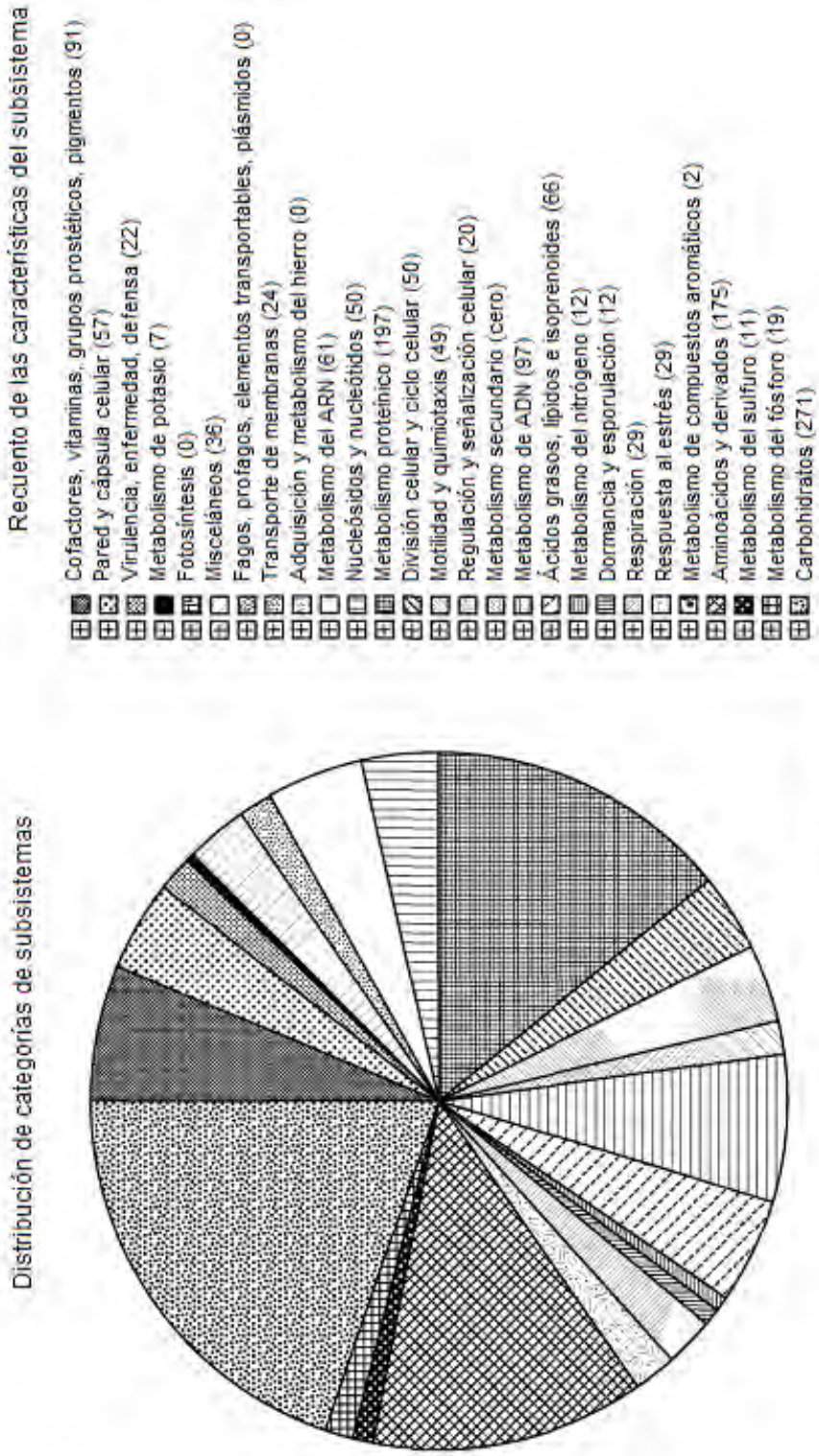

B)
Distribución de categorías de subsistemas
Recuento de las características del subsistema
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (91)
Pared y cápsula celular (57)
Virulencia, enfermedad, defensa (22)
Metabolismo de potasio (7)
Fotosíntesis (0)
Misceláneos (36)
Fagos, profagos, elementos transportables, plásmidos (0)
Transporte de membranas (24)
Adquisición y metabolismo del hierro (0)
Metabolismo del ARN (61)
Nucleósidos y nucleótidos (50)
Metabolismo proteínico (197)
División celular y ciclo celular (50)
Motilidad y quimiotaxis (49)
Regulación y señalización celular (20)
Metabolismo secundario (cero)
Metabolismo de ADN (97)
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides (66)
Metabolismo del nitrógeno (12)
Dormancia y esporulación (12)
Respiración (29)
Respuesta al estrés (29)
Metabolismo de compuestos aromáticos (2)
Aminoácidos y derivados (175)
Metabolismo del sulfuro (11)
Metabolismo del fósforo (19)
Carbohidratos (271)

FIG. 2

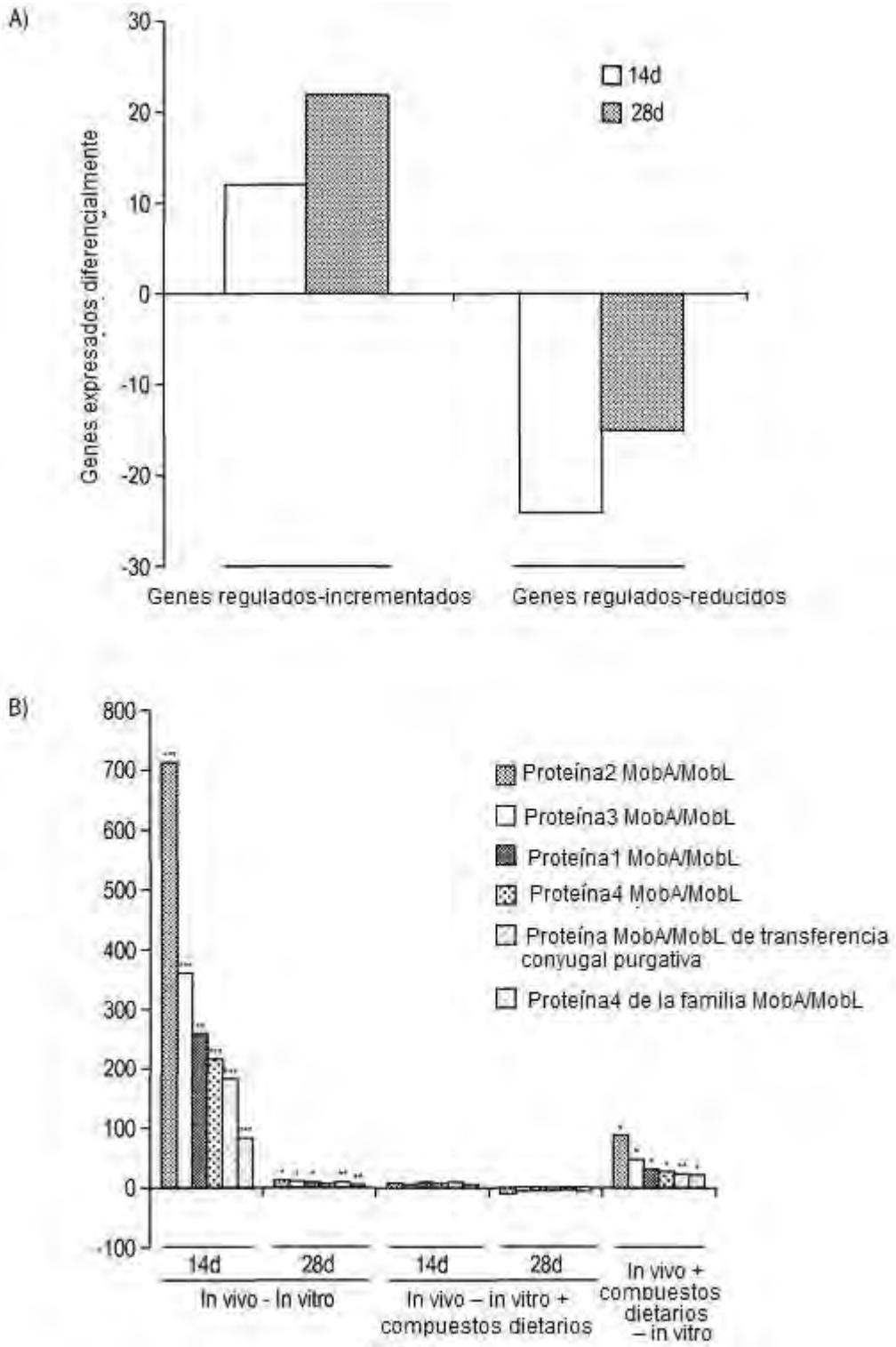
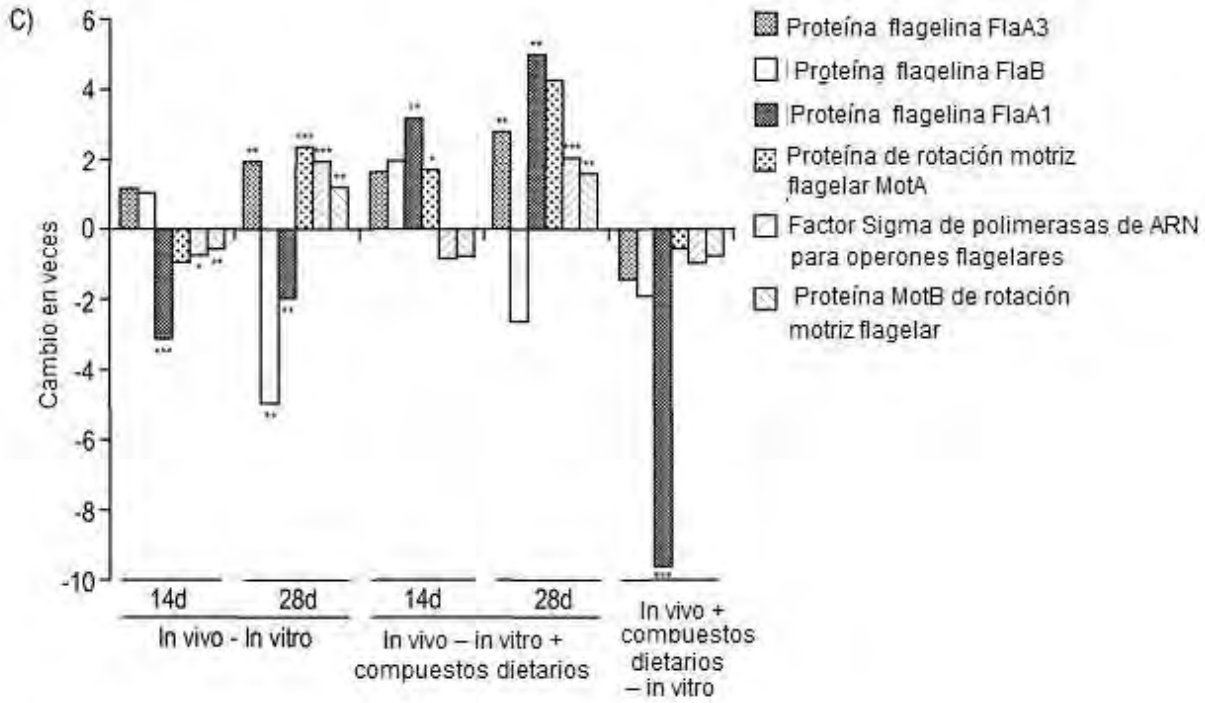
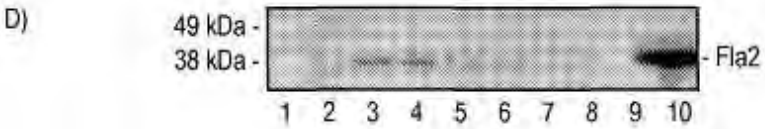

A)
30
20
10
0
-10
-20
-30
Genes expresados diferencialmente
14d
28d
Genes regulados-incrementados
Genes regulados-reducidos
B)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
Proteína2 MobA/MobL
Proteína3 MobA/MobL
Proteína1 MobA/MobL
Proteína4 MobA/MobL
Proteína MobA/MobL de transferencia conyugal purgativa
Proteína4 de la familia MobA/MobL
14d
28d
14d
28d
In vivo - In vitro
In vivo – in vitro + compuestos dietarios
In vivo + compuestos dietarios – in vitro

FIG. 3


C)
Cambio en veces
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
14d
28d
14d
28d
In vivo - In vitro
In vivo – in vitro + compuestos dietarios
In vivo + compuestos dietarios – in vitro
Proteína flagelina FlaA3
Proteína flagelina FlaB
Proteína flagelina FlaA1
Proteína de rotación motriz flagelar MotA
Factor Sigma de polimerasas de ARN para operones flagelares
Proteína MotB de rotación motriz flagelar


D)
49 kDa -
38 kDa -
- Fla2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

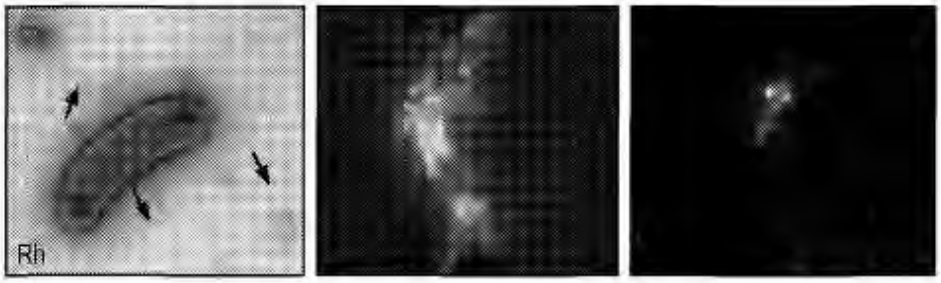

Rh

FIG. 3

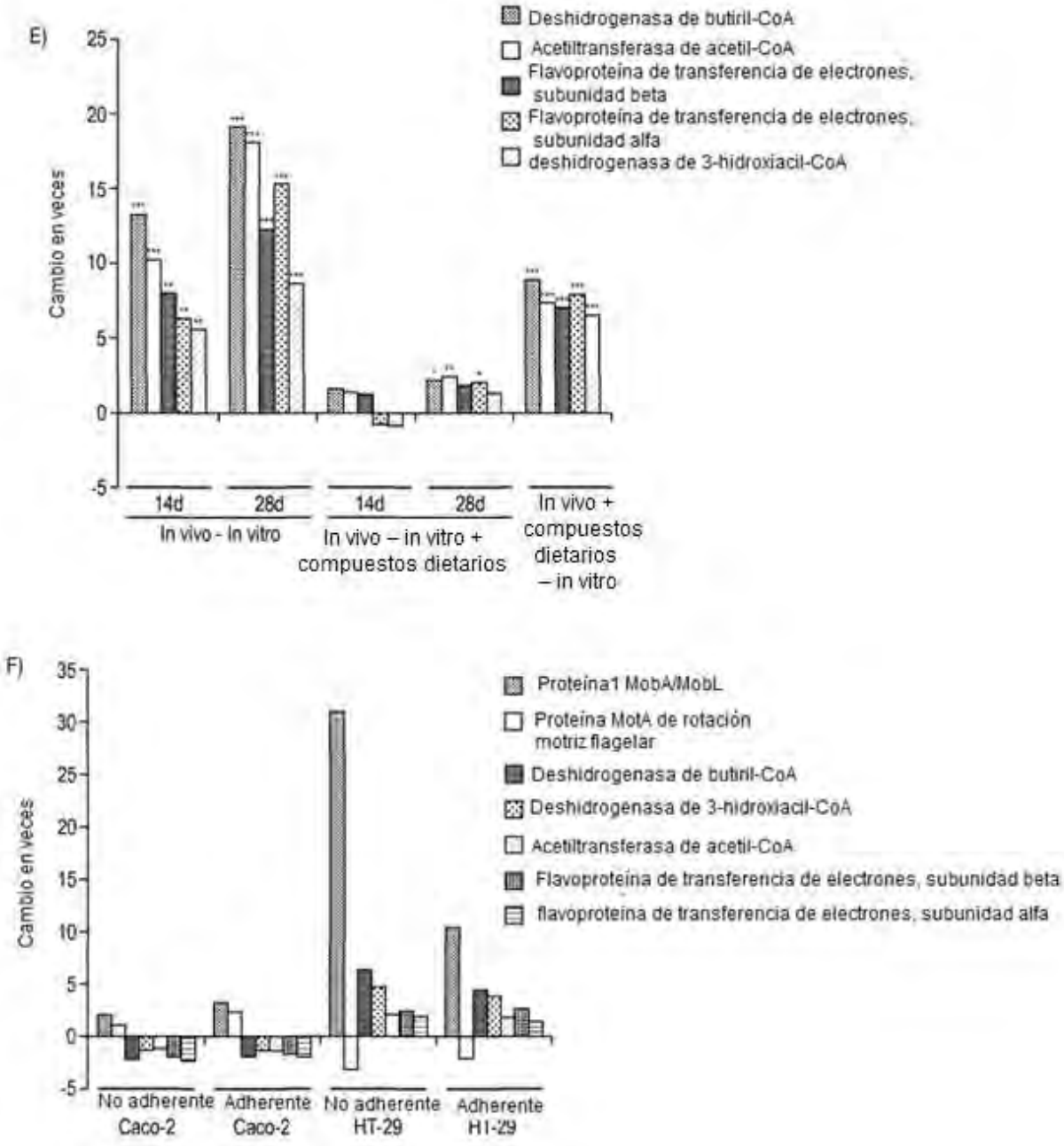

E)
Cambio en veces
25
20
15
10
5
0
-5
Deshidrogenasa de butiril-CoA
Acetiltransferasa de acetil-CoA
Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad beta
Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad alfa
deshidrogenasa de 3-hidroxiacil-CoA
14d
28d
14d
28d
In vivo - in vitro
In vivo – in vitro + compuestos dietarios
In vivo + compuestos dietarios – in vitro
F)
Cambio en veces
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
Proteína1 MobA/MobL
Proteína MotA de rotación motriz flagelar
Deshidrogenasa de butiril-CoA
Deshidrogenasa de 3-hidroxiacil-CoA
Acetiltransferasa de acetil-CoA
Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad beta
flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad alfa
No adherente Caco-2
Adherente Caco-2
No adherente HT-29
Adherente HT-29

FIG. 3

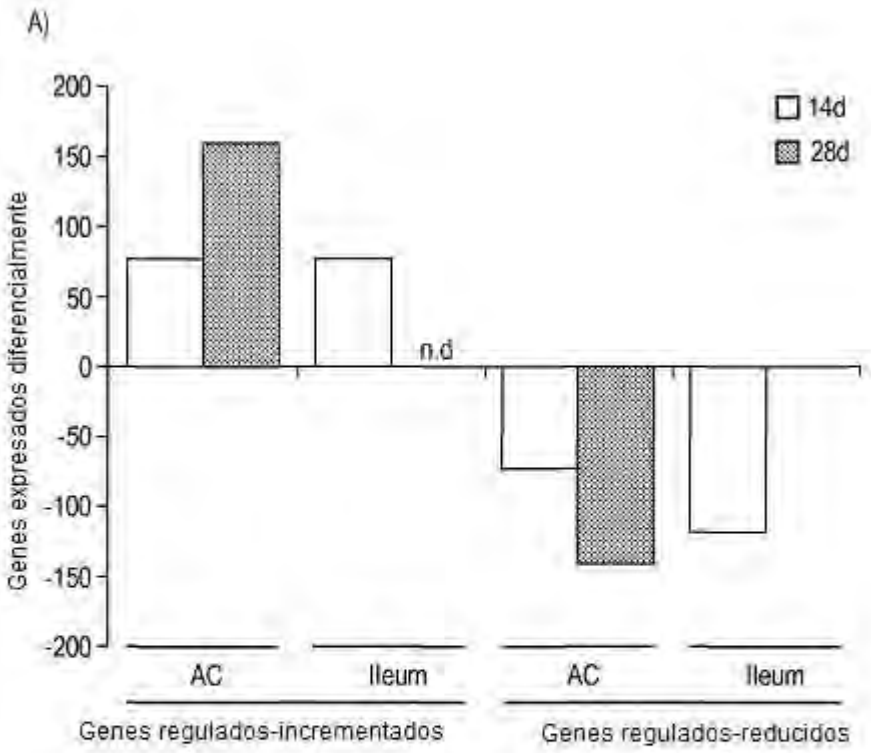

A)
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
Genes expresados diferencialmente
14d
28d
n.d
AC
Ileum
AC
Ileum
Genes regulados-incrementados
Genes regulados-reducidos

FIG. 4

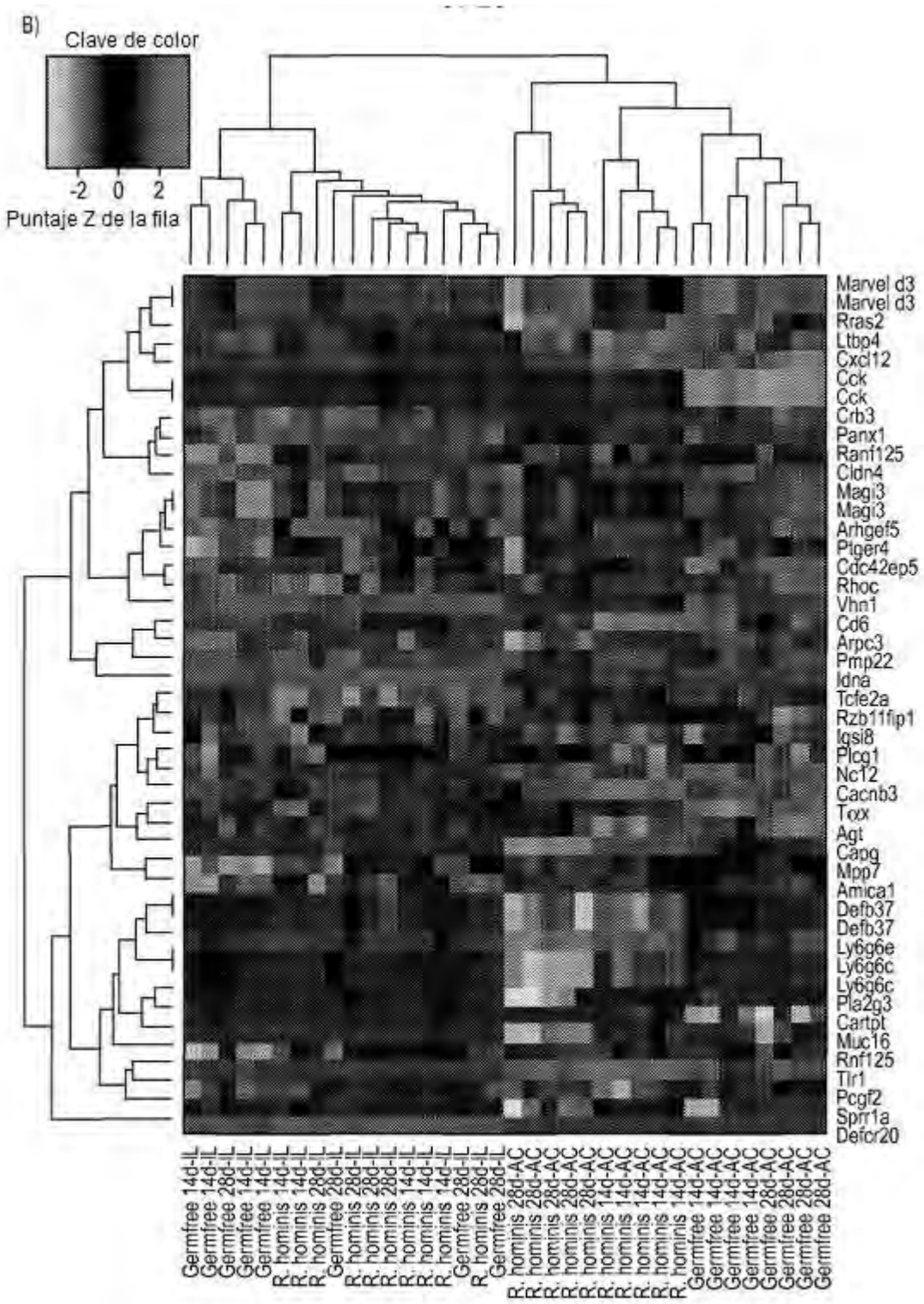

B)
Clave de color
-2 0 2
Puntaje Z de la fila
Marvel d3
Marvel d3
Rras2
Ltbp4
Cxcl12
Cck
Cck
Crb3
Panx1
Ranf125
Cldn4
Magi3
Magi3
Arhgef5
Ptger4
Cdc42ep5
Rhoc
Vhn1
Cd6
Arpc3
Pmp22
Idna
Tcfe2a
Rzb11fip1
Iqsi8
Plcg1
Nc12
Cacnb3
Tαx
Agt
Capg
Mpp7
Amica1
Defb37
Defb37
Ly6g6e
Ly6g6c
Ly6g6c
Pla2g3
Cartpt
Muc16
Rnf125
Tlr1
Pcgf2
Sprr1a
Defcr20
Germfree 14d-IL
Germfree 14d-IL
Germfree 28d-IL
Germfree 14d-IL
Germfree 14d-IL
R. hominis 14d-IL
R. hominis 14d-IL
R. hominis 28d-IL
Germfree 28d-IL
R. hominis 28d-IL
R. hominis 28d-IL
R. hominis 28d-IL
R. hominis 14d-IL
R. hominis 14d-IL
R. hominis 14d-IL
Germfree 28d-IL
R. hominis 28d-IL
Germfree 28d-IL
R. hominis 28d-AC
R. hominis 28d-AC
R. hominis 28d-AC
R. hominis 28d-AC
R. hominis 28d-AC
R. hominis 14d-AC
R. hominis 14d-AC
R. hominis 14d-AC
R. hominis 14d-AC
R. hominis 14d-AC
Germfree 14d-AC
Germfree 14d-AC
Germfree 14d-AC
Germfree 14d-AC
Germfree 28d-AC
Germfree 28d-AC
Germfree 28d-AC
Germfree 28d-AC

FIG. 4

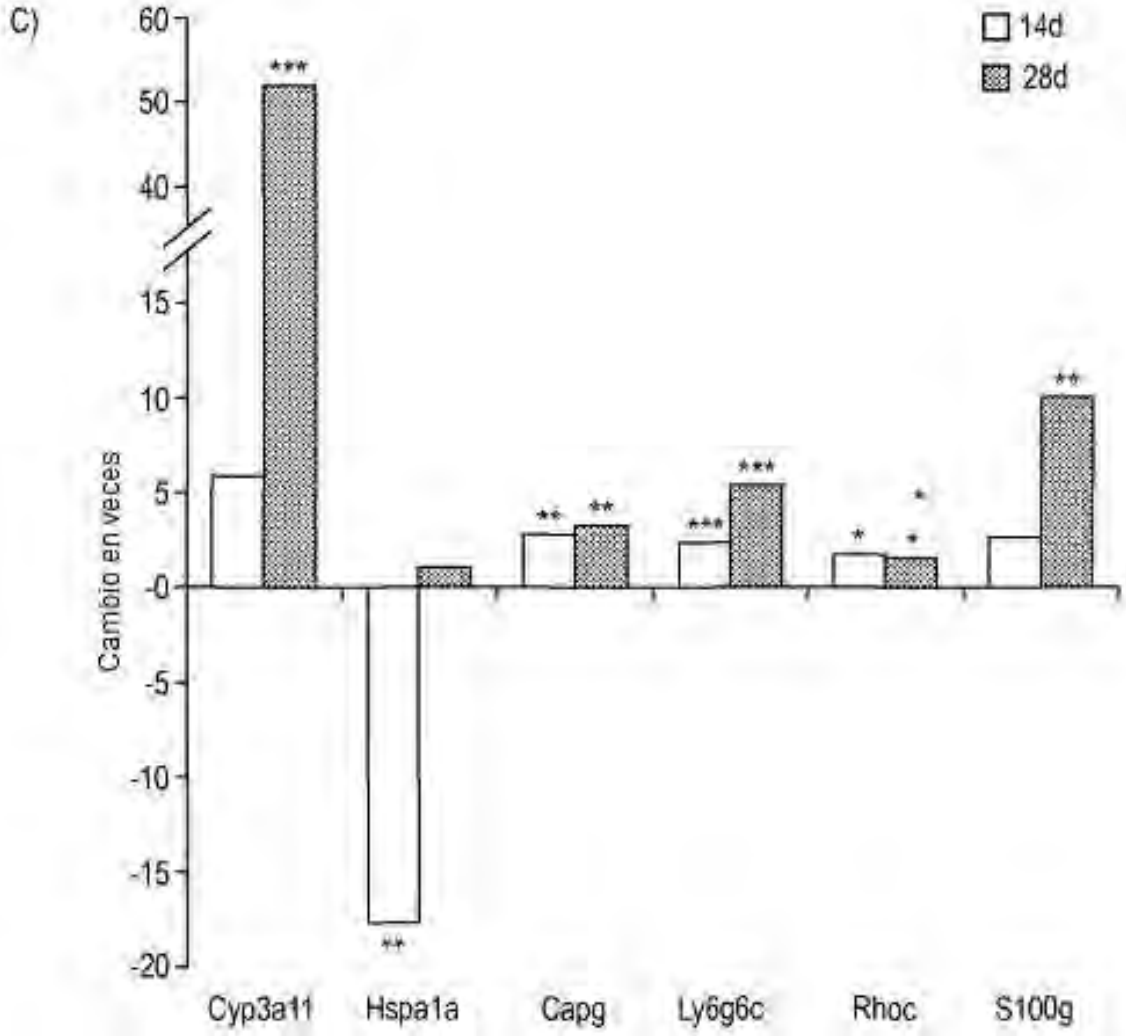

C)
14d
28d
Cambio en veces
60
50
40
15
10
5
-0
-5
-10
-15
-20
***
**
**
**
***
***
*
*
*
**
Cyp3a11
Hspa1a
Capg
Ly6g6c
Rhoc
S100g

FIG. 4

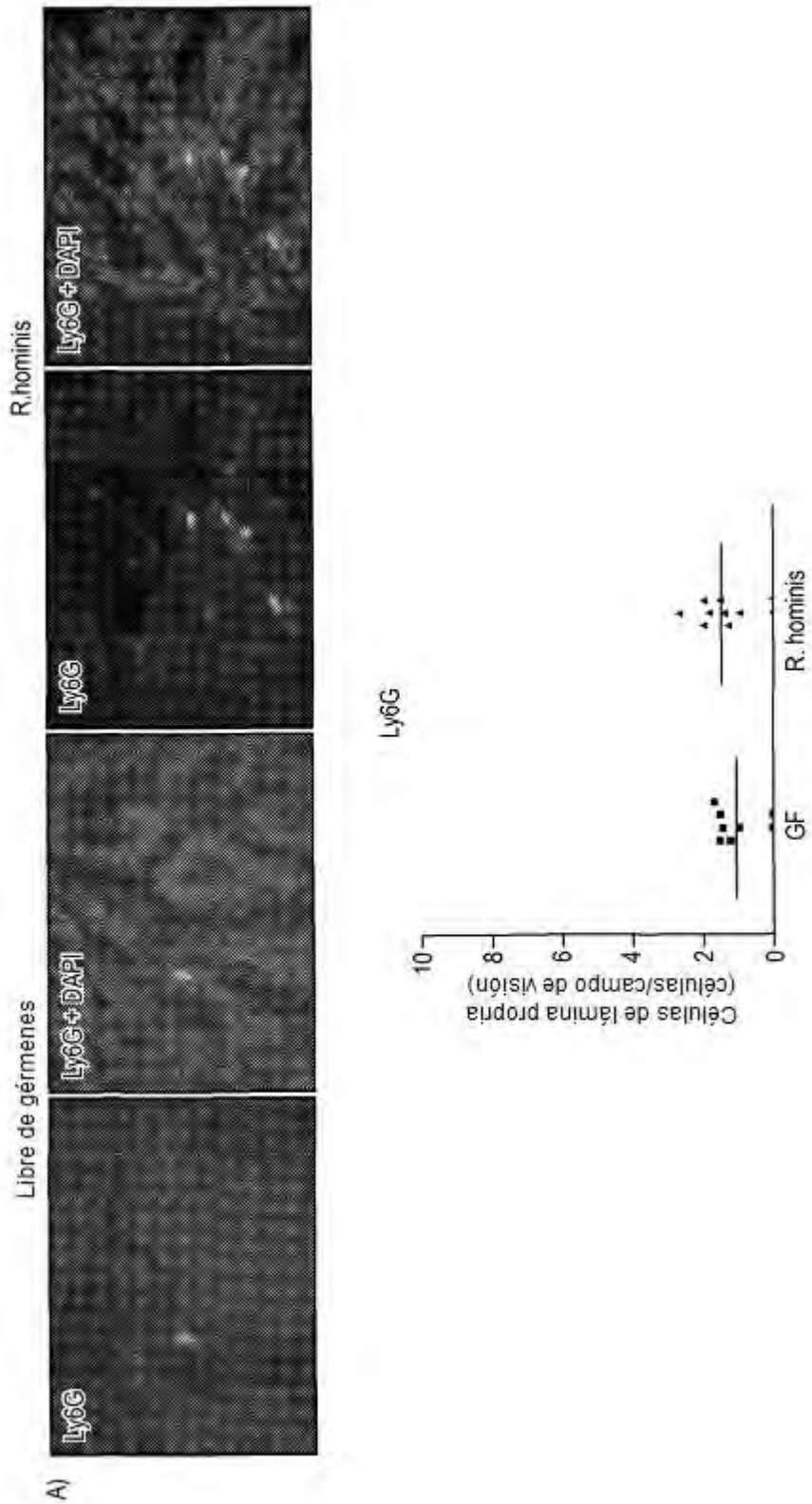

A)
Libre de gérmenes
R.hominis
Ly6G
Ly6G + DAPI
Ly6G
Ly6G + DAPI
Ly6G
Células de lámina propria
(células/campo de visión)
10
8
6
4
2
0
GF
R. hominis

FIG. 5

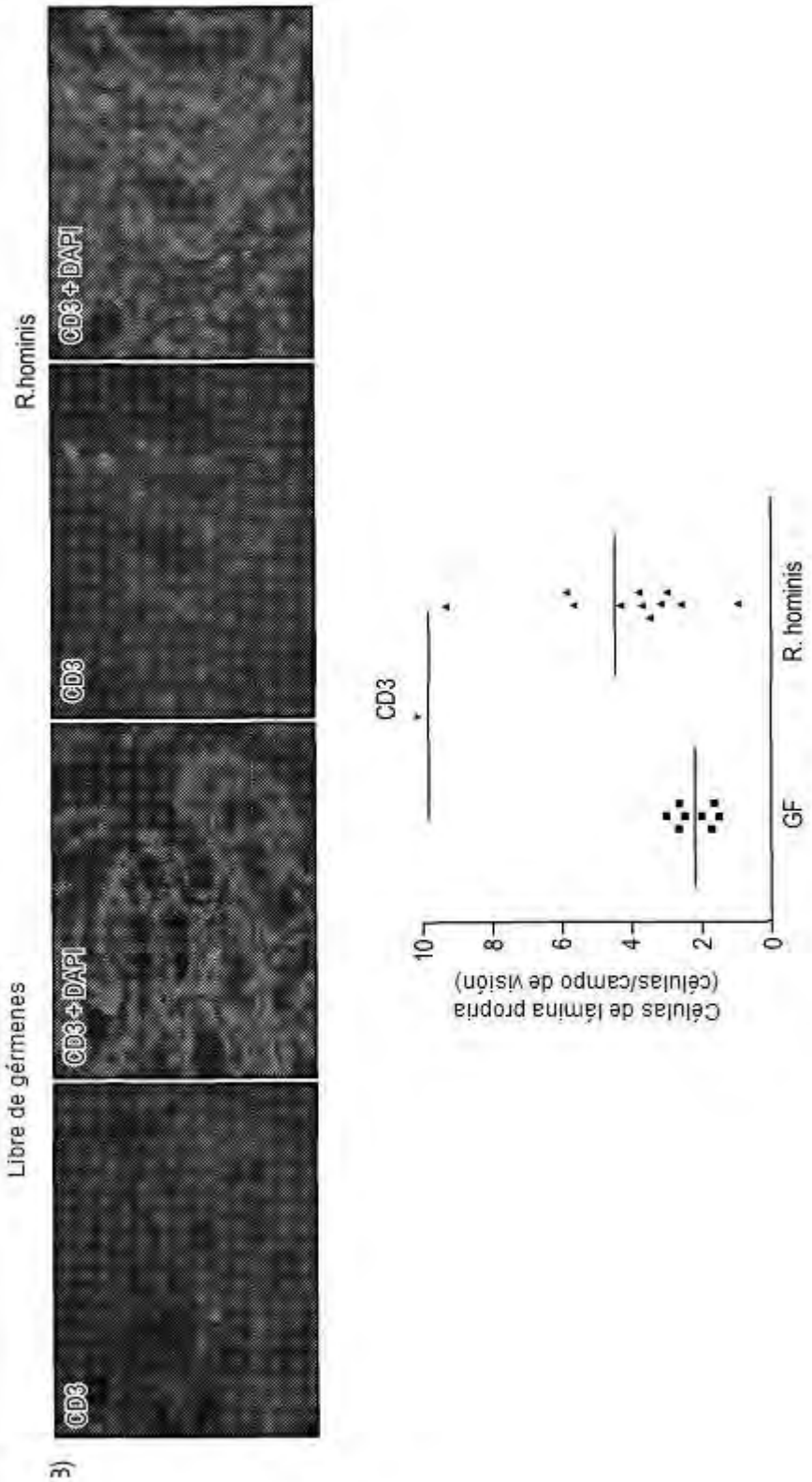

3)
Libre de gérmenes
R.hominis
CD3
CD3 + DAPI
CD3
CD3 + DAPI
CD3
Células de lámina propria
(células/campo de visión)
10
8
6
4
2
0
GF
R. hominis

FIG. 5

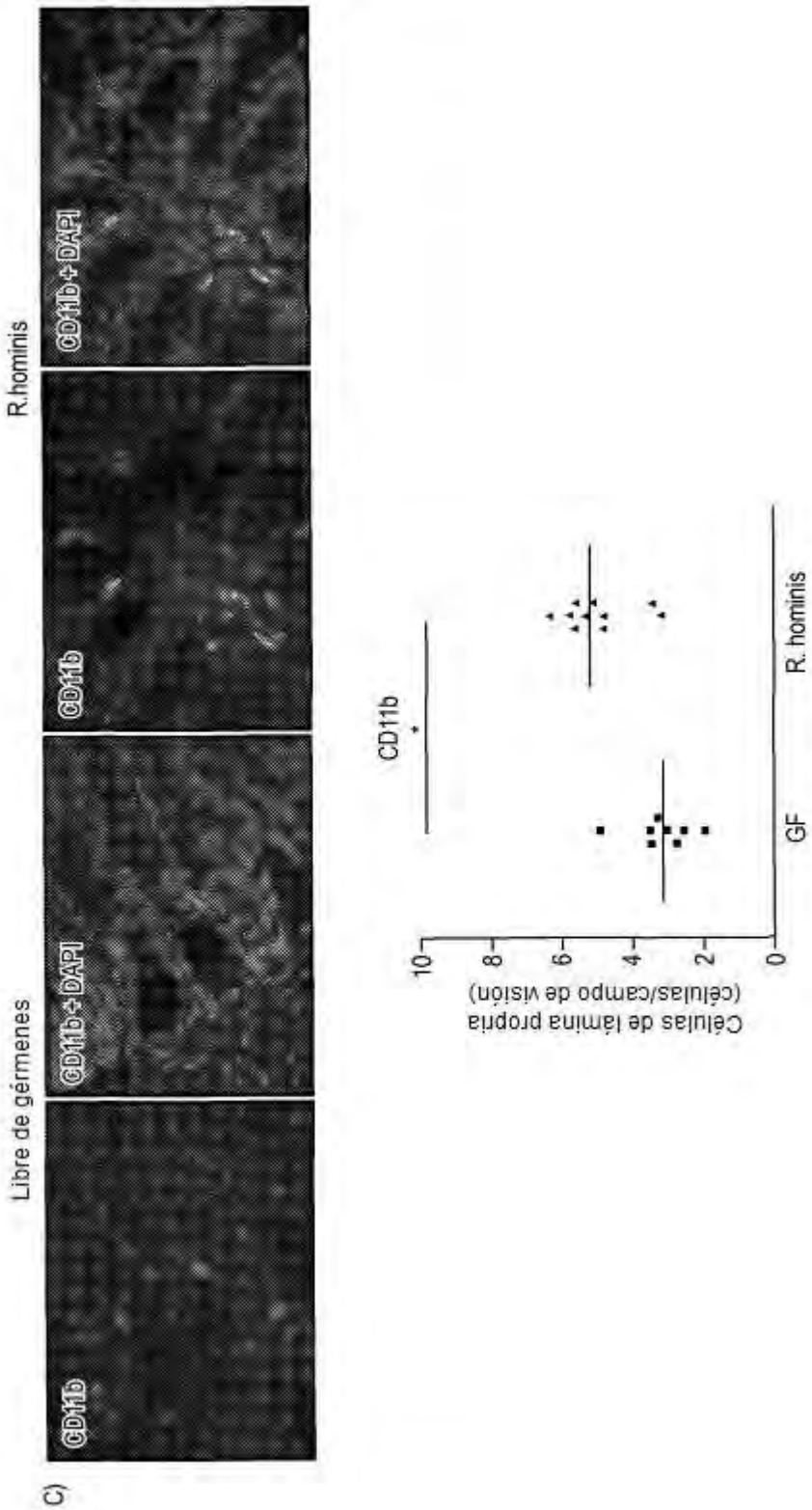

C)
Libre de gérmenes
R.hominis
CD11b
CD11b + DAPI
CD11b
CD11b + DAPI
CD11b
Células de lámina propia
(células/campo de visión)
10
8
6
4
2
0
GF
R. hominis

FIG. 5

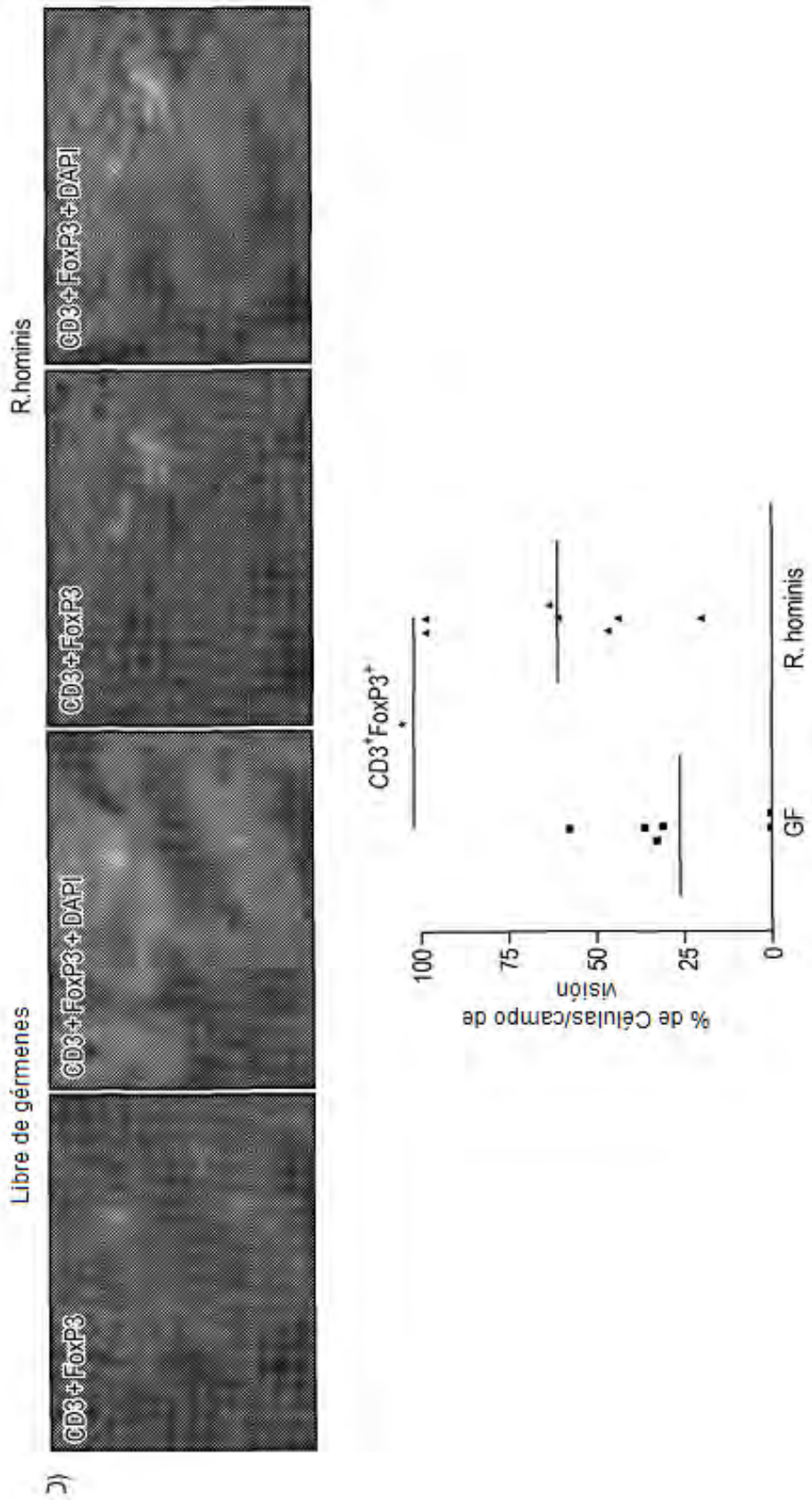
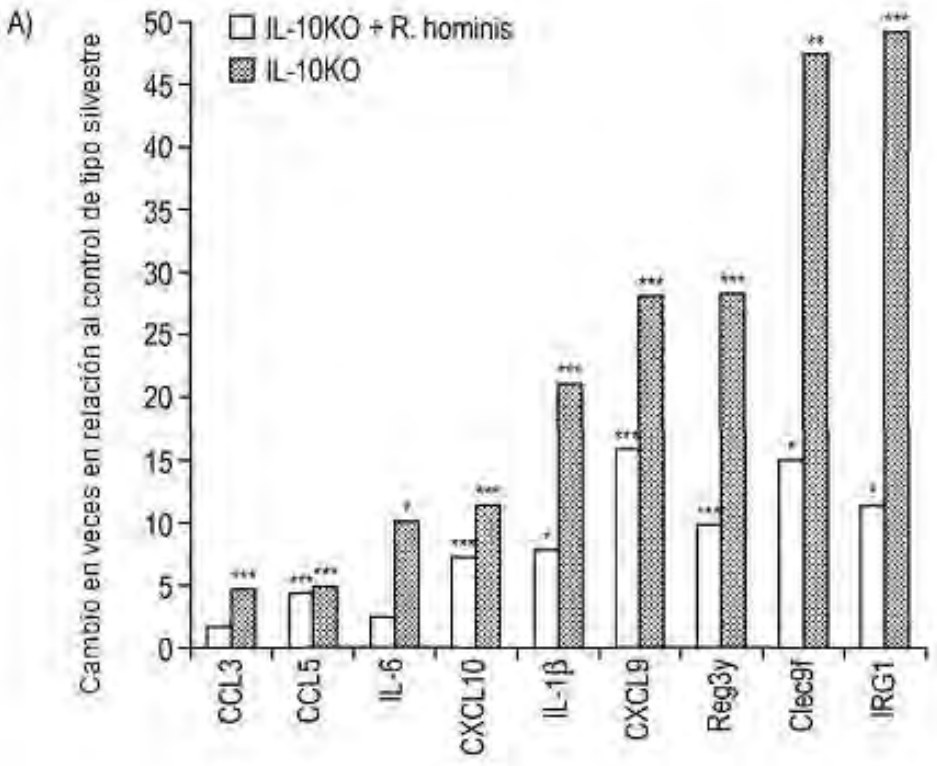

C)
Libre de gérmenes
R.hominis
CD3+FoxP3
CD3+FoxP3+DAPI
CD3+FoxP3
CD3+FoxP3+DAPI
CD3+FoxP3+
% de Células/campo de visión
100
75
50
25
0
GF
R. hominis

FIG. 5


A)
IL-10KO + R. hominis
IL-10KO
Cambio en veces en relación al control de tipo silvestre
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
CCL3
CCL5
IL-6
CXCL10
IL-1β
CXCL9
Reg3γ
Clec9f
IRG1

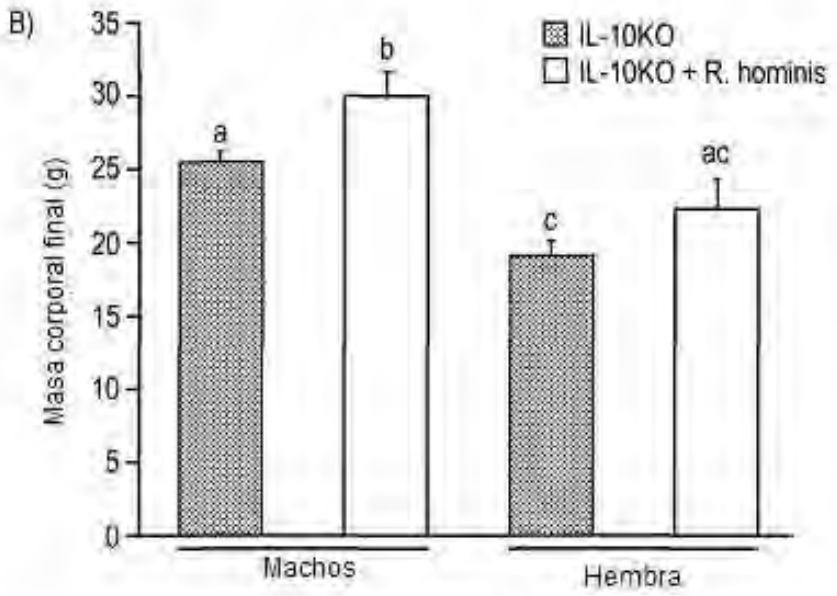

B)
IL-10KO
IL-10KO + R. hominis
Masa corporal final (g)
35
30
25
20
15
10
5
0
a
b
c
ac
Machos
Hembra

FIG. 6

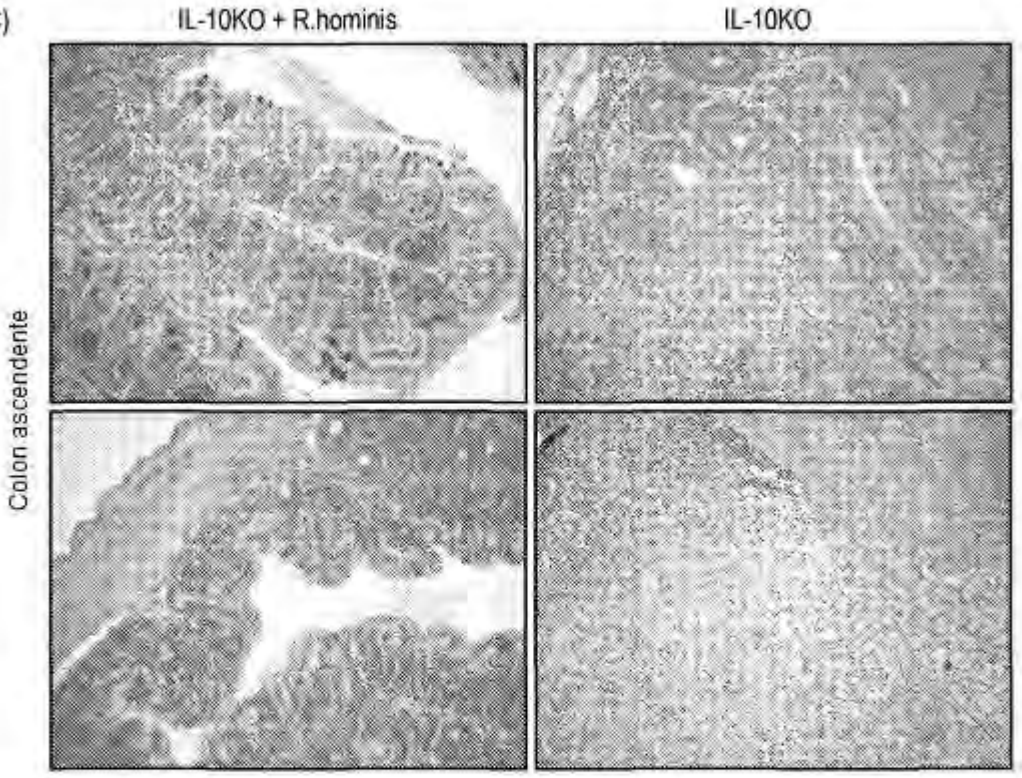


FIG. 6

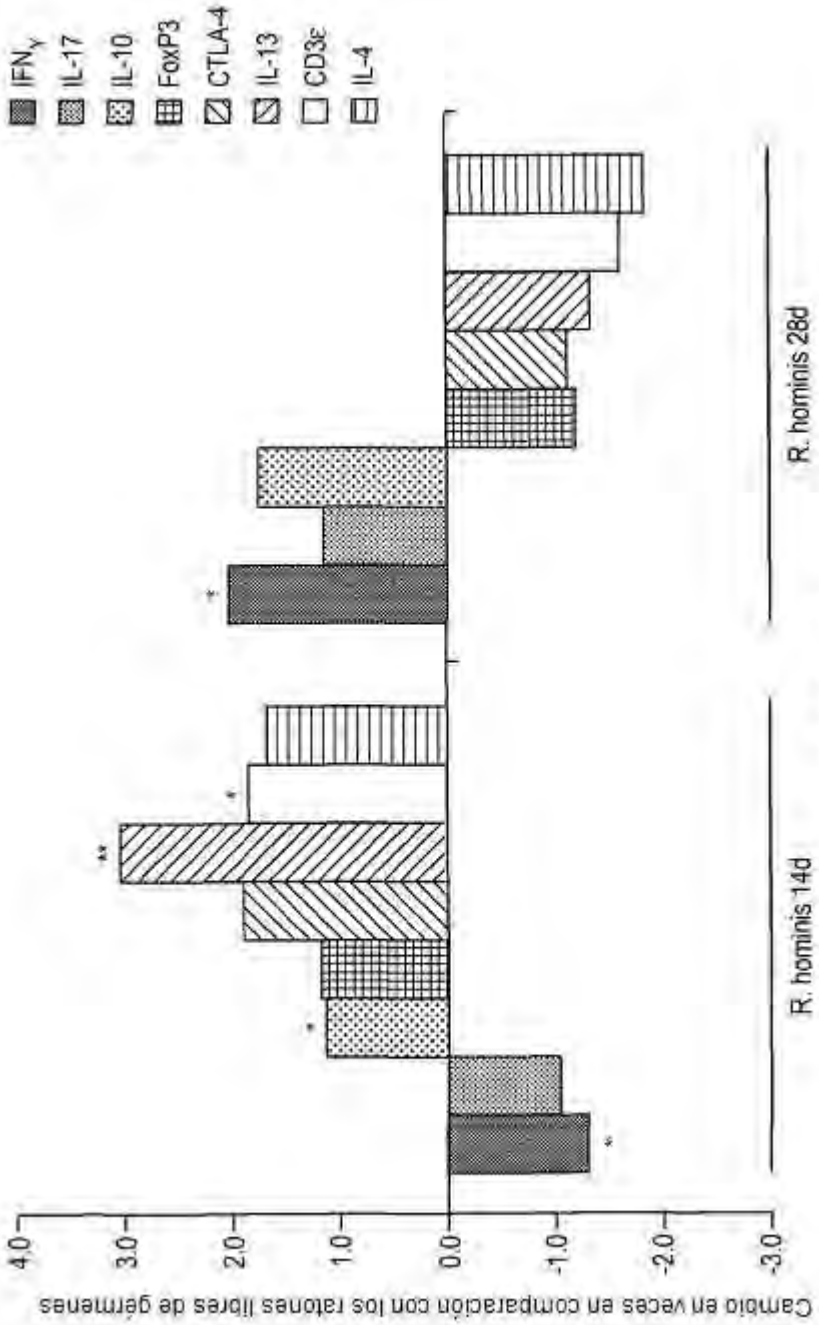

IFNγ
IL-17
IL-10
FoxP3
CTLA-4
IL-13
CD3ε
IL-4
Cambio en veces en comparación con los ratones libres de gérmenes
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
-1.0
-2.0
-3.0
R. hominis 14d
R. hominis 28d

FIG. 7

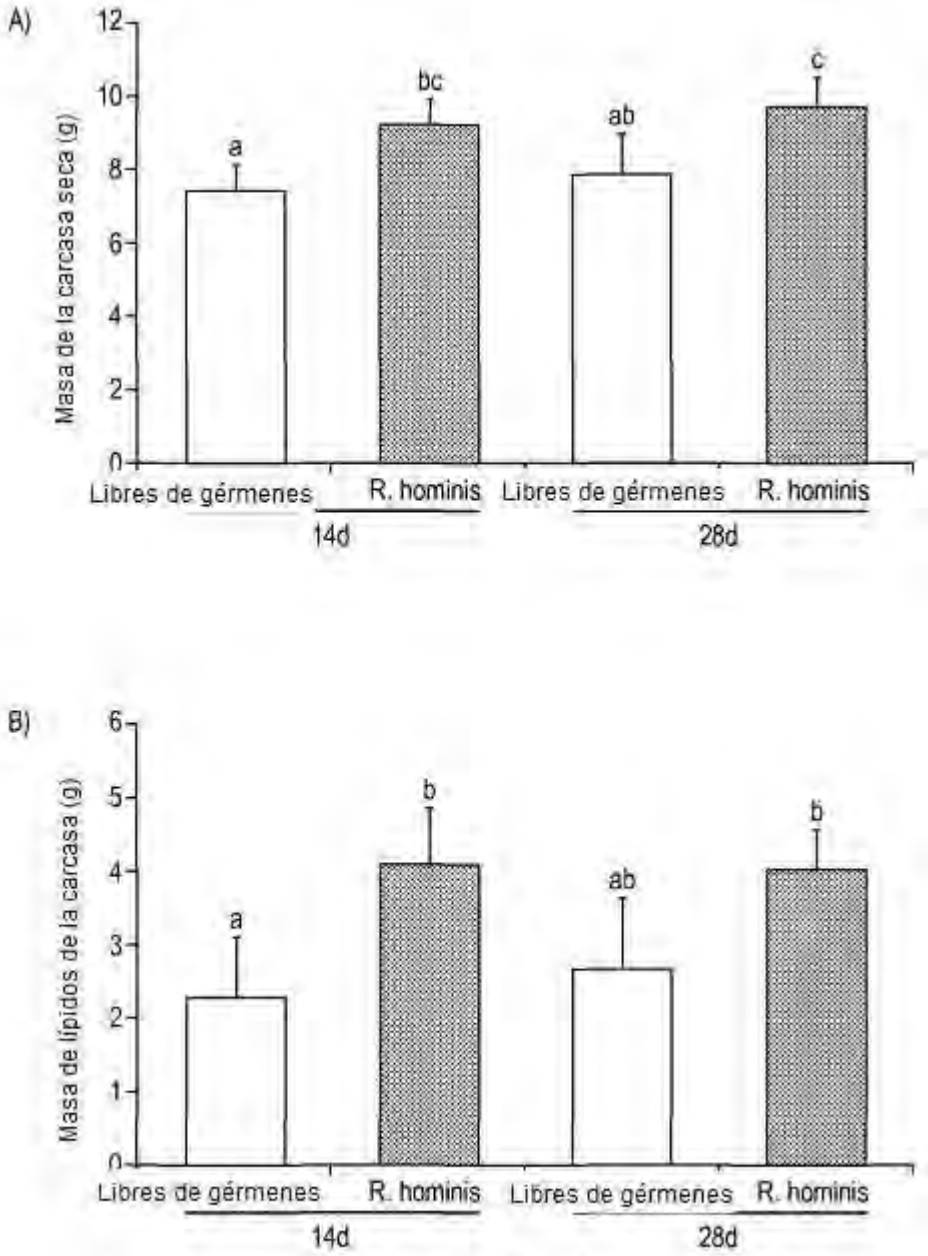

A)
Masa de la carcasa seca (g)
12
10
8
6
4
2
0
a
bc
ab
c
Libres de gérmenes
R. hominis
Libres de gérmenes
R. hominis
14d
28d
B)
Masa de lípidos de la carcasa (g)
6
5
4
3
2
1
0
a
b
ab
b
Libres de gérmenes
R. hominis
Libres de gérmenes
R. hominis
14d
28d

FIG. 8

#	Color	Nombre del experimento	Especie
1		R. hominis-Control ninguno	Mus musculus
2		E. rectale-Control ninguno	Mus musculus
3		R. intestinalis-Control ninguno	Mus musculus

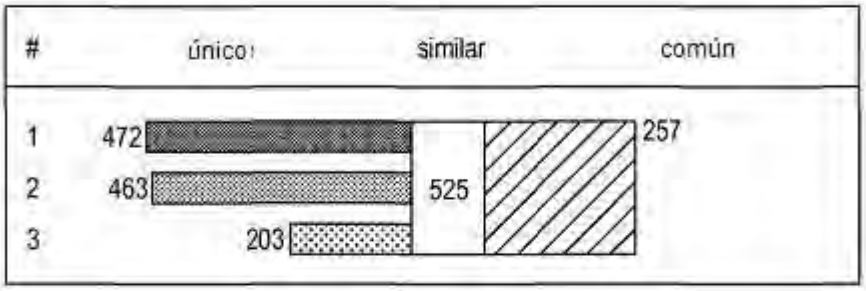


FIG. 9

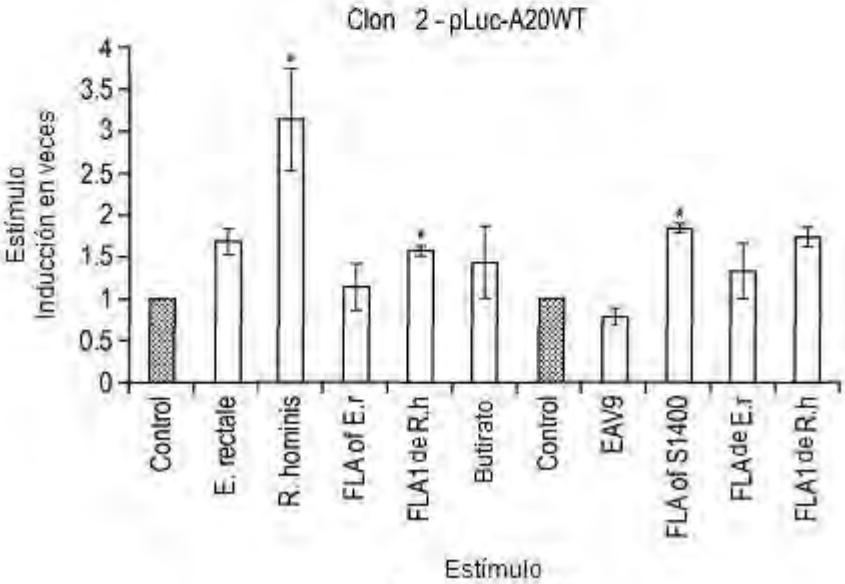


FIG. 10

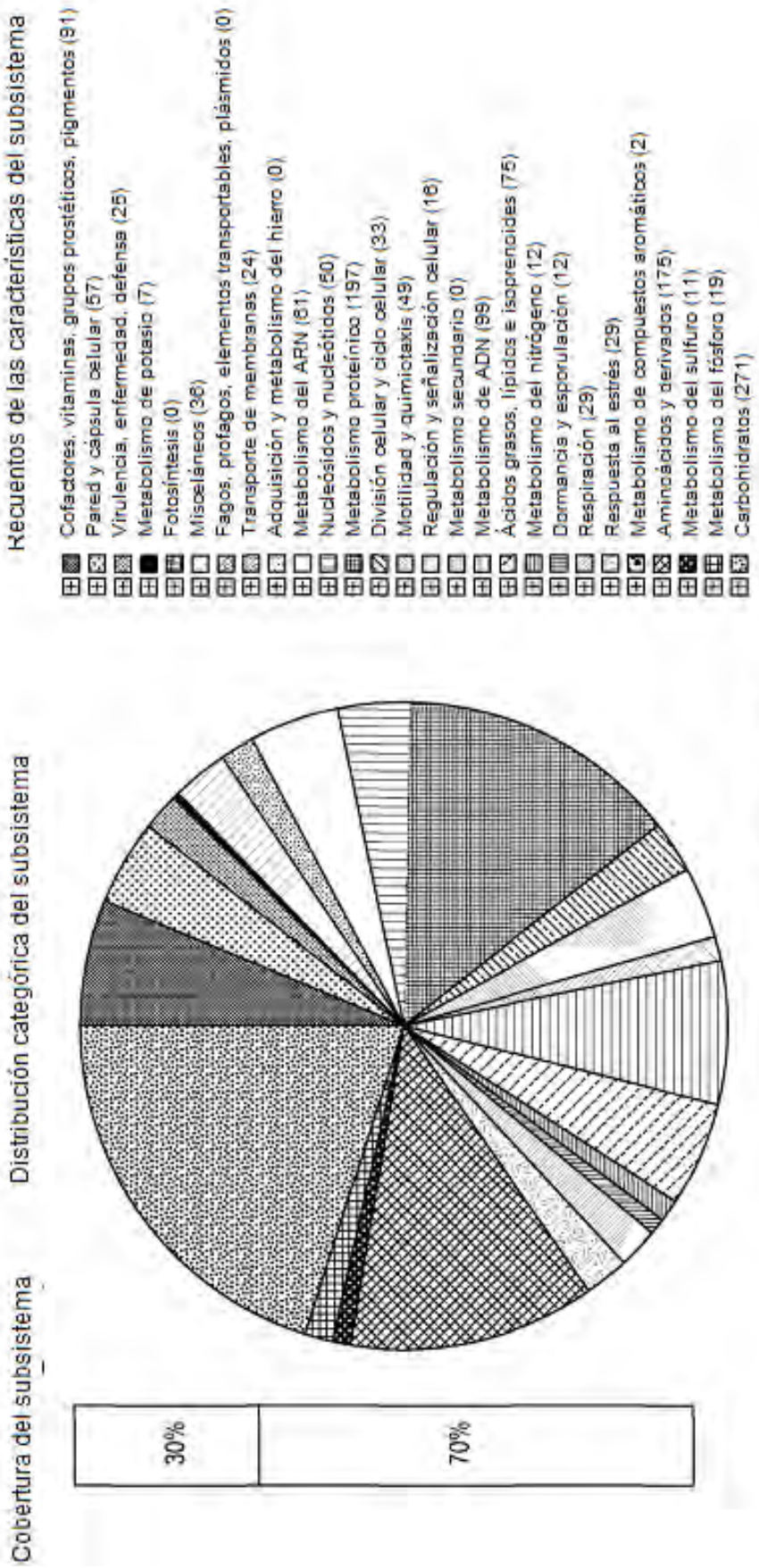

Cobertura del subsistema
30%
70%
Distribución categórica del subsistema
Recuentos de las características del subsistema
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (91)
Pared y cápsula celular (57)
Virulencia, enfermedad, defensa (25)
Metabolismo de potasio (7)
Fotosíntesis (0)
Miscelánea (36)
Fagos, profagos, elementos transportables, plásmidos (0)
Transporte de membranas (24)
Adquisición y metabolismo del hierro (0)
Metabolismo del ARN (81)
Nucleósidos y nucleótidos (50)
Metabolismo proteínico (197)
División celular y ciclo celular (33)
Motilidad y quimiotaxis (49)
Regulación y señalización celular (16)
Metabolismo secundario (0)
Metabolismo de ADN (99)
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides (75)
Metabolismo del nitrógeno (12)
Dormancia y esporulación (12)
Respiración (29)
Respuesta al estrés (29)
Metabolismo de compuestos aromáticos (2)
Aminoácidos y derivados (175)
Metabolismo del sulfuro (11)
Metabolismo del fósforo (19)
Carbohidratos (271)

FIG. 11

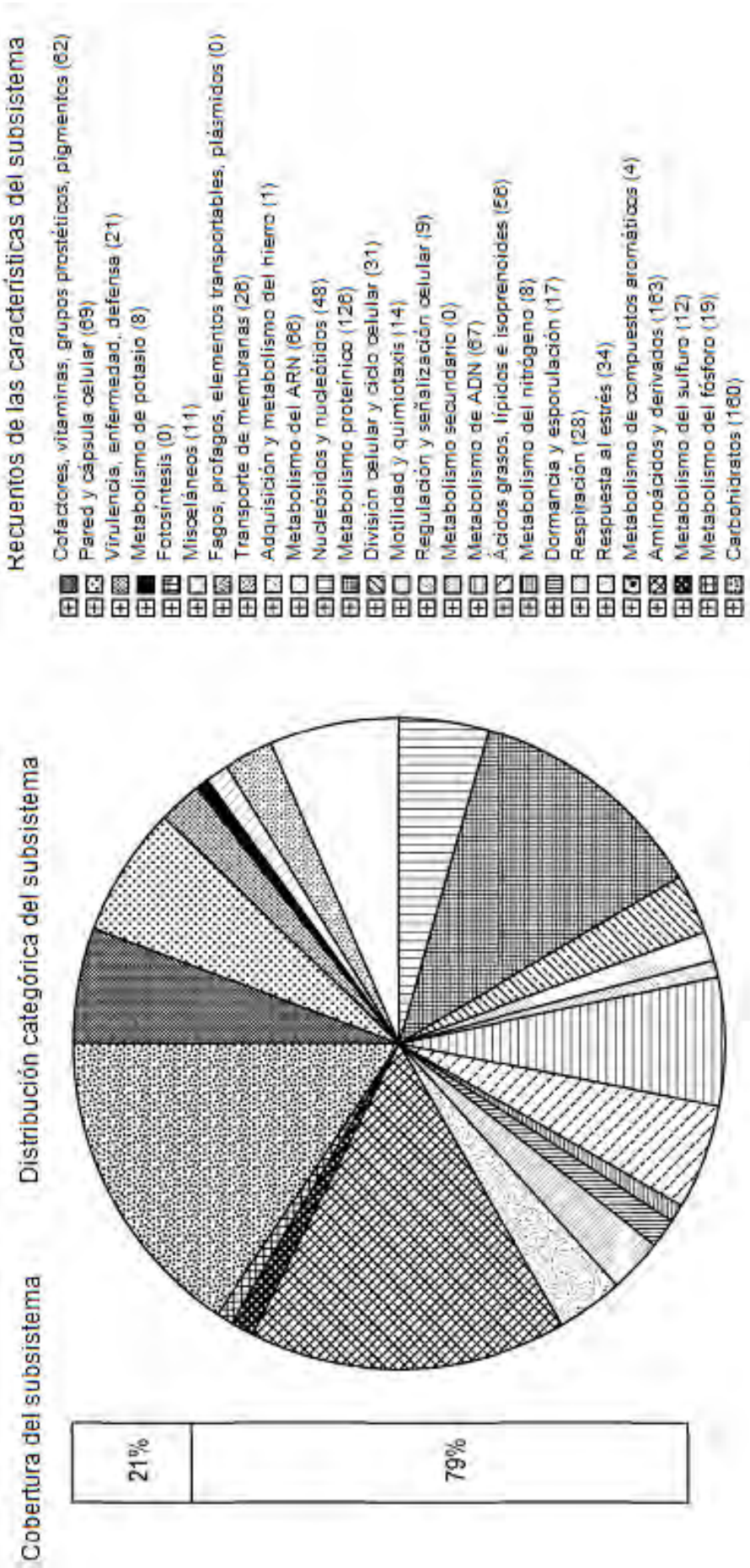

Cobertura del subsistema
21%
79%
Distribución categórica del subsistema
Recuentos de las características del subsistema
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (62)
Pared y cápsula celular (69)
Virulencia, enfermedad, defensa (21)
Metabolismo de potasio (8)
Fotosíntesis (0)
Miscelánea (11)
Fagos, profagos, elementos transportables, plásmidos (0)
Transporte de membranas (26)
Adquisición y metabolismo del hierro (1)
Metabolismo del ARN (66)
Nucleósidos y nucleótidos (48)
Metabolismo proteínico (126)
División celular y ciclo celular (31)
Motilidad y quimiotaxis (14)
Regulación y señalización celular (9)
Metabolismo secundario (0)
Metabolismo de ADN (67)
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides (56)
Metabolismo del nitrógeno (8)
Dormancia y esporulación (17)
Respiración (28)
Respuesta al estrés (34)
Metabolismo de compuestos aromáticos (4)
Aminoácidos y derivados (163)
Metabolismo del sulfuro (12)
Metabolismo del fósforo (19)
Carbohidratos (180)

FIG. 12

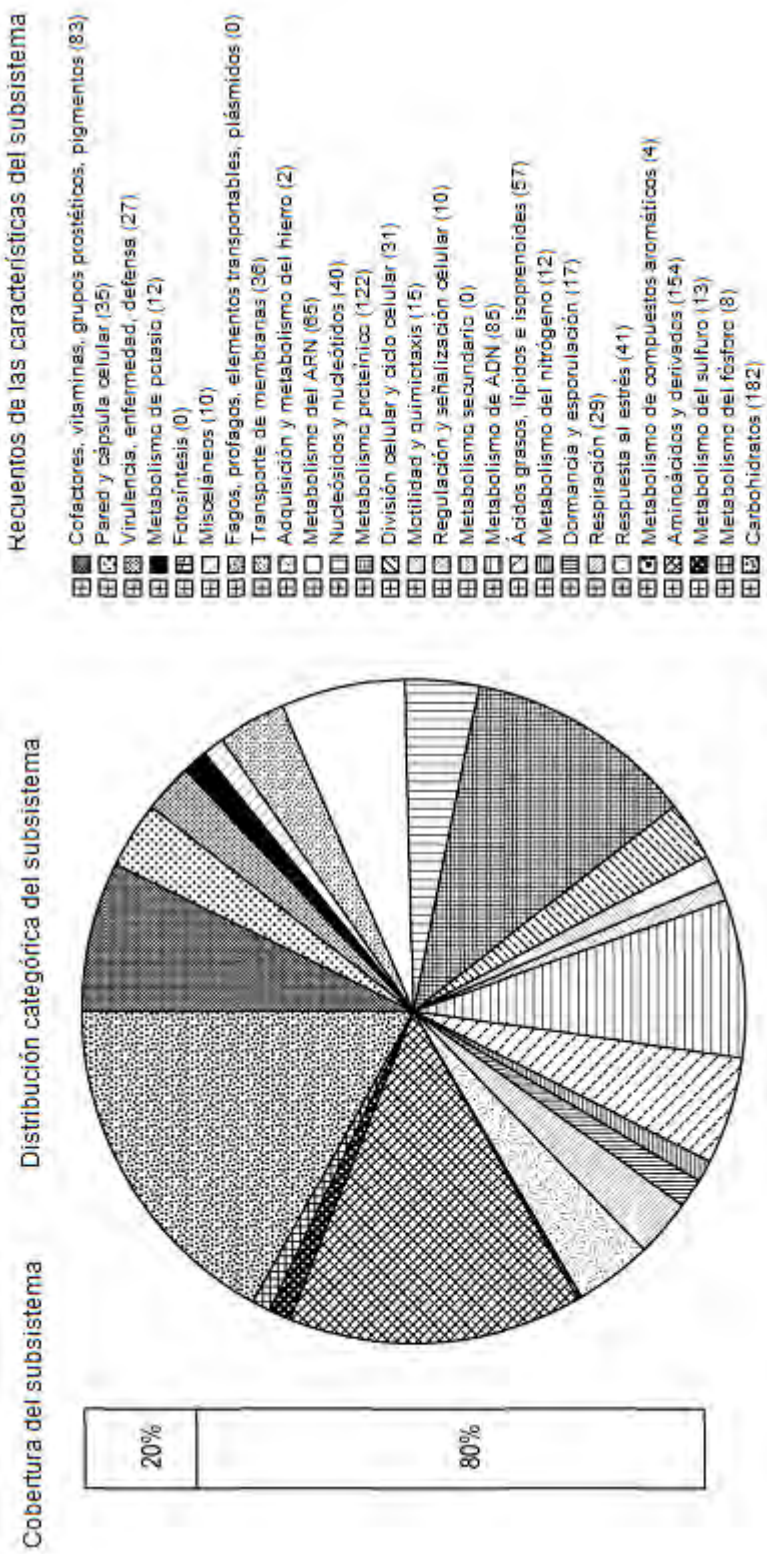

Cobertura del subsistema
20%
80%
Distribución categórica del subsistema
Recuentos de las características del subsistema
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (83)
Pared y cápsula celular (35)
Virulencia, enfermedad, defensa (27)
Metabolismo de potasio (12)
Fotosíntesis (0)
Misceláneos (10)
Fagos, profagos, elementos transportables, plásmidos (0)
Transporte de membranas (36)
Adquisición y metabolismo del hierro (2)
Metabolismo del ARN (65)
Nucleósidos y nucleótidos (40)
Metabolismo proteínico (122)
División celular y ciclo celular (31)
Motilidad y quimiotaxis (15)
Regulación y señalización celular (10)
Metabolismo secundario (0)
Metabolismo de ADN (85)
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides (57)
Metabolismo del nitrógeno (12)
Dormancia y esporulación (17)
Respiración (29)
Respuesta al estrés (41)
Metabolismo de compuestos aromáticos (4)
Aminoácidos y derivados (154)
Metabolismo del sulfuro (13)
Metabolismo del fósforo (8)
Carbohidratos (182)

FIG. 13

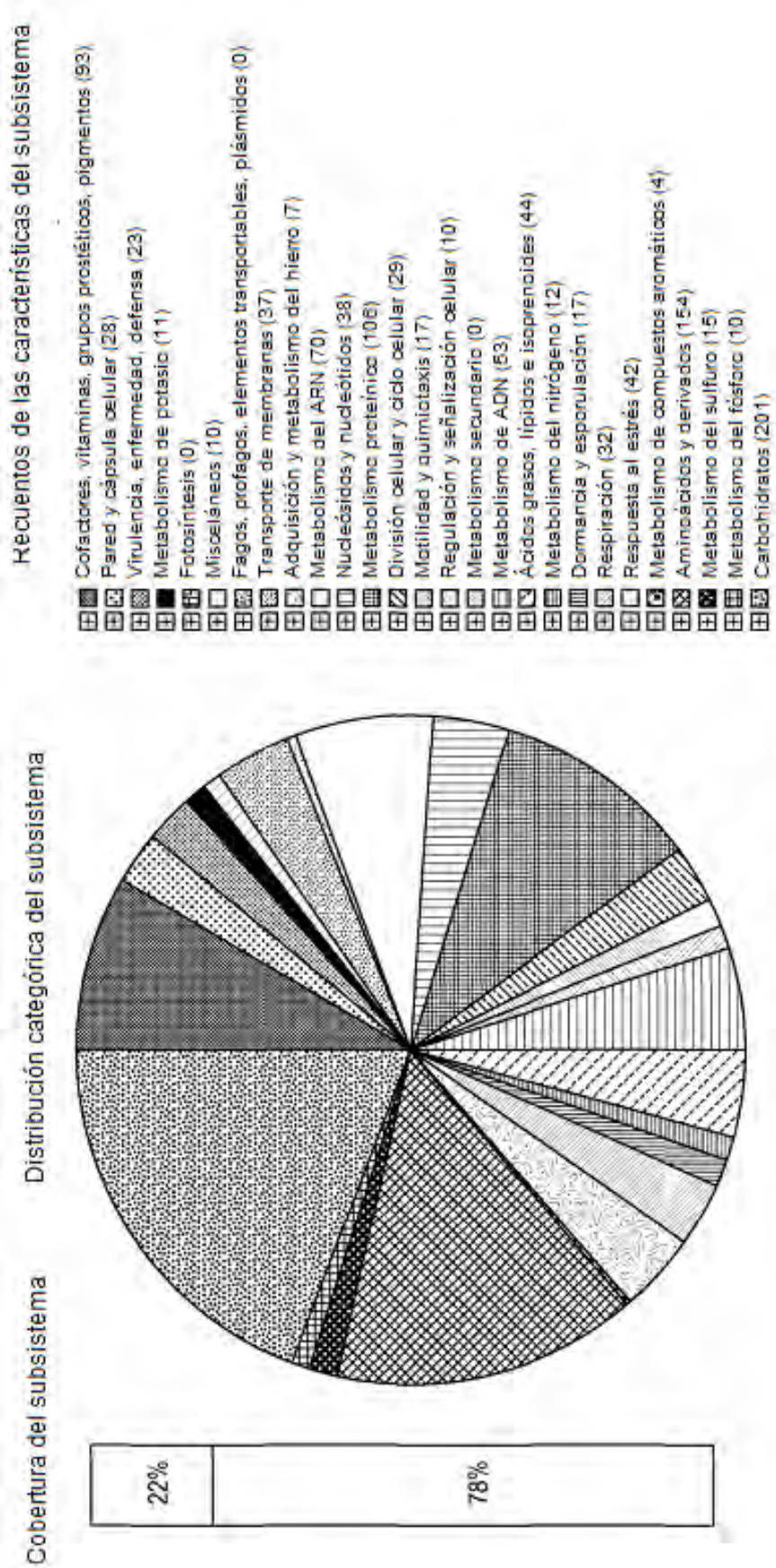

Cobertura del subsistema
22%
78%
Distribución categórica del subsistema
Recuentos de las características del subsistema
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (93)
Pared y cápsula celular (28)
Virulencia, enfermedad, defensa (23)
Metabolismo de potasio (11)
Fotosíntesis (0)
Misceláneos (10)
Fagos, profagos, elementos transportables, plásmidos (0)
Transporte de membranas (37)
Adquisición y metabolismo del hierro (7)
Metabolismo del ARN (70)
Nucleósidos y nucleótidos (38)
Metabolismo proteínico (106)
División celular y ciclo celular (29)
Motilidad y quimiotaxis (17)
Regulación y señalización celular (10)
Metabolismo secundario (0)
Metabolismo de ADN (53)
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides (44)
Metabolismo del nitrógeno (12)
Dormancia y esporulación (17)
Respiración (32)
Respuesta al estrés (42)
Metabolismo de compuestos aromáticos (4)
Aminoácidos y derivados (154)
Metabolismo del sulfuro (15)
Metabolismo del fósforo (10)
Carbohidratos (201)

FIG. 14

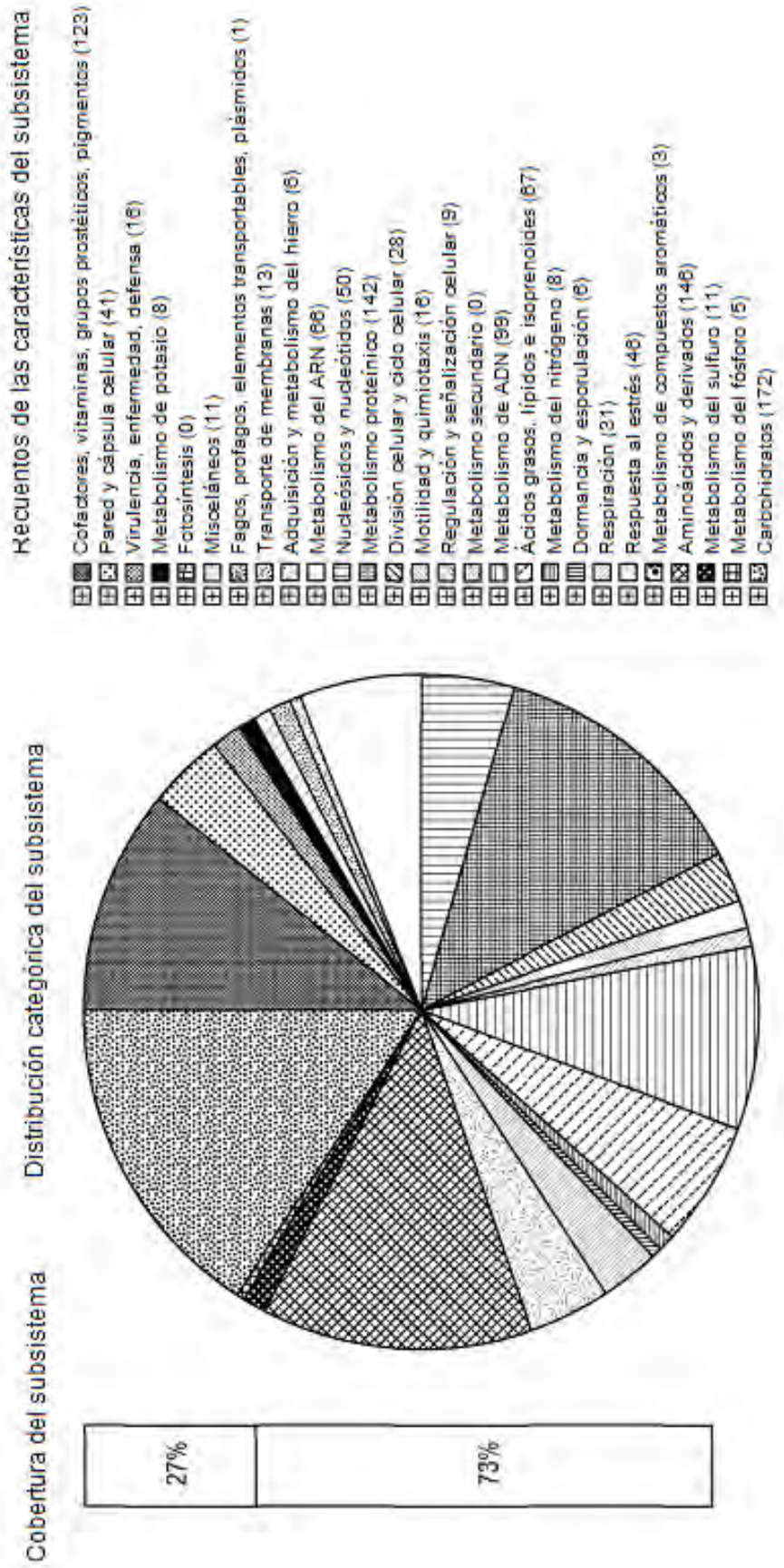

Cobertura del subsistema
27%
73%
Distribución categórica del subsistema
Recuentos de las características del subsistema
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (123)
Pared y cápsula celular (41)
Virulencia, enfermedad, defensa (18)
Metabolismo de potasio (8)
Fotosíntesis (0)
Miscelláneos (11)
Fagos, profagos, elementos transportables, plásmidos (1)
Transporte de membranas (13)
Adquisición y metabolismo del hierro (6)
Metabolismo del ARN (88)
Nucleósidos y nucleótidos (50)
Metabolismo proteínico (142)
División celular y ciclo celular (28)
Motilidad y quimiotaxis (16)
Regulación y señalización celular (9)
Metabolismo secundario (0)
Metabolismo de ADN (99)
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides (67)
Metabolismo del nitrógeno (8)
Dormancia y esporulación (6)
Respiración (31)
Respuesta al estrés (48)
Metabolismo de compuestos aromáticos (3)
Aminoácidos y derivados (146)
Metabolismo del sulfuro (11)
Metabolismo del fósforo (5)
Carbohidratos (172)

FIG. 15