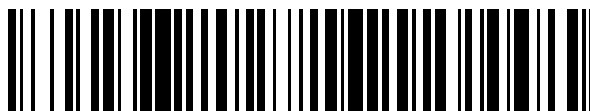


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 146**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2011 PCT/JP2011/063302**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11152566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2011 E 11728077 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2575835**

54 Título: **Composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras**

30 Prioridad:

03.12.2010 WO PCT/JP2010/071746
04.06.2010 JP 2010129134

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2017

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)
3-1, Hongo 7-chome
Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8654, JP

72 Inventor/es:

HONDA, KENYA;
ATARASHI, KOJI;
ITOH, KIKUJI y
TANOUE, TAKESHI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 610 146 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras

5 Campo técnico

En este documento se describe una composición que tiene un efecto de inducir proliferación o acumulación T reguladoras, y que comprende, como ingrediente activo, bacterias que pertenecen al género *Clostridium*, una sustancia fisiológicamente activa derivada de la bacteria, esporas bacterianas o similares. La presente invención se refiere a composiciones para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria o enfermedad alérgica en un individuo, comprendiendo la composición, como ingrediente activo, bacterias que comprenden bacterias que forman esporas que pertenecen a los grupos IV y XIVa de *Clostridium* en combinación, induciendo dicha combinación la proliferación o acumulación de células T reguladoras factor de transcripción Foxp3-positivas en dicho individuo.

15 Técnica anterior

Cientos de especies de microorganismos comensales están albergados en los tractos gastrointestinales de mamíferos, e interaccionan de forma íntima con los sistemas inmunitarios del hospedador. Los resultados de los investigadores usando animales libres de gérmenes (GF) han demostrado que los microorganismos comensales ejercen grandes influencias sobre el desarrollo de los sistemas inmunitarios de la mucosa tales como histogénesis de placas de Peyer (PP) y folículos linfoides aislados (ILF), secreción de péptidos antimicrobianos desde el epitelio, y acumulación de linfocitos únicos en tejidos de la mucosa, incluyendo los linfocitos únicos células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A, linfocitos intraepiteliales, células T CD4-positivas productoras de IL-17 (Th 17) y células tipo NK productoras de IL-22 (documentos no de patente 1 a 7). Por consiguiente, la presencia de bacterias intestinales potencia las funciones protectoras de las membranas mucosas, proporcionando a los hospedadores respuestas inmunitarias robustas contra microbios patógenos que invaden los organismos. Por otro lado, los sistemas inmunitarios de la mucosa mantienen la insensibilidad a los antígenos de la dieta y a los microbios inocuos (documento no de patente 3). Por esta razón, una anomalía en la regulación de la intercomunicación entre las bacterias comensales y un sistema inmunitario (disbiosis intestinal) puede conducir a una respuesta inmunitaria demasiado robusta a antígenos ambientales, de modo que se cause enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (documentos no de patente 8 a 10).

Los resultados de los estudios recientes han demostrado que las bacterias comensales individuales controlan la diferenciación de sus células inmunitarias específicas en el sistema inmunitario de la mucosa. Por ejemplo, *Bacteroides fragilis*, que es una bacteria comensal en seres humanos, induce específicamente una respuesta sistémica de células Th1 y una respuesta de células T productoras de IL-10 en ratones, y desempeña un papel en la protección del hospedador frente a colitis, que de lo contrario estaría causada por un patógeno (documentos no de patente 3). Las bacterias filamentosas segmentadas, que son bacterias comensales intestinales en ratones, han demostrado inducir respuesta de células Th17 en la mucosa y de ese modo potenciar la resistencia contra infección de los tractos gastrointestinales del hospedador con un patógeno (documentos no de patente 11 a 13). Además, los ácidos grasos de cadena corta derivados de varias bacterias comensales se sabe que suprimen la inflamación intestinal (documento no de patente 14). Además, se presume que la presencia de algunas especies de microbiota intestinal ejerce una gran influencia sobre la diferenciación de las células T reguladoras (a partir de ahora en este documento mencionadas como "células Treg") que mantienen la homeostasis del sistema inmunitario.

Por ahora, las células T reguladoras que se han identificado como un subconjunto que suprime la inmunidad son células T CD4⁺ en que se expresa un factor de transcripción Foxp3, y se sabe que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica (documentos no de patente 8, 9, 15 y 16). Además, se ha sabido que las células que expresan Foxp3 están presentes en una gran cantidad especialmente en el colon, y solamente células Treg presentes localmente en el colon expresan de forma constante IL-10, que es una citoquina inmunosupresora, a un alto nivel (documento no de patente 17). También se sabe que animales que tienen células CD4⁺ Foxp3⁺ de las que se retira específicamente IL-10 desarrollan enfermedad inflamatoria del intestino (documento no de patente 18).

Por consiguiente, si el mecanismo de la inducción de células Treg que producen IL-10 en el colon a un alto nivel se dilucida, pueden potenciarse la inmunosupresión, que a su vez puede aplicarse al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como enfermedad inflamatoria del intestino, así como al trasplante de órganos.

Sin embargo, los mecanismos del modo en que una gran cantidad de células Treg llegan a estar presentes en el colon y el modo en que las células Treg producen IL-10 en el colon a un alto nivel aún no están claros. Además, tampoco está claro aún las especies de bacterias que constituyen la flora bacteriana comensal intestinal que ejercen la influencia sobre la inducción de células T reguladoras.

65 Lista de citas

Bibliografía no de patente

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

V. Gaboriau-Routhiau et al., "Immunity", 16 de octubre de 2009, 31, 677 describe bacterias filamentosas segmentadas (SFB) que no pertenecen al género *Clostridium* y, de hecho, están filogenéticamente alejadas del mismo.

SOKOL HARRY ET AL: "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, DC; EE. UU., vol. 105, n.º 43, 28 de octubre de 2008 (2008-10-28), páginas 16731-16736, propone *Faecalibacterium prausnitzii* (que pertenece al grupo IV de *Clostridium*) como agente probiótico candidato en el tratamiento de enfermedad de Crohn (CD).

El documento DE 10 2006 062250 A1 (SAUR-BROSCH ROLAND [DE]) describe el uso de una composición que comprende minerales y/o vitaminas y opcionalmente bacterias acetogénicas y/o butirogénicas para la administración oral o rectal para el tratamiento o la prevención del malestar abdominal que está acompañado por una actividad metabólica reductoramente acetogénica.

ITOH K ET AL: "Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice." LABORATORY ANIMALS APR 1985 vol. 19, n.º 2, abril de 1985 (1985-04), páginas 111-118 describe la caracterización de 115 cepas de clostridios acumulados a partir de 3 aislados diferentes de las heces de un ratón de flora limitada (LF) producido por inoculación de ratones libres de gérmenes con heces tratadas con cloroformo de ratones convencionales, y se estudió el efecto sobre el tamaño del ciego cuando se asocia con ratones libres de gérmenes.

Sumario de la invención

Problemas técnicos

Solución al problema

Los presentes inventores han descubierto que una fracción tratada con cloroformo y una fracción formadora de esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero induce acumulación de células T reguladoras (células Treg) en el colon. Además, los presentes inventores han descubierto que bacterias que pertenecen al género *Clostridium* inducen proliferación o acumulación de células T reguladoras en el colon. Los presentes inventores también han descubierto que las células T reguladoras inducidas por estas bacterias suprimen la proliferación de células T efectoras. Además, los presentes inventores también han descubierto que la colonización de bacterias que pertenecen al género *Clostridium* y la proliferación o la acumulación resultante de células Treg regulan las respuestas inmunitarias locales y sistémicas.

A partir de estos hallazgos, los presentes inventores han descubierto que el uso de bacterias que pertenecen al género *Clostridium*, esporas de las mismas o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las mismas hace posible inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras (células Treg), y además suprimir las funciones inmunitarias.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria o enfermedad alérgica en un individuo, comprendiendo la composición, como ingrediente activo, bacterias que comprenden

bacterias formadoras de esporas que pertenecen a los grupos IV y XIVa de *Clostridium* en combinación, induciendo dicha combinación la proliferación o la acumulación de células T reguladoras factor de transcripción Foxp3-positivas en dicho individuo.

5 Otros aspectos de la invención son como se definen en las reivindicaciones adjuntas a la misma.

Efectos ventajosos

10 La composición descrita en este documento sirve como excelente composición para inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras (células Treg). La inmunidad en un organismo vivo puede suprimirse a través de la administración de la composición de este documento descrita como un producto farmacéutico o a través de ingestión de la composición como un alimento o una bebida. Por consiguiente, la composición descrita en este documento puede usarse, por ejemplo, para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades alérgicas, así como para suprimir el rechazo inmunológico en trasplante de órganos o similares. Además, si un alimento o una bebida tal como un alimento saludable comprenden la composición de la presente invención, los individuos sanos pueden ingerir la composición fácilmente y de forma rutinaria. Como resultado, es posible inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras y de ese modo mejorar las funciones inmunitarias.

Breve descripción de los dibujos

20 [Fig. 1] La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra un método de producción de ratón $Il10^{venus}$.

[Fig. 2] La Fig. 2 es un diagrama que muestra los resultados de transferencia de Southern realizada para análisis en cuanto así los ratones $Il10^{venus}$ tienen o no un alelo $Il10^{venus}$.

25 [Fig. 3] La Fig. 3 es un diagrama de puntos FACS que muestra los resultados obtenidos cuando se clasificaron células Venus-positivas y células Venus-negativas de los ratones $Il10^{venus}$.

30 [Fig. 4] La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se analizaron las cantidades de ARNm de IL-10 expresadas en células Venus-positivas y en células Venus-negativas de los ratones $Il10^{venus}$ por RT-PCR a tiempo real.

35 [Fig. 5] La Fig. 5 es un gráfico que muestra el cambio en la relación de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ de ratones SPF.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra diagramas de puntos FACS que muestran los resultados de análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados del intestino delgado, el colon, y los ganglios linfáticos periféricos de ratones GF y de ratones SPF.

40 [Fig. 7] La Fig. 7 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados del intestino delgado, del colon y de los ganglios linfáticos periféricos de ratones GF y de ratones SPF.

45 [Fig. 8] La Fig. 8 muestra gráficos que muestran los resultados de análisis de las cantidades de células CD4⁺ Foxp3⁺ aisladas del intestino delgado, del colon y de los ganglios linfáticos periféricos de ratones GF y de ratones SPF.

[Fig. 9] La Fig. 9 es un diagrama trazado que muestra los resultados de los análisis de las relaciones de células Venus⁺ en células CD4⁺ en diversos tejidos de ratones SPF tratados con antibióticos.

50 [Fig. 10] La Fig. 10 muestra diagramas de puntos FACS que muestran resultados de los análisis de la relación de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon de ratones GF a los que se administró una suspensión fecal de ratones SPF.

55 [Fig. 11] La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon y de la lamina propia del intestino delgado de ratones GF a los que se administró una suspensión fecal de ratones SPF.

[Fig. 12] La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de la relación de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia de ratones deficientes en ILF, PP y parches colónicos.

60 [Fig. 13] La Fig. 13 muestra diagramas de puntos FACS que muestran los resultados de los análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon de ratones GF a los que se administraron bacterias comensales específicas.

65 [Fig. 14] La Fig. 14 muestra gráficos que muestran los resultados de los análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon de ratones GF a los que se administraron bacterias

comensales específicas.

[Fig. 15] La Fig. 15 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de las relaciones de células IFN- γ ⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon de ratones en que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Fig. 16] La Fig. 16 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de las relaciones de células IL-17⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon de ratones en que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Fig. 17] La Fig. 17 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados del colon de tipos de ratones SPF que son cada uno deficientes en factor asociado a receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos.

[Fig. 18] La Fig. 18 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de las relaciones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lamina propia del colon de ratones Myd88^{-/-} en que se colonizó *Clostridium*.

[Fig. 19] La Fig. 19 muestra diagramas de puntos FACS que muestran los resultados de los análisis de las relaciones de células Venus⁺ en linfocitos aislados de diversos tejidos de ratones Il10^{venus}.

[Fig. 20] La Fig. 20 es un diagrama de puntos FACS que muestra los resultados de los análisis de la expresión de una cadena β del receptor de células T sobre superficies celulares de linfocitos aislados de la lamina propia del colon de ratones Il10^{venus}.

[Fig. 21] La Fig. 21 muestra diagramas de transferencia puntual FACS que muestran los resultados de los análisis de la expresión de IL-17, IL-4 e IFN- γ en linfocitos aislados de la lamina propia del colon de ratones Il10^{venus}.

[Fig. 22] La Fig. 22 muestra gráficos que muestran los resultados de los análisis de las cantidades de ARNm de IL-10, CTLA4, Foxp3 y GITR expresados en células de bazo Foxp3⁺CD4⁺, células de bazo Foxp3⁺CD4⁺, células Venus⁺ de la lamina propia del colon y células Venus⁺ de la lamina propia del intestino delgado.

[Fig. 23] La Fig. 23 muestra diagramas de puntos FACS que muestran los resultados de los análisis de la expresión de CD4, Foxp3 y Venus en la lamina propia del intestino delgado y la lamina propia del colon de ratones GF Il10^{venus} y de ratones SPF Il10^{venus}.

[Fig. 24] La Fig. 24 muestra diagramas de puntos FACS que muestran los resultados de los análisis de la expresión de Venus y de Foxp3 de células CD4 en diversos tejidos de ratones SPF Il10^{venus}.

[Fig. 25] La Fig. 25 muestra diagramas de puntos FACS que muestran los resultados de los análisis de la expresión de Foxp3 y de Venus en ratones Il10^{venus} en que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Fig. 26] La Fig. 26 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de la expresión de Foxp3 y/o Venus de células CD4⁺ en el intestino delgado de ratones Il10^{venus} en que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Fig. 27] La Fig. 27 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de la expresión de Foxp3 y/o de Venus de células CD4⁺ en el colon de ratones Il10^{venus} en que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Fig. 28] La Fig. 28 es un diagrama trazado que muestra los resultados de los análisis de las relaciones de células Venus⁺ en células CD4⁺ aisladas de diversos tejidos de ratones Il10^{venus} tratados con antibióticos.

[Fig. 29] La Fig. 29 es un gráfico que muestra los resultados de los análisis de las funciones inmunorreguladoras de células CD4⁺Venus⁺ de la lamina propia del colon de ratones GF Il10^{venus} en que se colonizó el género *Clostridium*, células CD4⁺Venus⁺ de la lamina propia del colon de ratones SPF Il10^{venus} y células CD4⁺GFP⁺ del bazo de ratones indicadores Foxp3^{eGFP}.

[Fig. 30] La Fig. 30 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se trataron ratones SPF B6 con polimixina B o con vancomicina durante 4 semanas, y después se analizaron para la relación de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺.

[Fig. 31] La Fig. 31 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se administraron por vía oral heces tratadas con cloroformo derivadas de ratones SPF a ratones GF, y después se analizó la relación de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺.

[Fig. 32] La Fig. 32 es un gráfico que muestra los resultados generales del análisis de citometría de flujo sobre la expresión de Helios en linfocitos LP en los timos o en los cólores de ratones SPF, en ratones GF, en ratones colonizados por *Lactobacillus* o en ratones colonizados por *Clostridium*.

[Fig. 33] La Fig. 33 muestra diagramas trazados que muestran resultados representativos del análisis de citometría de flujo sobre la expresión de CD4, la expresión de Foxp3 y la expresión de Helios en los linfocitos LP en los timos o en los cólones de los ratones SPF, los ratones GF, los ratones colonizados por *Lactobacillus* o los ratones colonizados por *Clostridium*.

[Fig. 34] La Fig. 34 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los cólones completos obtenidos de ratones GF, de ratones colonizados por *Lactobacillus* o de ratones colonizados por *Clostridium* se cultivaban, y se analizaron los sobrenadantes de cultivo de los mismos para la concentración de TGF- β 1 por ELISA.

[Fig. 35] La Fig. 35 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando las células epiteliales intestinales (IEC) obtenidas de ratones GF o de ratones colonizados por *Clostridium* se cultivaban, y se analizaron los sobrenadantes de cultivo de las mismas para la concentración de TGF- β 1 por ELISA.

[Fig. 36] La Fig. 36 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se cultivaron células T CD4⁺ esplénicas junto con un anticuerpo anti-CD3 y con un sobrenadante de cultivo de IEC obtenidas de ratones GF o de ratones colonizados con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) en presencia o en ausencia de un anticuerpo anti-TGF- β , y se recogieron las células T en el día 5 del cultivo y se analizaron para la expresión de Foxp3 por RT-PCR a tiempo real.

[Fig. 37] La Fig. 37 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se inocularon por vía oral ratones C57BL/6 GF con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o con tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.), y se recogieron IEC tres semanas después de la inoculación y se analizaron para el nivel de expresión relativa del ARNm del gen MMP2 por RT-PCR a tiempo real.

[Fig. 38] La Fig. 38 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se inocularon por vía oral ratones C57BL/6 GF con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o con tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.), y se recogieron IEC tres semanas después de la inoculación y se analizaron para el nivel de expresión relativa del ARNm del gen MMP9 por RT-PCR a tiempo real.

[Fig. 39] La Fig. 39 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se inocularon por vía oral ratones C57BL/6 GF con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o con tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.), y se recogieron IEC tres semanas después de la inoculación y se analizaron para el nivel de expresión relativa del ARNm del gen MMP13 por RT-PCR a tiempo real.

[Fig. 40] La Fig. 40 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se inocularon por vía oral ratones C57BL/6 GF con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o con tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.), y se recogieron IEC tres semanas después de la inoculación y se analizaron para el nivel de expresión relativa del ARNm del gen IDO por RT-PCR a tiempo real.

[Fig. 41] La Fig. 41 es un gráfico a que muestra los resultados obtenidos cuando se trataron ratones de control (SPF) y ratones a los que se había administrado *Clostridium* (SPF+Clost.) con DSS al 2 %, se observaron y se midieron para la pérdida de peso corporal, para la dureza de las deposiciones y para la hemorragia durante seis días, y después se evaluaron numéricamente.

[Fig. 42] La Fig. 42 es una fotografía que muestra el estado de los cólones recogidos en el día 6 después de que los ratones de control (SPF) y los ratones a los que se administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se trataran con DSS al 2 %.

[Fig. 43] La Fig. 43 muestra fotomicrografías que muestran los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) o los ratones a los que administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se trataron con DSS al 2 %, y los cólones de los mismos se recogieron en el día 6 y se analizaron histológicamente por tinción con HE.

[Fig. 44] La Fig. 44 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones a los que se administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se sensibilizaron con oxazolona, y posteriormente se trató el interior de cada recto con una solución de oxazolona al 1 %/etanol al 50 %, y se midió la pérdida de peso corporal.

[Fig. 45] La Fig. 45 muestra fotomicrografías que muestran los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones a los que se administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se sensibilizaron con oxazolona, y posteriormente se trató el interior de cada recto con una solución de oxazolona al 1 %/etanol al 50 %, y los cólones obtenidos por el tratamiento se analizaron histológicamente por tinción con HE.

[Fig. 46] La Fig. 46 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones a los que se administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se inmunizaron administrando ovalbúmina absorbida en alumbre (OVA) dos veces a un intervalo de 2 semanas, y se recogieron los sueros de los mismos y se analizaron para la concentración de IgE específica para OVA en estos sueros por ELISA.

[Fig. 47] La Fig. 47 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones a los que se administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se inmunizaron administrando OVA absorbida en alumbre dos veces a un intervalo de 2 semanas, y se recogieron las células esplénicas y se analizaron para la producción de IL-4 de estas células esplénicas por re-estimulación de OVA *in vitro*.

[Fig. 48] La Fig. 48 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones a los que se administró *Clostridium* (SPF+Clost.) se inmunizaron administrando OVA absorbida en alumbre dos veces a un intervalo de 2 semanas, y se recogieron las células esplénicas y se analizaron para la producción de IL-10 de estas células esplénicas por re-estimulación de OVA *in vitro*.

[Fig. 49] La Fig. 49 es un árbol filogenético construido por el método de unión de vecinos con las secuencias resultantes de las 41 cepas de *Clostridium* y aquellas de bacterias conocidas obtenidas de la base de datos GenBank usando el software Mega.

[Fig. 50] La Fig. 50 son histogramas que muestran la expresión de Foxp3 en células CD4 sincronizadas de ratones GF (ratón n.º 1 y n.º 2 libres de gérmenes) o de ratones GF colonizados con tres cepas de *Clostridium* pertenecientes al grupo IV (3 cepas de Clost. ratón n.º 1 y n.º 2).

[Fig. 51] La Fig. 51 son histogramas que muestran la expresión de Foxp3 por linfocitos CD4 positivos de ratones GF (GF) o de ratones GF alimentados por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo (GF+Cloro.).

[Fig. 52] La Fig. 52 es un gráfico que muestra la expresión de Foxp3 por linfocitos CD4 positivos de ratones GF (GF) o de ratones GF alimentados por sonda con deposición humana tratada con cloroformo (GF+Cloro.).

[Fig. 53] La Fig. 53 es un gráfico que muestra las cantidades de *Clostridium* y *Bacteroides* en heces de ratones alimentados por sonda con deposición humana tratada con cloroformo.

Descripción de realizaciones

"Células T reguladoras" significa células T CD4 positivas factor Foxp3-positivas.

El significado de "induce la proliferación o la acumulación de células T reguladoras" en la presente invención incluye un efecto de inducir la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras, cuya diferenciación conduce a la proliferación o a la acumulación de células T reguladoras. Además, el significado de "induce la proliferación o la acumulación de células T reguladoras" en la presente invención incluye efectos *in vivo*, efectos *in vitro* y efectos *ex vivo*. Por consiguiente, se incluyen todos los siguientes efectos: un efecto de inducir proliferación o acumulación *in vivo* de células T reguladoras a través de la administración o la ingestión de las bacterias que pertenecen al género *Clostridium* o de la sustancia fisiológicamente activa o similares obtenida de las bacterias; un efecto de inducción de la proliferación o de la acumulación de células T reguladoras cultivadas causando que las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o de la sustancia fisiológicamente activa o similares obtenida de las bacterias actúe sobre las células T reguladoras cultivadas; y un efecto de inducción de la proliferación o la acumulación de células T reguladoras que se recogen de un organismo vivo y que se pretenden introducir posteriormente en un organismo vivo, tal como el organismo del que se obtuvieron u otro organismo, causando que las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa o similares obtenida de las bacterias actúen sobre las células T reguladoras. El efecto de inducción de la proliferación o la acumulación de células T reguladoras puede evaluarse, por ejemplo, del siguiente modo. Específicamente, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa o similares obtenida de las bacterias se administra por vía oral a un animal experimental tal como un ratón libre de gérmenes, después las células CD4 positivas en el colon se aíslan, y se mide la relación de células T reguladoras contenidas en las células CD4 positivas por citometría de flujo (remítase al Ejemplo 7).

Las células T reguladoras de las que se induce la proliferación o la acumulación por la composición de la presente invención son células T reguladoras factor de transcripción Foxp3-positivas.

Las "bacterias pertenecientes al género *Clostridium*", que son el ingrediente activo en la composición de la presente invención, son como se definen en las reivindicaciones adjuntas a la misma.

Pueden usarse dos o más cepas de las bacterias juntas para la composición de la presente invención. El uso de múltiples cepas de bacterias pertenecientes al grupo XIVa o al grupo IV en combinación puede conseguir un excelente efecto sobre las células T reguladoras. Además de las bacterias pertenecientes a estos grupos, también pueden usarse bacterias pertenecientes a otros grupos (por ejemplo, bacterias pertenecientes al grupo III) en combinación. Si se usa más de una cepa de bacterias (por ejemplo, una o más cepas pertenecientes al grupo XIVa, una o más cepas pertenecientes al grupo IV, uno o más cepas pertenecientes a un grupo diferente al grupo XIVa o al grupo IV, tal como una o más cepas pertenecientes al grupo III), el tipo y la cantidad de cepas usadas puede variar ampliamente. El tipo y la cantidad a usarse puede determinarse basándose en una diversidad de factores (por ejemplo, el efecto deseado, tal como la inducción o la inhibición de la proliferación o la acumulación de células T

reguladoras; la enfermedad o la afección a tratarse, prevenirse o reducirse en su gravedad; la edad o el género del destinatario). Las cepas pueden estar presentes en una única composición, en cuyo caso se consumirán o ingerirán juntas, o pueden estar presentes en más de una composición (por ejemplo, cada una puede estar en una composición diferente), en cuyo caso pueden consumirse individualmente o las composiciones pueden combinarse y la combinación resultante (composiciones combinadas) consumirse o ingerirse. Puede administrarse cualquier cantidad o combinación de cepas que demuestre ser eficaz (por ejemplo, cualquier cantidad de una a 200, tal como 1 a 100, 1 a 50, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 5 y cualquier cantidad entre las mismas). En ciertas realizaciones de la presente invención, se usa una combinación de algunas o de las 46 cepas descritas en el documento (Itoh, K., y Mitsuoka, T. Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. Lab. Animals 19: 111-118 (1985)). Por ejemplo, puede usarse al menos una, dos o más, tres, tres o más, cuatro, cuatro o más, cinco, cinco o más, seis, seis o más o cualquier otra cantidad de las 46 cepas descritas, incluyendo 46 cepas. Pueden usarse en combinación entre sí en combinación con cepas no descritas en la referencia citada (por ejemplo, en combinación con una o más cepas pertenecientes al grupo III).

Obsérvese que, el grupo de "bacterias pertenecientes al género *Clostridium*" puede identificarse, por ejemplo, del siguiente modo. Específicamente, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican por PCR usando un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO 64 y 65 (para *Clostridium spp.* perteneciente al grupo XIVa) o un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO 66 y 67 (para *Clostridium spp.* perteneciente al grupo IV) (remítase al Ejemplo 18). Además, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican secuenciando el gen de ARNr 16S amplificado usando un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO 19 y 20 (remítase al Ejemplo 7).

Pueden usarse células viables de las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* para la composición de la presente invención, y también pueden usarse células inactivadas de las mismas para la composición. Además, desde el punto de vista de la estabilidad al calor, resistencia a antibióticos y similares, y el largo periodo de almacenamiento, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* están preferiblemente en forma de esporas.

El significado de la "sustancia fisiológicamente activa obtenida de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*" como se usa en este documento, incluye sustancias contenidas en las bacterias, productos de secreción de las bacterias y metabolitos de las bacterias. Dicha sustancia fisiológicamente activa puede identificarse purificando un componente activo de las bacterias, un sobrenadante de cultivo de las mismas o contenidos de tracto intestinal en el tracto intestinal de un ratón en que se colonizaron solamente bacterias pertenecientes al género *Clostridium* por un método de purificación ya conocido.

El ingrediente activo "fracción formadora de esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero" en la composición de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que la fracción incluya bacterias formadoras de esporas presentes en heces de un mamífero, y tenga el efecto de inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras.

El ingrediente activo "fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero" en la composición de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que la fracción se obtenga tratado las heces de un mamífero con cloroformo (por ejemplo, cloroformo al 3 %), y tenga el efecto de inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras.

Obsérvese que el "mamífero" en la presente invención no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen seres humanos, ratones, ratas, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, monos, perros y gatos.

En cambio, cuando la "fracción formadora de esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero" o la "fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero" se cultiva en un medio, se liberan sustancias contenidas en las bacterias, productos de secreción de las bacterias, metabolitos de las bacterias desde las bacterias y similares contenidas en la fracción. El significado del ingrediente activo "sobrenadante de cultivo de la fracción" en la composición descrita en este documento incluye dichas sustancias, productos de secreción y metabolitos. El sobrenadante de cultivo no está particularmente limitado, siempre que el sobrenadante de cultivo tenga el efecto de inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras. Ejemplos del sobrenadante de cultivo incluyen una fracción proteica del sobrenadante de cultivo, una fracción de polisacárido del sobrenadante de cultivo, una fracción lipídica del sobrenadante de cultivo y una fracción de metabolito de bajo peso molecular del sobrenadante de cultivo.

La composición descrita en este documento puede estar en forma de una composición farmacéutica, de un alimento o una bebida (que también puede ser un pienso animal) o de un reactivo usado para un experimento de modelo animal, teniendo la composición farmacéutica, el alimento o la bebida y el reactivo el efecto de inducir la proliferación o la acumulación de células T reguladoras. Un ejemplo de la presente invención reveló que las células T reguladoras (células Treg) inducidas por bacterias o similares pertenecientes al género *Clostridium* suprimían la proliferación de células T efectoras. Por consiguiente, la composición de la presente invención puede usarse adecuadamente como una composición que tiene un efecto inmunosupresor. El efecto inmunosupresor puede evaluarse, por ejemplo, del siguiente modo. Específicamente, se causa que las células T reguladoras aisladas de un animal experimental, tal

como un ratón, al que se administra por vía oral la composición de la presente invención, actúen sobre las células T efectoras (células CD4⁺CD25⁻) aisladas del bazo, y después se mide la capacidad de proliferación de las mismas usando la cantidad de ingesta de [³H]-timidina como un índice (remítase al Ejemplo 14).

La composición de la presente invención puede usarse, por ejemplo, como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria tal como enfermedad crónica inflamatoria del intestino, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o enfermedad de Hashimoto, o una enfermedad alérgica tal como polinosis o asma; una composición farmacéutica para suprimir el rechazo en trasplante de órganos o similares; un alimento o bebida para mejorar las funciones inmunitarias; o un reactivo para suprimir la proliferación o función de las células T efectoras.

Ejemplos más específicos de enfermedades diana de la composición de la presente invención incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas y rechazos en trasplante de órganos y similares, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esprue, artritis autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra hospedador después de trasplante de médula ósea, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus sistémico eritematoso, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, dermatitis atópica, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlejn, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, síndrome de deficiencia poliglandular de tipo I y síndrome de deficiencia poliglandular de tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía asociada con *Chlamydia*, *Yersinia* y *Salmonella*, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, alergias a alimentos, enfermedad ampollar autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica Combs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de gigantocitos, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria criptogénica, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con inmunodeficiencia adquirida, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia común variable), cardiomiopatía dilatada, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial posinflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad del tejido conectivo asociada a enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad mixta del tejido conectivo asociada a enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada a enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada a enfermedad pulmonar intersticial, lupus sistémico eritematoso asociado a enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad de Sjogren asociada a enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, hem siderosis asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis por radiación, bronquiolititis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar de infiltración linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial posinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 (hepatitis autoinmunitaria clásica o lúpica), hepatitis autoinmunitaria de tipo 2 (hepatitis con anticuerpos anti-LKM), hipoglucemia de mediación autoinmunitaria, resistencia a la insulina de tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmunitaria, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, lupus discoide eritematoso, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad al esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), diabetes mellitus insulino dependiente, oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad autoinmunitaria de tiroides, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmunitario bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmunitario atrófico, mixoedema primario, uveítis facógena, vasculitis primaria, vitiligo, rinitis alérgica (alergias al polen), anafilaxis, alergias a mascotas, alergias al látex, alergias a fármacos, rinoconjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, gastroenteritis eosinofílica, lupus eritematoso cutáneo, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico y gastroenteritis eosinofílica.

La composición de la presente invención también puede usarse como una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades infecciosas en un individuo cuya resistencia a las enfermedades infecciosas está alterada a causa de daños debido a inflamación excesiva causada por la inmunidad.

Ejemplos de patógenos infecciosos que alteran el mantenimiento o recuperación de la homeostasis de un hospedador, y que finalmente logran dicho daño al tejido inmunopatológico incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium* (que causa la enfermedad tuberculosis), protozoos (que causan la enfermedad

malaria), nematodos filarias (que causan la enfermedad filariasis), *Schistosoma* (que causa la enfermedad esquistosomiasis), *Toxoplasma* (que causa la enfermedad toxoplasmosis), *Leishmania* (que causa la enfermedad leishmaniasis), HCV y HBV (que causan la enfermedad hepatitis C y hepatitis B) y virus del herpes simple (que causan la enfermedad herpes).

Pueden formularse preparaciones farmacéuticas a partir de la composición de la presente invención por métodos ya conocidos de formulación de fármacos. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede usarse por vía oral o por vía parenteral en las formas de cápsulas, comprimidos, píldoras, líquidos, polvos, gránulos, gránulos finos, preparaciones recubiertas con película, gránulos, trociscos, preparaciones sublinguales, masticables, preparaciones bucales, pastas, jarabes, suspensiones, elixires, emulsiones, linimentos, pomadas, emplastes, cataplasmas, sistemas de absorción transdérmica, lociones, inhalaciones, aerosoles, inyecciones, supositorios y similares.

Para formular estas preparaciones, la composición de la presente invención puede usarse en combinación apropiada con vehículos farmacológicamente aceptables o aceptables para un alimento o bebida, específicamente, con agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, disolvente, un material de base, un emulsionante, un agente de suspensión, un tensioactivo, un estabilizante, un agente aromatizante, un aromático, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, un diluyente, un agente de ajuste de la tonicidad, un agente calmante, un agente de relleno, un agente disgregante, un agente tamponante, un agente de recubrimiento, un lubricante, un colorante, un edulcorante, un agente espesante, un agente aromatizante, un solubilizante, otros aditivos o similares.

Por ahora, para formular una preparación farmacéuticamente de la misma y, particularmente, para formular una preparación farmacéutica para administración oral, es preferible usar en combinación una composición que posibilite un suministro eficaz de la composición de la presente invención al colon, desde el punto de vista de una inducción más eficaz de la proliferación o acumulación de células T reguladoras en el colon.

Dicha composición o método que posibilita el suministro al colon no está particularmente limitado, y pueden emplearse composiciones y métodos conocidos según lo apropiado. Ejemplos de los mismos incluyen composiciones sensibles al pH, más específicamente, polímeros entéricos que liberan sus contenidos cuando el pH se vuelve alcalino después del paso de los polímeros entéricos a través del estómago. Cuando se usa una composición sensible al pH para formular la preparación farmacéutica, la composición sensible al pH es preferiblemente un polímero cuyo umbral de pH de descomposición de la composición es de 6,8 a 7,5. Dicho intervalo de valores numéricos es un intervalo donde el pH se desplaza hacia el lado alcalino en una parte distal del estómago y, por tanto, es un intervalo adecuado para su uso en el suministro al colon.

Además, otro ejemplo de la composición que posibilita el suministro al colon se una composición que asegura el suministro al colon retardando la liberación de los contenidos en aproximadamente 3 a 5 horas, que corresponde al tiempo de tránsito del intestino delgado. En un ejemplo de formulación de una preparación farmacéutica usando la composición para retardar la liberación, se usa un hidrogel como revestimiento. El hidrogel se hidrata y se hincha tras el contacto con el fluido gastrointestinal, de modo que los contenidos se liberan de forma eficaz. Además, las unidades de dosificación de liberación retardada incluyen composiciones que contienen fármaco que tienen un material que recubre o recubre selectivamente un fármaco. Ejemplos de dicho material de recubrimiento selectivo incluyen polímeros degradables *in vivo*, polímeros gradualmente hidrolizables, polímeros gradualmente solubles en agua y/o polímeros degradables por enzimas. El material de recubrimiento preferido para retardar de forma eficaz la liberación no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen polímeros basados en celulosa tales como hidroxipropil celulosa, polímeros y copolímeros de ácido acrílico tales como polímeros y copolímeros de ácido metacrílico, y polímero y copolímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona.

Ejemplos de la composición que posibilita el suministro al colon incluyen adicionalmente composiciones bioadhesivas que se adhieren específicamente a la membrana mucosa del colon (por ejemplo, un polímero descrito en la memoria descriptiva de la patente de Estados Unidos n.º 6.368.586) y composiciones en que se incorpora un inhibidor de proteasa para proteger particularmente a una preparación biofarmacéutica, en los tractos gastrointestinales, de la descomposición debido a una actividad de una proteasa.

Un ejemplo de un sistema que posibilita el suministro al colon es un sistema de suministro de una composición al colon por cambio de presión de tal modo que los contenidos se liberan utilizando el cambio de presión causado por la generación de gas en la fermentación bacteriana en una parte distal del estómago. Dicho sistema no está particularmente limitado, y un ejemplo más específico del mismo es una cápsula que tiene contenidos dispersados en una base de supositorio y que está recubierta con un polímero hidrófobo (por ejemplo, etil celulosa).

Otro ejemplo del sistema que posibilita el suministro al colon es un sistema de suministro de una composición al colon, descomponiéndose el sistema específicamente por una enzima (por ejemplo, una carbohidrato hidrolasa o una carbohidrato reductasa) presente en el colon. Dicho sistema no está particularmente limitado, y ejemplos más específicos del mismo incluyen sistemas que usan componentes alimenticios tales como polisacáridos no de almidón, amilosa, goma xantana y azopolímeros.

Cuando se usa como una composición farmacéutica, la composición de la presente invención puede usarse en

combinación con una composición farmacéutica ya conocida para su uso en inmunosupresión. Dicha composición farmacéutica conocida no está particularmente limitada, y puede ser al menos una composición terapéutica seleccionada del grupo que consiste en corticosteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolina de sodio, anti-leucotrienos, fármacos anti-colinérgicos para la rinitis, descongestivos anti-colinérgicos, estabilizantes de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas (preferiblemente vacunas usadas para vacunación donde la cantidad del alérgeno se aumenta gradualmente) y combinaciones de los mismos. Es preferible usar estas composiciones terapéuticas en combinación con la composición descrita en este documento.

Cuando la composición descrita en este documento se usa como un alimento o bebida, el alimento o bebida puede ser, por ejemplo, un alimento saludable, un alimento funcional, un alimento para uso saludable específico, un suplemento dietético, un alimento para pacientes o un pienso para animales. El alimento o bebida descrito en este documento puede ingerirse en las formas de las composiciones como se ha descrito anteriormente, y también puede ingerirse en las formas de diversos alimentos y bebidas. Ejemplos específicos de los alimentos y bebidas incluyen diversas bebidas tales como zumos, bebidas refrescantes, bebidas de té, preparaciones para beber, bebidas gelatinosas y bebidas funcionales; bebidas alcohólicas tales como cervezas; alimentos que contienen carbohidratos tales como productos alimenticios de arroz, fideos, panes y pastas; productos de pasta tales como embutidos de pescado, salchichas, productos de pasta de marisco; productos en bolsas sin refrigeración tales como curry, alimentos aderezados con salsas almidonadas espesas y sopas chinas; sopas; productos lácteos tales como leche, bebidas lácteas, helados, quesos y yogures; productos fermentados tales como pastas de soja fermentada, yogures, bebidas fermentadas y adobos; productos de alubias; diversos productos de confitería tales como productos occidentales de confitería incluyendo panecillos, galletas y similares, productos japoneses de confitería incluyendo bollos de mermelada de judías al vapor, gelatinas blandas de judía adzuki, y similares, caramelos, chicles, gominolas, postres fríos tales como gelatinas, flanes y postres congelados; alimentos instantáneos tales como sopas instantáneas y sopas de soja instantáneas; alimentos para microondas; y similares. Además, los ejemplos también incluyen alimentos y bebidas saludables preparados en formas de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, líquidos, pastas y gelatinas. La composición descrita en este documento puede usarse para animales incluyendo seres humanos. Los animales, diferentes a los seres humanos, no están particularmente limitados, y la composición puede usarse para diversos animales de ganadería, aves de corral, mascotas, animales experimentales y similares. Ejemplos específicos de los animales incluyen cerdos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, pollos, patos salvajes, avestruces, patos domésticos, perros, gatos, conejos, hámsteres, ratones, ratas, monos y similares, pero los animales no están limitados a los mismos.

Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los individuos en que la abundancia relativa de bacterias pertenecientes al grupo *Firmicutes* (el grupo al que pertenecen los grupos IV y XIVa de *Clostridium*) tienen mayor ganancia de peso corporal que individuos en que la abundancia relativa de bacterias pertenecientes al grupo *Bacteroidetes* es grande. Por consiguiente, la composición descrita en este documento es capaz de condiciones la absorción de nutrientes y mejorar la eficacia de la alimentación. Desde dicho punto de vista, la composición descrita en este documento puede usarse para promover la ganancia de peso corporal, o para un pienso para animales bueno en la eficacia de alimentación.

Además, la adición de la composición descrita en este documento a un pienso para animales sin antibiótico hace posible aumentar el peso corporal de un sujeto que ingiere el pienso para animales hasta un nivel igual a o mayor que lo conseguido por piensos para animales que contienen antibiótico, y también hace posible reducir las bacterias patogénicas en el estómago hasta un nivel igual a lo conseguido por piensos para animales típicos que contienen antibiótico. Por consiguiente, la composición descrita en este documento puede usarse para un pienso para animales que no necesita la adición de antibióticos.

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

El suministro de dicho pienso para animales usando la composición descrita en este documento no está particularmente limitado, y el pienso para animales puede suministrarse a un sujeto a intervalos regulares de un modo selectivo, o puede suministrarse durante un cierto periodo (por ejemplo, en su nacimiento, durante el destete o cuando el sujeto a alimentar se reubica o traslada).

Además, desde el punto de vista descrito anteriormente, la composición descrita en este documento puede usarse para seres humanos malnutridos. En otras palabras, también cuando el sujeto que ingiere la composición es un ser humano, la composición descrita en este documento puede usarse para promover la ganancia de peso corporal, y potenciar la absorción de energía desde los alimentos.

El alimento o bebida puede fabricarse por una técnica de fabricación que es bien conocida en el campo técnico. Al alimento o bebida, se le puede añadir uno o más componentes (por ejemplo, un nutriente) que son eficaces para la

mejora de una función inmunitaria por el efecto inmunosupresor. Además, el alimento o bebida puede combinarse con otro componente u otro alimento funcional que muestra una función diferente de la función de la mejora de una función inmunitaria para servir de ese modo como un alimento o bebida multifuncional.

Además, la composición descrita en este documento puede incorporarse en alimentos que requieren una etapa de procesamiento que puede destruir las cepas probióticas habituales. Específicamente, las cepas probióticas más útiles de forma comercial no pueden incorporarse en alimentos que tienen que procesarse por uno cualquiera de un tratamiento térmico, almacenamiento a largo plazo, un tratamiento de congelación, un tratamiento de acción mecánica y un tratamiento de alta presión (por ejemplo, formación por extrusión o formación con rodillo). Por otro lado, a causa de la naturaleza ventajosa de la formación de esporas, la composición de la presente invención puede incorporarse fácilmente en dichos alimentos procesados.

Por ejemplo, las composiciones en forma de esporas pueden sobrevivir en un alimento seco, y pueden permanecer vivas incluso después de haberse ingerido. Asimismo, la composición descrita en este documento puede resistir procesos de esterilización a baja temperatura, típicamente procesos a una temperatura en un intervalo de 70°C hasta el punto de ebullición, ambos inclusive. Por tanto, la composición descrita en este documento puede incorporarse en todos los tipos de productos lácteos. Además, la composición descrita en este documento puede resistir el almacenamiento a largo plazo de muchos años; el procesamiento a alta temperatura tal como cocción y hervido; el procesamiento a baja temperatura tal como congelación y almacenamiento en frío; y tratamientos a alta presión tales como formación por extrusión y formación con rodillo.

Los alimentos que tienen que procesarse en dichas condiciones severas no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen alimentos que tienen que procesarse en un horno microondas para ser comestibles (por ejemplo, harina de avena), alimentos que tienen que cocerse para ser comestibles (por ejemplo, muffin), alimentos que tienen que someterse a un tratamiento de esterilización a alta temperatura durante un corto periodo de tiempo para ser comestibles (por ejemplo, leche), y alimentos que tienen que calentarse para poder beberse (por ejemplo, té caliente).

Cuando la composición se administra o ingiere, la cantidad de la misma para la administración o ingestión se selecciona según lo apropiado dependiendo de la edad, peso corporal, síntomas, condiciones de salud, de un sujeto, el tipo de la composición (un producto farmacéutico, un alimento o bebida, o similares) y similares. Por ejemplo, la cantidad por administración o ingestión es generalmente de 0,01 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal.

También se describe en este documento un producto de la composición (un producto farmacéutico, un alimento o bebida, o un reactivo) o un manual del mismo que puede proporcionarse con una nota que indique que el producto puede usarse para suprimir la inmunidad (incluyendo una nota que indique que el producto tiene un efecto inmunosupresor, y una nota que indique que el producto tiene un efecto de supresión de la proliferación o función de células T efectoras). Aquí, la "aportación al producto o el manual del mismo de una nota" significa que la nota se proporciona en un cuerpo principal, un recipiente, un envase o similar del producto, o la nota se proporciona a un manual, un prospecto, un folleto u otro material impreso, que describe información sobre el producto.

Método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras

Como se ha descrito anteriormente, y como se mostrará en los Ejemplos, la administración de la composición descrita en este documento a un individuo hace posible inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en el individuo.

Obsérvese que el término "individuo", como se usa en este documento, no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen seres humanos, diversos tipos de ganado, aves de corral, mascotas, animales experimentales y similares. El "individuo" puede estar en un estado saludable o un estado patológico.

Además, como se mostrará en el Ejemplo 5 a describirse posteriormente, las bacterias comensales Gram-positivas desempeñan papeles principales en la proliferación o acumulación de células T reguladoras.

Como se usa en este documento, la expresión "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" no está particularmente limitada, y ejemplos de la misma incluyen antibióticos aminoglucosídicos (amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina y paromomicina), antibióticos de cefalosporina (cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona y cefoxotina), sulfonamidas, ampicilina y estreptomycin. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, el "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" de acuerdo con la presente invención es preferiblemente uno que reduce las bacterias Gram-negativas, y contribuye a la colonización de bacterias Gram-positivas.

Además, una composición prebiótica tal como piel de almendra, inulina, oligofructosa, rafinosa, lactulosa, pectina, hemicelulosa (tal como xiloglucano y alfa-glucanos), amilopectina y almidón resistente que no se descomponen en el tracto gastrointestinal superior y promueven el crecimiento de microbios intestinales en el tracto intestinal, así como

factores de crecimiento tales como acetil-Co A, biotina, melazas de remolacha y extractos de levadura, contribuye a la proliferación de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*.

El "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" descrito anteriormente y la "composición prebiótica o factor de crecimiento" descrito anteriormente pueden usarse en combinación. Dicho uso combinado no está particularmente limitado, y ejemplos del uso combinado son los siguientes: el "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" se administra a un individuo por anticipado, y después se administra la composición de la presente invención; el "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" y la composición de la presente invención se administran simultáneamente a un individuo; la "composición prebiótica o factor de crecimiento" se administra a un individuo por anticipado y después se administra la composición de la presente invención; la "composición prebiótica o factor de crecimiento" y la composición de la presente invención se administran simultáneamente a un individuo; la composición de la presente invención, el "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" y la "composición prebiótica o factor de crecimiento" se administran a un individuo simultáneamente o individualmente en cualquier momento apropiado.

Además, puede administrarse una composición terapéutica a un individuo junto con al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en la composición de la presente invención, el "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" y la "composición prebiótica o factor de crecimiento".

Dicha composición terapéutica no está particularmente limitada, y puede ser al menos una composición terapéutica seleccionada del grupo que consiste en corticosteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolina de sodio, anti-leucotrienos, fármacos anti-colinérgicos para la rinitis, descongestivos anti-colinérgicos, estabilizantes de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE, vacunas (preferiblemente, vacunas usadas para vacunación donde la cantidad de un alérgeno se aumenta gradualmente) y combinaciones de los mismos. Es preferible usar estas composiciones terapéuticas en combinación con la sustancia descrita anteriormente.

Además, no hay ninguna limitación particular impuesta sobre el uso combinado de la composición terapéutica con al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en la composición descrita en este documento, el "antibiótico contra bacterias Gram-negativas" y la "composición prebiótica o factor de crecimiento". Por ejemplo, la "una sustancia" y la composición terapéutica se administran por vía oral o parenteral a un individuo simultáneamente o individualmente en cualquier momento apropiado.

Además, en el "método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras" descrito anteriormente, si la administración de la composición descrita en este documento o similar realmente induce o no la proliferación o acumulación de células T reguladoras puede determinarse usando, como un índice, el aumento o refuerzo de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en la cantidad de células T reguladoras, la relación de células T reguladoras en el grupo de células T del colon, una función de las células T reguladoras y la expresión de un marcador de células T reguladoras. Es preferible usar una medición seleccionada del grupo que consiste en la promoción de la expresión de IL-10, la promoción de la expresión de CTLA4, la promoción de la expresión de IDO y la supresión de la expresión de IL-4, como el índice de la inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras.

Obsérvese que los ejemplos de un método para detectar dicha expresión incluyen la transferencia de Northern, la RT-PCR y la transferencia dot blot para la detección de expresión génica al nivel de transcripción; y el ELISA, el radioinmunoensayo, la inmunotransferencia, la inmunoprecipitación y la citometría de flujo para la detección de la expresión génica al nivel de traducción.

Por ahora, una muestra usada para medir dicho índice no está particularmente limitada, y ejemplos de la misma incluyen sangre extraída como muestra de un individuo y trozos de tejido obtenidos en una biopsia.

Método para predecir la respuesta del individuo a la composición de la presente invención y/o pronóstico del individuo

En este documento se describe un método en que se determina la cantidad absoluta o la relación de bacterias pertenecientes al género *Clostridium* en la microbiota de un individuo y, cuando la relación o el valor absoluto de las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* está reducido en comparación con un valor basal obtenido realizando una determinación similar en un individuo en un estado saludable típico, se determina que el individuo es posiblemente sensible a la composición descrita en este documento.

En este documento se contempla un método para predecir la respuesta de un sujeto a una sustancia y/o se proporciona el pronóstico del sujeto. El método comprende medir el porcentaje o cantidades absolutas de los grupos IV y XIV de *Clostridium* en la microbiota del sujeto y compararlas con un valor basal de las mismas mediciones en un sujeto sano prototipo, donde una cantidad absoluta o nivel porcentual disminuido de los grupos IV y/o XIV de *Clostridium* indica que el sujeto puede responder favorablemente a las composiciones descritas en este documento.

El método puede comprender adicionalmente medir la composición de la microbiota del sujeto después de la administración de la sustancia, donde un aumento en el porcentaje o cantidad absoluta de *Clostridium* spp. Pertenece a los grupos IV, XIV después de la administración de las composiciones de la presente invención respecto a antes de la administración es un indicador positivo de inmunosupresión (o inmunorregulación) potenciada. La medición de la composición de la microbiota del sujeto puede hacerse con técnicas conocidas en la técnica, tales como secuenciación del ARNr 16s.

Obsérvese que, en estos métodos, la sustancia es al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (e):

(a) bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias;

(b) una fracción que forma esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero o un sobrenadante de cultivo de la fracción;

(c) una fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero o un sobrenadante de cultivo de la fracción;

(d) un antibiótico contra bacterias Gram-negativas; y

(e) al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en piel de almendra, inulina, oligofructosa, rafinosa, lactulosa, pectina, hemicelulosa (tal como xiloglucano y alfa-glucanos), amilopectina, acetil-Co A, biotina, melazas de remolacha, extractos de levadura y almidón resistente.

Método para inhibir la proliferación o acumulación de células T reguladoras

Como se mostrará en el Ejemplo 5 a describirse posteriormente, las bacterias comensales Gram-positivas tienen papeles principales en la proliferación o acumulación de células T reguladoras. Por consiguiente, en este documento se describe un método para inhibir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método una etapa de administrar un antibiótico contra bacterias Gram-positivas al individuo.

Como se usa en este documento, la expresión "antibiótico contra bacterias Gram-positivas" no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen antibióticos de cefalosporina (cefalexina, cefuroxima, cefadroxil, cefazolina, cefalotina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil y ceftobiprol); antibióticos de fluoroquinolona (cipro, Levaquin, floxina, tequina, avelox y norflox); antibióticos de tetraciclina (tetraciclina, minociclina, oxitetraciclina y doxiciclina); antibióticos de penicilina (amoxicilina, ampicilina, penicilina V, dicloxacilina, carbenicilina, vancomicina y metilicina); y antibióticos de carbapenem (ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina y meropenem).

Como se ha descrito anteriormente, el término "individuo", como se usa en este documento no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen seres humanos, diversos tipos de ganado, aves de corral, mascotas, animales experimentales y similares. El "individuo" puede estar en un estado saludable o un estado patológico. Dicho estado patológico no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen estado de estar sometido a inmunoterapia para el cáncer y de padecer una enfermedad infecciosa.

Además, como otro modo del "método para inhibir la proliferación o acumulación de células T reguladoras" descrito en este documento, está un método para inhibir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método una etapa de administrar al individuo uno cualquiera de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y un péptido, que son contra un antígeno que es al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

(a) bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias;

(b) una fracción que forma esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero o un sobrenadante de cultivo de la fracción; y

(c) una fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero o un sobrenadante de cultivo de la fracción.

Composición de vacuna y método para tratar o prevenir enfermedad infecciosa o enfermedad autoinmunitaria usando la composición de vacuna

Como se ha descrito anteriormente, y como se mostrará en el Ejemplo 15 a describirse posteriormente, la inducción de células Treg en el colon por *Clostridium* tiene un papel importante en las respuestas inmunitarias locales y sistémicas. Por consiguiente, también se describe en este documento una "composición de vacuna que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c): (a) bacterias pertenecientes al género *Clostridium*; (b) una espora de bacterias en una fracción que forma esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero; y (c) bacterias en una fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero" y un "método para tratar, ayudar a tratar, reducir la gravedad de o prevenir al menos una enfermedad seleccionada de enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias en un individuo, comprendiendo el método administrar la composición de vacuna al individuo".

Obsérvese que dichas "enfermedades autoinmunitarias" no están particularmente limitadas, y ejemplos de las mismas incluyen las descritas como los "ejemplos específicos de enfermedades diana" en <composición que tiene efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras>. Las "enfermedades infecciosas" tampoco están particularmente limitadas, y ejemplos de las mismas incluyen enfermedades infecciosas asociadas con "patógenos infecciosos" descritos como el "ejemplo de patógenos infecciosos" en <composición que tiene efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras>.

Método para seleccionar un compuesto que tiene actividad de promover la proliferación o acumulación de células T reguladoras

En este documento también se describe un método para seleccionar un compuesto que tiene una actividad de promover la proliferación o acumulación de células T reguladoras, comprendiendo el método:

(1) preparar una sustancia de ensayo de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

(a) bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias;

(b) una fracción que forma esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero o un sobrenadante de cultivo de la fracción; y

(c) una fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero o un sobrenadante de cultivo de la fracción.

(2) preparar mamíferos no humanos en que tiene que expresarse un gen indicador bajo el control de la expresión del gen de IL-10;

(3) poner la sustancia de ensayo en contacto con el mamífero no humano;

(4) después del contacto con la sustancia de ensayo, detectar células que expresan el gen indicador en un grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ del mamífero no humano, y determinar la cantidad de células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que expresan el gen indicador o una relación de células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que expresan el gen indicador a las células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que no expresan el gen indicador;

(5) detectar células que expresan el gen indicador en un grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ del mamífero no humano que no se ha puesto en contacto con la sustancia de ensayo, y determinar la cantidad de células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que expresan el gen indicador o una relación de células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que expresan el gen indicador a células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que no expresan el gen indicador; y

(6) comparar las cantidades absolutas o las relaciones determinadas en la etapa (4) con la cantidad o la relación determinada en (5), y determinar, cuando la cantidad o la relación determinada en (4) es mayor de la determinada en (5), que la sustancia de ensayo es un compuesto que promueve la proliferación o acumulación de células Treg.

La expresión "sustancia de ensayo", como se usa en este documento, no está particularmente limitada, siempre que la sustancia de ensayo se una sustancia preparada a partir de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en las sustancias (a) a (c). Ejemplos de la sustancia de ensayo incluyen proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos que se obtienen de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en las sustancias (a) a (c) descritas anteriormente.

La expresión "mamífero no humano en que tiene que expresarse un gen indicador bajo el control de la expresión del gen de IL-10", como se usa en este documento, no está particularmente limitada, siempre que el mamífero no humano sea un mamífero no humano que tenga un gen indicador cuya expresión está controlada por una región de control de la expresión del gen de IL-10 (por ejemplo, un promotor o un potenciador). Ejemplos de dicho gen indicador incluyen genes que codifican proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) y genes que codifican luciferasa. Como "mamífero no humano en que tiene que expresarse un gen indicador bajo el control de la expresión del gen de IL-10" de acuerdo con la presente invención, puede usarse preferiblemente un ratón IL10^{venus} a mostrarse posteriormente en los Ejemplos.

El término "contacto", como se usa en este documento, no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen administración de la sustancia de ensayo al mamífero no humano por vía oral o parenteral (por ejemplo, inyección intraperitoneal o inyección intravenosa).

En este documento también se describe un mamífero no humano que se usa para el método, y en que el gen indicador tiene que expresarse bajo el control de la expresión del gen de IL-10.

Además, en este documento también se describe un método para aislar, de una muestra de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, un compuesto que tiene una actividad de promover la proliferación o acumulación de células T reguladoras, comprendiendo el método las siguientes etapas (1) a (3):

(1) preparar un ADN genómico de la muestra de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*;

(2) insertar el ADN genómico en un sistema de clonación, y preparar una genoteca derivada de la muestra de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*; y

(3) aislar un compuesto que tiene una actividad de promover la proliferación o acumulación de células T reguladoras, mediante el uso de la genoteca obtenida en la etapa (2).

En dichas etapas, los métodos para la preparación y el aislamiento no están particularmente limitados, y pueden usarse técnicas conocidas para un sistema *in vitro* o *in vivo* según lo apropiado. Además, el compuesto aislado por este método no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen ácidos nucleicos (por ejemplo, un ADN, un ARNm y un ARNr) derivado de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, así como polipéptidos y proteínas derivadas de las bacterias pertenecientes al género *Clostridium*.

En este documento también se describe un método para determinar la composición de la microbiota en un individuo, donde el aumento en la relación o la cantidad absoluta de bacterias pertenecientes al género *Clostridium* después de la administración de la composición descrita en este documento al individuo con respecto a la relación o la cantidad absoluta antes de la administración se usa como un índice de inmunosupresión aumentada. En dicho método, el método para determinar la composición de la microbiota no está particularmente limitado, y pueden usarse técnicas conocidas (por ejemplo, secuenciación de ARNr 16S) según lo apropiado.

En este documento también se describe un método para medir la diferenciación de células Treg, donde el aumento en la diferenciación de células Treg en un individuo después de la administración de la composición descrita en este documento al individuo con respecto a antes de la administración se usa como un índice de inmunosupresión (o inmunorregulación) aumentada.

Además, la composición descrita en este documento también puede administrarse a un individuo en tratamiento con antibiótico. La cronología de la administración no está particularmente limitada, y la composición puede administrarse antes o simultáneamente con el tratamiento antibiótico, por ejemplo. Por ahora, la composición se administra preferiblemente en forma de espora desde el punto de vista de la resistencia a antibióticos.

Además, en un modo preferido de dicha administración, la composición descrita en este documento se administra después o simultáneamente con la administración de un antibiótico contra bacterias Gram-positivas, por ejemplo. Obsérvese que dicho "antibiótico contra bacterias Gram-positivas" no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen antibióticos de cefalosporina (cefalexina, cefuroxima, cefadroxil, cefazolina, cefalotina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil y ceftobiprol); antibióticos de fluoroquinolona (cipro, Levaquin, floxina, tequina, avelox y norflox); antibióticos de tetraciclina (tetraciclina, minociclina, oxitetraciclina y doxiciclina); antibióticos de penicilina (amoxicilina, ampicilina, penicilina V, dicloxacilina, carbenicilina, vancomicina y meticilina); y antibióticos de carbapenem (ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina y meropenem).

Por ahora, en otro modo preferido de dicha administración, la composición descrita en este documento se administra después (o simultáneamente con) un tratamiento usando vancomicina, metronidazol, linezolid, ramoplanina o fidaxomicina, por ejemplo.

Ejemplos

A partir de ahora en este documento, la presente invención se describe más específicamente sobre la base de los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los Ejemplos a continuación.

Obsérvese que los ratones usados en los Ejemplos se prepararon o produjeron del siguiente modo. En la siguiente descripción, los ratones pueden mencionarse con "SPF" o "GF" adjunto delante de los mismos. Estos "SPF" y "GF" indica que los ratones se mantuvieron en ausencia de bacterias patógenas específicas (libres de patógenos específicos, SPF), y que los ratones se mantuvieron en condiciones libres de gérmenes (GF), respectivamente.

Ratones

Se adquirieron ratones C57BL/6, Balb/c e IQI mantenidos en condiciones SPF o GF de Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Japón), JAPAN SLC, INC. (Japón), CLEA Japan, Inc. (Japón) o The Jackson Laboratory (EE. UU.). Se criaron ratones GF y ratones gnotobióticos y se mantuvieron en la instalación gnotobiótica de The University of Tokyo, Yakult Central Institute for Microbiological Research, o Sankyo Labo Service Corporation, Inc. Se produjeron ratones *Myd88*^{-/-}, *Rip2*^{-/-} y *Card9*^{-/-} como se describe en los documentos no de patente 1 a 3, y se retrocruzaron durante 8 generaciones o más, de modo que se consiguiera un fondo genético C57BL/6. Se adquirieron ratones Foxp3^{EGFP} de Jackson Laboratory.

Ratones II10^{Venus}

Para formar un locus bicistrónico que codifique tanto II10 como Venus bajo el control de un promotor II10, primero se creó una construcción de dirección. Específicamente, un casete (casete de IRES-Venus-señal poliA de SV40, remítase al documento no de patente 4) que estaba hecho de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), una proteína fluorescente amarilla (Venus) y una señal poliA de SV40 (SV40 poliA) y que estaba dispuesto cerca de un gen de resistencia a neomicina (neo), se insertó entre un codón de parada y una señal poliA (Exón 5) de un gen II10. A continuación, la construcción de dirección obtenida se usó para causar recombinación homóloga con la región génica II10 en el genoma de los ratones. Por tanto, se produjeron ratones II10^{Venus} que tenían alelos II10^{Venus} (remítase a la Fig. 1). Obsérvese que, en la Fig. 1 "tk" representa un gen que codifica la timidina quinasa, "neo"

representa el gen de resistencia a neomicina y "BamH1" representa un sitio de escisión por la enzima de restricción BamH1.

Se extrajeron los ADN genómicos de los ratones $Il10^{venus}$, se trataron con BamH1, y se sometieron a transferencia de Southern mediante el uso de una sonda mostrada en la Fig. 1. La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos. Se detectaron alelos de tipo silvestre e $Il10^{venus}$ como bandas que tenían tamaños de 19 kb y 5,5 kb, respectivamente. Por tanto, como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 2, se descubrió que la recombinación homóloga mostrada en la Fig. 1 sucedía en el genoma en los ratones $Il10^{venus}$.

Además, se clasificaron células $CD4^+ Venus^-$ o células $CD4^+ Venus^+$ en la lamina propia del colon de los ratones $Il10^{venus}$ mediante el uso de un FACSaria. Después, se realizó RT-PCR a tiempo real en un sistema ABI 7300 por un método a describirse posteriormente, para determinar la cantidad de ARNm de IL-10 expresado. Las Fig. 3 y 4 muestran los resultados obtenidos. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 3 y 4, se descubrió que, como el desarrollo del ARNm de IL-10 se detectaba solamente en las células $CD4^+ Venus^+$, la expresión del ARNm de IL-10 en los ratones $Il10^{venus}$ estaba reflejada correctamente en la expresión de Venus. Obsérvese que los estados libres de gérmenes de dichos ratones $Il10^{venus}$ se establecieron en el Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japón). Los ratones $Il10^{venus}$ en los estados libres de gérmenes se mantuvieron en aislantes de vinilo en Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Tokio, Japón), y se usaron en los siguientes Ejemplos.

Por ahora, los experimentos y análisis en los Ejemplos se realizaron del siguiente modo.

Método de colonización de ratones con bacterias y análisis de los mismos

De acuerdo con la descripción de los documentos no de patente 5 y 6, se produjeron ratones en que se colonizaron SFB o *Clostridium*. Se disolvieron los contenidos cecales o las heces de los ratones gnotobióticos obtenidos en agua estéril o una solución anaeróbica de dilución. Los contenidos cecales o heces disueltos tal cual o después de un tratamiento con cloroformo se administraron por vía oral a ratones GF. Se cultivaron por separado entre sí tres cepas de *Lactobacillus* y 16 cepas de *Bacteroides* en un medio de agar BL o EG de un modo anaeróbico. Se recogieron las bacterias cultivadas, se suspendieron en un caldo TS anaeróbico, y se administraron por vía oral de forma forzada a ratones GF. El estado de la colonización de las bacterias en los ratones se evaluó por observación microscópica realizada en una preparación de frotis de gránulos fecales.

Separación de células y citometría de flujo

Para aislar los linfocitos de la lamina propia del colon y la lamina propia del intestino delgado, se recogieron el intestino delgado y el colon, y se cortaron abiertos longitudinalmente. Después, se lavaron el contenido fecal y similares en su interior para retirarlos. Posteriormente, el intestino delgado y el colon se agitaron en HBSS que contenía 5 mM de EDTA a 37°C durante 20 minutos. Después de la retirada del epitelio y el tejido graso, los tejidos intestinales se cortaron en trozos pequeños. A los trozos pequeños, se les añadieron RPMI 1640 (suero bovino fetal (FBS) al 4%, 1 mg/ml de collagenasa D, 0,5 mg/ml de dispasa y 40 µg/ml de DNasal (todos los cuales se fabricaron por Roche Diagnostics K.K.)), y la mezcla se agitó en un baño de agua mantenido a 37°C durante 1 hora. Los tejidos digeridos se lavaron con HBSS que contenía 5 mM de EDTA, y se resuspendieron en 5 ml de percoll al 40% (GE Healthcare). La suspensión se sobrepuso sobre 2,5 ml de percoll al 80% en un tubo Falcon de 15 ml. Después, se realizó centrifugación a temperatura ambiente y a 2000 rpm durante 20 minutos para realizar la separación de las células por centrifugación en gradiente de densidad de percoll. Se recogieron las células en la superficie de contacto, y se usaron como linfocitos de la lamina propia. Las células recogidas se suspendieron en un tampón de tinción (PBS, FBS al 2%, EDTA 2 mM, y NaN_3 al 0,09%), y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo anti-CD4 (RM4-5, BD Biosciences) marcado con PE o PE-Cy7. Después de la tinción de CD4, se tiñó Foxp3 en las células mediante el uso del Cytofix/Cytoperm Kit Plus con Golgisto (BD Biosciences) o el conjunto de tampón de tinción de Foxp3 (eBioscience), así como un anticuerpo anti-Foxp3 (FJK-16s, eBioscience) marcado con Alexa647. Se realizó citometría de flujo mediante el uso de un FACScant II, y los datos se analizaron por el software FlowJo (TreeStar Inc.). La clasificación de las células se realizó mediante el uso de un FACSaria.

RT-PCR a tiempo real

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

Foxp3
5'-GGCAATAGTTCCTTCCCAGAGTT-3' (SEQ ID NO: 1)
5'-GGGTCGCATATTGTGGTACTTG-3' (SEQ ID NO: 2)

CTLA4

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

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

5 GTR

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

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

IL-10

10 5'-GATTTTAATAAGCTCCAAGACCAAGGT-3' (SEQ ID NO: 7)

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

GAPDH

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

15 5'-TCTCCACTTTGCCACTGCAA-3' (SEQ ID NO: 10)

Mmp2

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

20 5'-CTTGTACGTGGTGTCACTG-3' (SEQ ID NO: 12)

Mmp9

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

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

25 Mmp13

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

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

Ido1

30 5'-AGAGGATGCGTGACTTTGTG-3' (SEQ ID NO: 17)

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

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

35 En primer lugar, se recogió el colon, se cortó abierto longitudinalmente, y se aclaró con PBS. Posteriormente, el colon se trató con ditioneitol (DTT) 1 mM a 37°C durante 30 minutos en un agitador, y después se agitó con vórtice durante un minuto para alterar la integridad epitelial. Las IEC liberadas se recogieron, y se suspendieron en 5 ml de percoll al 20%. La suspensión se sobrepuso sobre 2,5 ml de percoll al 80% en un tubo Falcon de 15 ml. Después, el tubo se centrifugó a 25°C y 780 g durante 20 minutos para realizar la separación de células por centrifugación en gradiente de densidad de percoll. Se recogieron las células en la superficie de contacto, y se usaron como IEC colónicas (pureza: 90% o mayor, viabilidad: 95%). Las IEC obtenidas así recogidas se suspendieron en RPMI que contenía FBS al 10%, y se cultivaron 1 x 10⁵ células de las IEC en una placa de 24 pocillos durante 24 horas. Después de ello, se recogió el sobrenadante de cultivo, y se midió para el nivel de TGF-β1 activo por ELISA (Promega).

45 Por ahora, para cultivar células T *in vitro*, se cultivaron 1,5 x 10⁵ células T CD4⁺ esplénicas purificadas por MACS en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, junto con un medio condicionado al 50% en que se cultivaron las IEC aisladas de ratones GF o ratones colonizados con *Clostridium*, y con 25 ng/ml de hIL-2 (Peprotech), en presencia o ausencia de 25 µg/ml de un anticuerpo anti-TGF-β (R&D). Obsérvese que 10 µg/ml de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 (BD Bioscience) se unieron a la placa de fondo redondo. Después de un cultivo de 5 días, se recogieron las células T CD4⁺, y se sometieron a una PCR a tiempo real.

Modelo experimental de colitis

55 Una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium* se administró por vía oral a ratones C57BL/6 (2 semanas de edad), y se hicieron crecer en un entorno convencional durante seis semanas.

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

65 Por ahora, para preparar un modelo de colitis inducida por oxazolona, los ratones se presensibilizaron por aplicación transdérmica, al ratón, de 150 µl de una solución de oxazolona (4-etoximetileno-2-fenil-2-oxazolin-5-ona, Sigma-Aldrich) al 3%/etanol al 100%. Cinco días después de eso, se administraron por vía intrarrectal 150 µl de una solución de oxazolona al 1%/etanol al 50% de nuevo a los ratones presensibilizados bajo ligera anestesia. Obsérvese que la administración intrarrectal se realizó usando un catéter 3,5F.

Cada ratón se analizó diariamente para el peso corporal, sangre oculta, hemorragia visible a simple vista (sangre manifiesta), y la dureza de las deposiciones. Además, se evaluó numéricamente el porcentaje de pérdida de peso corporal, la hemorragia intestinal (sin hemorragia, sangre oculta (hemocult+), o hemorragia visible a simple vista), y la dureza de las deposiciones (deposición normal, deposición suelta o diarrea), y se calculó el índice de actividad de enfermedad (DAI) de acuerdo con la descripción en "S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M. F. Neurath, Nat Protoc 2, 541 (2007)".

Reacción de IgE específica de OVA

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

Análisis estadístico

Se evaluó la diferencia entre los grupos de control y experimentales por el ensayo t de Student.

Ejemplo 1

En primer lugar, se investigó si la acumulación de células T reguladoras (células Treg) en la lamina propia del colon era dependiente o no de bacterias comensales. Específicamente, se aislaron linfocitos de ganglios linfáticos periféricos (pLN) de ratones Balb/c criados en ausencia de bacterias patogénicas específicas (SPF) o de la lamina propia del colon o el intestino delgado (SI) de los ratones. Se tiñeron CD4 y Foxp3 por anticuerpos. Después, se analizó la relación de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ por citometría de flujo. La Fig. 5 muestra los resultados obtenidos. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 5, se descubrió que había células Treg Foxp3⁺ presentes a una alta frecuencia en la lamina propia de los tractos gastrointestinales, especialmente en la lamina propia del colon, de los ratones mantenidos en el entorno libre de microorganismos patogénicos específicos (SPF). Además, también se descubrió que la cantidad de células Treg Foxp3⁺ en la lamina propia del colon aumentaba gradualmente hasta tres meses después de su nacimiento, mientras que la cantidad de células Treg Foxp3⁺ en los ganglios linfáticos periféricos era básicamente constante desde el momento de dos semanas después de su nacimiento.

Ejemplo 2

A continuación, se investigó si la acumulación temporal de las células Treg en el colon encontradas en el Ejemplo 1 tenía o no una relación con la colonización de la microbiota comensal intestinal. Específicamente, se analizó la expresión de CD4 y la expresión de Foxp3 en linfocitos aislados del intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos periféricos de ratones criados en un entorno libre de gérmenes (GF) o SPF (8 semanas de edad: ratones Balb/c, ratones IQL y ratones C57BL/6). Se obtuvieron resultados similares en tres o más experimentos independientes. Las Fig. 6 y 7 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 7, cada círculo blanco representa la cantidad absoluta de células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, y las barras de error representan las desviaciones típicas (SD).

Además, se recogieron linfocitos de la lamina propia de ratones SPF y ratones GF (ratones Balb/c o ratones C57BL/6). Se tiñeron CD4 y Foxp3 con anticuerpos. Después, los linfocitos de la lamina propia se analizaron por FACS. La Fig. 8 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 8 cada círculo blanco representa la cantidad absoluta de células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, ** indica que "P < 0,001", y * indica que "P < 0,01".

Además, se aislaron linfocitos de la lamina propia del colon, la lamina propia del intestino delgado (SI), placas de Peyer (PP) y ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones (ratones SPF C57BL/6) a los que se habían administrado por vía oral antibióticos con agua durante ocho semanas. Se tiñeron CD4 y Foxp3 con anticuerpos. Después, los linfocitos se analizaron por FACS. Se obtuvieron resultados similares en dos o más experimentos independientes. La Fig. 9 muestra los resultados obtenidos (la relación de las células Foxp3⁺ en las células CD4⁺ de un ratón individual). Obsérvese que los siguientes antibióticos se usaron en combinación de acuerdo con la descripción en el siguiente documento:

ampicilina (A; 500 mg/l, Sigma)
vancomicina (V; 500 mg/l, NACALAI TESQUE, INC.)
metronidazol (M; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)
neomicina (N; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, Cell 118, 229 (23 de julio de 2004)
Fagarasan et al., Science 298, 1424 (15 de noviembre de 2002)

En la Fig. 9, cada círculo blanco representa la cantidad absoluta de las células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, cada barra horizontal representa el valor promedio de las cantidades absolutas, * indica que "P < 0,01" y "AVMN" representa los tipos de antibióticos administrados usando las primeras letras de los antibióticos.

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 6 a 9, las frecuencias y las cantidades absolutas de células Foxp3⁺ CD4⁺ en el intestino delgado y los ganglios linfáticos periféricos de los ratones GF fueron iguales a o mayores de las de los ratones SPF (remítase a las Fig. 6 a 8). Además, las cantidades de las células Treg en la lamina propia del intestino delgado, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de los ratones SPF a los que se habían administrado por vía oral los antibióticos durante ocho semanas eran iguales a o mayores de las de los ratones SPF (remítase a la Fig. 9). Por ahora, la cantidad de las células Foxp3⁺ CD4⁺ en la lamina propia del colon de los ratones GF estaba significativamente disminuida en comparación con la de los ratones SPF (remítase a las Fig. 6 y 7). Esta disminución se observó habitualmente entre ratones de diferentes fondos genéticos (Balb/c, IQI y C57BL/6), así como entre ratones criados en diferentes instalaciones animales (remítase a la Fig. 7 para los datos respecto a los diferentes fondos genéticos, los datos respecto a los ratones criados en las diferentes instalaciones animales no se muestran en los dibujos). Además, también se demostró que la cantidad de células Treg en la lamina propia del colon de los ratones SPF C57BL/6 a los que se administraron los antibióticos estaba significativamente disminuida (remítase a la Fig. 9).

Ejemplo 3

A continuación, se comprobó directamente si la disminución en la cantidad de las células Treg en la lamina propia del colon de los ratones GF mostrada en el Ejemplo 2 estaba atribuida o no a la ausencia de microbiota. Específicamente, se administró por vía oral una suspensión fecal de ratones B6 SPF adquiridos de The Jackson Laboratory a ratones GF-IQI (convencional). Tres semanas después de la administración, se aislaron linfocitos de la lamina propia del colon, y se analizó la expresión de Foxp3 en linfocitos CD4⁺. Las Fig. 10 y 11 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que cada círculo blanco en la Fig. 11 representa la cantidad absoluta de células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, las barras de error representan desviaciones típicas (SD), * indica que "P < 0,01" en ensayo t de Student, y ** indica que "P < 0,001". Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 10 y 11, la cantidad de células Treg en la lamina propia del intestino delgado no cambiaba. Sin embargo, la cantidad de las células Treg en la lamina propia del colon aumentaba significativamente. Por tanto, se demostró que la interacción microbiana con el hospedador desempeñaba un papel importante en la acumulación de células Treg Foxp3⁺ en la lamina propia del colon, mientras que la acumulación de las células Treg en la lamina propia del intestino delgado tenía un mecanismo diferente.

Ejemplo 4

A continuación, se investigó la relación entre los tejidos linfoides asociados al intestino de ratones y se investigó la cantidad de células Foxp3⁺ en la lamina propia del colon de los ratones de acuerdo con el método descrito en M. N. Kweon et al., J Immunol 174, 4365 (1 de abril de 2005). Específicamente, se inyectaron por vía intraperitoneal 100 µg de una proteína recombinante de dominio extracelular (una proteína de fusión (LTβR-Ig) entre un receptor de linfotóxina β (LTβR) y una región Fc de IgG1 humana, remítase a Honda et al., J Exp Med 193, 621 (5 de marzo de 2001)) en ratones C57BL/6 preñadas 14 días después de la concepción. Se inyectó de nuevo LTβR-Ig por vía intraperitoneal en los fetos obtenidos de dichos ratones, de modo que se produjeron ratones de los que se habían retirado completamente los folículos linfoides aislados (ILF), las placas de Peyer (PP) y las placas colónicas (CP). Después, se analizaron las relaciones de células Foxp3⁺ en células CD4⁺ en la lamina propia del colon de los ratones tratados con LTβR-Ig, y ratones tratados con IgG de rata (control) por FACS. La Fig. 12 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en Fig. 12 cada círculo blanco representa la relación de células Foxp3⁺ en un ratón individual, y las barras de error representan desviaciones típicas. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 12, se descubrió que la relación de las células Foxp3⁺ en la lamina propia del colon de los ratones deficientes en folículos linfoides aislados, placas de Peyer y placas colónicas (los ratones tratados con LTβR-Ig) aumentaba bastante. Por consiguiente, se sugirió que la disminución en la cantidad de las células Treg en la lamina propia del colon de los ratones GF y los ratones tratados con los antibióticos estaba causada porque no sucedía la transmisión de señales específicas que promueve la acumulación de células Treg en la lamina propia del colon y que está causada por los microbios intestinales, en lugar de simplemente a causa de un efecto secundario de tejidos linfoides desorganizados asociados al intestino.

Ejemplo 5

Para investigar si una intestinal flora específica inducía o no la acumulación de células Treg del colon, se administró vancomicina como antibiótico contra bacterias Gram-positivas o polimixina B como antibiótico contra bacterias Gram-negativas a ratones SPF (de 4 semanas de edad) durante cuatro semanas, y se analizaron para la relación de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺ ([%] Foxp3⁺ en CD4). La Fig. 30 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 30, "SPF" indicia el resultado de ratones SPF (control), "poli B" indica el resultado de los

ratones SPF a los que se administró polimixina B y "Vanco." Indica el resultado de los ratones SPF a los que se administró vancomicina. Por ahora, * indica que " $P < 0,01$ ".

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 30, la cantidad de células Treg en el colon de los ratones a los que se administró vancomicina estaba marcadamente disminuida en comparación con la del control. En contraste, no se observó influencia sobre la cantidad de células Treg de los ratones a los que se administró polimixina B. Esos hechos sugerían que las bacterias comensales Gram-positivas desempeñaban un papel principal en la acumulación de células Treg.

Ejemplo 6

Un informe reciente ha sugerido que las bacterias que forman esporas desempeñan un papel importante en la respuesta intestinal de células T (véase V. Gaboriau-Routhiau et al., *Immunity* 31, 677 (16 de octubre de 2009)). A este respecto, se administraron por vía oral microorganismos fecales (fracción que forma esporas) resistentes a cloroformo al 3% a ratones GF, que después se analizaron para la relación de células Foxp3^+ en el grupo de células CD4^+ ([%] Foxp3^+ en CD4). La Fig. 31 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 31, "GF" indica el resultado de ratones GF y "+cloro" indica el resultado de los ratones GF a los que se administraron las heces tratadas con cloroformo. Por ahora, ** indica que " $P < 0,001$ ".

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 31, tres semanas después de la administración de las heces tratadas con cloroformo, la cantidad de células Treg en los ratones a los que se administró estaba marcadamente aumentada hasta el mismo nivel que aquellos de los ratones SPF y los ratones GF a los que las heces no tratadas se habían administrado de manera forzada (véanse las Fig. 7 y 11).

Por consiguiente, considerando los resultados mostrados en el Ejemplo 5 en combinación, se reveló que los componentes específicos de la microbiota nativa muy probablemente pertenecían al grupo Gram-positivo, y que la fracción que forma esporas desempeñaba un papel importante en la inducción de células Treg.

Ejemplo 7

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

La Fig. 13 muestra diagramas de puntos FACS obtenidas cuando se estableció una sincronización sobre células CD4^+ de los ratones Balb/c. La Fig. 14 muestra la relación de células Foxp3^+ en células CD4^+ de cada ratón.

Obsérvese que las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican secuenciando el gen de ARNr 16S, del siguiente modo. Específicamente, los genes de ARNr 16S de las bacterias se amplificaron por PCR usando pares de cebadores específicos de gen de ARNr 16S: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 19) y 5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEQ ID NO: 20) (véase T. Aebischer et al., *Vaccination prevents Helicobacter pylori-induced alterations of the gastric flora in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 221-229(2006)). El producto de PCR de 1,5 kb después se introduce en el vector pCR-Blunt. Los insertos se secuenciaron y se alienaron usando el programa de software ClustalW. Las secuencias resultantes de los genes de ARNr 16S derivados de la cepa 1-41 de 46 cepas de *Clostridium* spp. Se muestran en las SEQ ID NO: 21-61. El árbol filogenético que se construyó por el método de unión de vecinos con las secuencias resultantes de las 41 cepas de *Clostridium* y aquellas de bacterias conocidas obtenidas de la base de datos Genbank usando el software Mega se muestra en la Fig. 49.

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 13 y 14, no se observó efecto sobre la cantidad de las células Treg en el colon en los ratones GF en que se colonizaron las bacterias filamentosas segmentadas (SFB) (remítase a la Fig. 14). Además, los ratones en que se colonizó el cóctel de tres cepas de *Lactobacillus* dieron resultados similares (remítase a la Fig. 14). Por otro lado, se demostró que la acumulación de células Foxp3^+ en la lamina propia del colon estaba fuertemente inducida en los ratones en que se colonizaron 46 cepas de *Clostridium* spp. De forma importante, dicha acumulación se promovía independientemente de los fondos genéticos de los ratones, y conducía al aumento en la cantidad similar a la de ratones SPF, aunque se colonizaba la intestinal microbiota de solamente un único género. También se demostró que la colonización de *Clostridium* no cambiaba la cantidad de células Treg en la lamina propia del intestino delgado (remítase a la Fig. 14). Obsérvese que, cuando se colonizaban las 16 cepas de *Bacteroides* spp., la cantidad de células Treg en el colon se aumentaba significativamente. Sin embargo, el grado del aumento variaba dependiendo del fondo genético de los ratones en

que se colonizaban las bacterias (remítase a las Fig. 13 y 14).

Ejemplo 8

- 5 A continuación, se analizaron la expresión de CD4, la expresión de Foxp3 y la expresión de Helios en linfocitos LP de los timos y los colonos de ratones SPF, ratones GF, ratones colonizados con *Lactobacillus* y ratones colonizados con *Clostridium* por citometría de flujo.

10 Las Fig. 32 y 33 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las Fig. 32 y 33, "GF" o "libre de gérmenes" indica los resultados de los ratones GF, "SPF" indica los resultados de los ratones SPF, "Lacto." Indica los resultados de los ratones colonizados con *Lactobacillus* y "Clost." Indica los resultados de los ratones colonizados con *Clostridium*. En la Fig. 32, el eje vertical representa la relación de células Helios⁺ en el grupo de células Foxp3⁺ ([%] Helios⁺ en Foxp3⁺), y ** indica que "P < 0,001".

15 Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 32 y 33, la mayoría de células Foxp3⁺ encontradas en los ratones SPF o los ratones colonizados con *Clostridium* no expresaban Helios. Obsérvese que Helios es un factor de transcripción que se sabe que se expresa en células Treg natural derivadas de timo (véase A. M. Thornton et al., J Immunol 184, 3433 (1 de abril de 2010)). Por consiguiente, se sugirió que la mayoría de las células Treg en los ratones SPF y los ratones colonizados con *Clostridium* eran células Treg inducidas en partes periféricas, es decir, las llamadas células Treg.

Ejemplo 9

25 A continuación, se investigó si la colonización de *Clostridium* o similares tenía o no influencia sobre otras células T. Específicamente, se colonizaron SFB, 16 cepas de *Bacteroides* spp. (Bactero.), 46 cepas de *Clostridium* spp. (Clost.), o microbiota recogida de ratones criados en un entorno convencional (SPF) en ratones GF IQI. Tres semanas después, se aislaron linfocitos de la lamina propia del colon de estos ratones y se estimularon con PMA (50 ng/ml) y ionomicina (1 µg/ml) durante cuatro horas en presencia de Golgistop (BD Bioscience). Después de darse la estimulación, se tiñeron las citoquinas intracelulares usando un anticuerpo anti-IL-17 PE (TC11-18H10) y un anticuerpo anti-IFN-γ FITC (BD Bioscience) de acuerdo con el manual of un Cytofix/Cytoperm Kit (BD Bioscience).

30 Después, se analizó la relación de células IFN-γ⁺ o células IL-17⁺ en leucocitos CD4⁺ por citometría de flujo. Las Fig. 15 y 16 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las Fig. 15 y 16, cada círculo blanco representa la cantidad absoluta de células CD4⁺ IFN-γ⁺ o la cantidad absoluta de células CD4⁺ IL-17⁺ en dicho ratón individual, y las barras de error representan las desviaciones típicas (SD). Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 15 y 16, la colonización de *Clostridium* no tuvo ninguna influencia sobre las células Th1 (células CD4⁺ IFN-γ⁺) en el colon, y causaba solamente un ligero aumento de las células Th17 (células CD4⁺ IL-17⁺). Por consiguiente, se sugirió que el género *Clostridium* era un género de bacterias que inducía específicamente las células Treg.

Ejemplo 10

40 Se ha informado de que 46 cepas de *Clostridium* spp. ejercen influencia sobre la acumulación de linfocitos CD8⁺ intraepiteliales del tracto intestinal (IEL) en el colon. Por consiguiente, es concebible que *Clostridium* regule el sistema inmunitario en diversos aspectos, y que *Clostridium* muestra una capacidad notable de inducir y mantener las células Treg especialmente en el colon, como se ha descrito anteriormente. Además, un tipo de citoquinas, el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), se sabe que desempeñan un papel importante en la regulación de la generación de células Treg.

50 A este respecto, se examinó si la colonización de *Clostridium* proporcionaba o no un entorno colónico rico en TGF-β. Específicamente, en primer lugar, se cultivaron los colonos completos de ratones GF, ratones colonizados con *Clostridium* y ratones colonizados con *Lactobacillus* durante 24 horas, y los sobrenadantes de cultivo de los mismos se midieron para la concentración de TGF-β activo (TGF-β1) por ELISA (la cantidad de ratones analizados fue cuatro por grupo). La Fig. 34 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 34, "GF" indica el resultado de los ratones GF, "Clost." indica el resultado de los ratones colonizados con *Clostridium* y "Lacto." indica el resultado de ratones colonizados con *Lactobacillus*. Por ahora, * indica que "P < 0,02" y ** indica que "P < 0,001".

60 Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 34, la cantidad de TGF-β producida en los colonos de los ratones colonizados con *Clostridium* era significativamente mayor que la de aquellos de los ratones GF y los ratones colonizados con *Lactobacillus*.

A continuación, se cultivaron células epiteliales intestinales (IEC) de ratones GF y ratones colonizados con *Clostridium* durante 24 horas, y los sobrenadantes de cultivo de las mismas se midieron para la concentración de TGF-β activo (TGF-β1) por ELISA (la cantidad de ratones analizados fue de cuatro por grupo). La Fig. 35 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 35, "GF" indica el resultado de los ratones GF, y "Clost." indica el resultado de los ratones colonizados con *Clostridium*. Por ahora, ** indica que "P < 0,001".

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 35, se detectó TGF- β en el sobrenadante de cultivo de las IEC aisladas de los ratones colonizados con *Clostridium*, mientras que no se detectó TGF- β en el sobrenadante de cultivo de las IEC aisladas de los ratones GF.

A continuación, como se ha descrito anteriormente, se cultivaron células T CD4⁺ esplénicas durante cinco días junto con un medio condicionado al 50% en que se cultivaron las IEC aisladas de los ratones GF o los ratones colonizados con *Clostridium*, y con el anticuerpo anti-CD3, en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TGF- β . Después, se recogieron las células T y se analizaron para la expresión de Foxp3 por RT-PCR a tiempo real. La Fig. 36 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la Fig. 36, "medio" indica el resultado de un medio en que no se cultivaron células, "GF" indica el resultado del medio condicionado en que se cultivaron las IEC de los ratones GF, "Clost." indica el resultado del medio condicionado en que se cultivaron las IEC de los ratones colonizados con *Clostridium* y "Clost. + α TGF β " indica el resultado del medio condicionado al que se añadió el anticuerpo anti-TGF- β y en que se cultivaron las IEC de los ratones colonizados con *Clostridium*. Por ahora, ** indica que "P < 0,001".

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 36, cuando el sobrenadante de cultivo de las IEC derivadas de los ratones colonizados con *Clostridium* se añadió a las células T CD4⁺ esplénicas, se aceleraba la diferenciación en las células que expresan Foxp3. Por ahora, la diferenciación en las células Treg se inhibía por el anticuerpo anti-TGF- β .

Además, se investigó la expresión de MMP2, MMP9 y MMP13, que se cree que contribuyen a la activación de TGF- β latente. También se investigó la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que se cree que está implicada en la inducción de células Treg. Específicamente, se administraron por vía oral 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.) a ratones C57BL/6 libres de gérmenes. Tres semanas después de la administración, se recogieron las IEC y se analizaron para los niveles relativos de expresión de ARNm de los genes de MMP2, MMP9, MMP13 e IDO por RT-PCR a tiempo real (la cantidad de ratones analizados fue de tres por grupo). Las Fig. 37 a 40 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las Fig. 37 a 40, "GF n.º 1 a 3" indica los resultados de ratones GF, "Clost. n.º 1 a 3" indica los resultados de los ratones colonizados con *Clostridium* y "Lacto. n.º 1 a 3" indica los resultados de los ratones colonizados con *Lactobacillus*.

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

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 37 a 39, en acuerdo con la producción de TGF- β descrita anteriormente, se expresaban productos de transcripción de los genes que codifican MMP2, MMP9 y MMP13 a niveles mayores en las IEC derivadas de los ratones colonizados con *Clostridium* que los de los ratones GF y los ratones colonizados con *Lactobacillus*.

Además, como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 40, IDO se expresaba solamente en los ratones colonizados con *Clostridium*.

Por consiguiente, se reveló que *Clostridium* activaba las IEC y conducía a la producción de TGF- β y otras moléculas inductoras de células Treg en el colon.

Ejemplo 11

A continuación, se investigó si la acumulación de células Treg inducida por la colonización de *Clostridium* era dependiente o no de la transmisión de señales por receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Específicamente, se examinaron las cantidades de células Treg en la lamina propia del colon de cada uno de los ratones SPF de Myd88^{-/-} (deficientes en Myd88 (adaptador de señalización para receptor tipo Toll)), Rip2^{-/-} (deficientes en Rip2 (adaptador de receptor NOD)) y Card9^{-/-} (deficientes en Card9 (factor de transmisión de señales esenciales para la transmisión de señales de Dectina-1)). Además, se causaba que *Clostridium* spp. colonizara en los ratones GF Myd88^{-/-} y se investigó el cambio en la cantidad de células Treg. Las Fig. 17 y 18 muestran los resultados obtenidos. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 17 y 18, la cantidad de células Treg de cada tipo de los ratones SPF deficientes en los factores asociados de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos no cambiaba respecto a la de ratones de tipo silvestre de la misma camada, que servían como control. Además, se descubrió que también cuando *Clostridium* spp. se colonizaba en ratones GF deficientes en Myd88, se inducía la acumulación de células Treg en la lamina propia del colon. Por consiguiente, se ha sugerido que el mecanismo de inducción de la acumulación de células Treg en la lamina propia del colon no depende de la activación de la ruta de reconocimiento para patrones moleculares asociados a patógenos principales que los causa la mayoría de bacterias, sino de especies bacterianas comensales específicas.

Ejemplo 12

Se sabe que las células Treg Foxp3⁺ del tracto intestinal ejercen algunas funciones inmunosupresoras a través de la producción de IL-10 (remítase al documento no de patente 9). Por ahora, se sabe que los animales que tienen células CD4⁺ Foxp3⁺ de las que se retira específicamente IL-10 desarrollan enfermedad inflamatoria del intestino (remítase al documento no de patente 18). A este respecto, en primer lugar, se examinó la expresión de IL-10 en linfocitos de diversos tejidos. Específicamente, se aislaron linfocitos de diversos tejidos de ratones SPF II10^{venus}, y se analizó la expresión de CD4 y la expresión de Venus por citometría de flujo. La Fig. 19 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que cada valor numérico en la Fig. 19 representa la relación de células dentro de la correspondiente región dividida en cuatro.

Además, se aislaron linfocitos de la lamina propia del colon de ratones II10^{venus}, y se detectó la expresión de la cadena β del receptor de células T (TCR β) sobre las superficies de las células por FACS. La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos (diagramas de puntos FACS obtenidos cuando se establecía una sincronización en células CD4⁺). Obsérvese que cada valor numérico en la Fig. 20 representa la relación de células dentro de la correspondiente región dividida en cuatro.

Además, se aislaron linfocitos de la lamina propia del colon de ratones II10^{venus}. Los linfocitos se estimularon con PMA (50 ng/ml) y ionomicina (1 μ g/ml) durante cuatro horas en presencia de Golgistop (BD Bioscience). Después, tras darse la estimulación, se tiñeron las citoquinas intracelulares usando un anticuerpo anti-IL-17 PE, un anticuerpo anti-IL-4 APC (11B11) y un anticuerpo anti-IFN- γ FITC (BD Bioscience) de acuerdo con el manual de un Cytotfix/Cytoperm kit (BD Bioscience). La Fig. 21 muestra los resultados obtenidos (diagramas de puntos FACS obtenidos cuando se establecía una sincronización en células CD4⁺).

Obsérvese que cada valor numérico en la Fig. 21 representa la relación de células dentro de la correspondiente región dividida en cuatro.

Además, se aislaron células Foxp3⁺ CD4⁺ y células Foxp3⁻ CD4⁺ del bazo (Spl) de ratones indicadores Foxp3^{eGFP}, y se aislaron células Venus⁺ de la lamina propia del colon y la lamina propia del intestino delgado (SI) de ratones II10^{venus}. Después, las células obtenidas se analizaron en términos de la expresión de genes predeterminados. Se analizó la expresión génica por RT-PCR a tiempo real usando una Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y un sistema de PCR a tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems). Aquí, el valor para cada célula se normalizó para la cantidad de GAPDH. La Fig. 22 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que en la Fig. 22 las barras de error representan desviaciones típicas.

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 19 a 22, casi no se detectaron células Venus⁺ (células productoras de IL-10) en los ganglios linfáticos cervicales (ganglios linfáticos periféricos), timo, sangre periférica, pulmón e hígado de ratones mantenidos en condiciones SPF. Por ahora, en el bazo, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de los mismos, se detectaron ligeramente células Venus⁺ (remítase a la Fig. 19). Por otro lado, se encontraron muchas células Venus⁺ en los linfocitos en la lamina propia del intestino delgado y la lamina propia del colon. Además, la mayoría de las células Venus⁺ en los intestinos eran positivas para CD4, y también positivas para la cadena β del receptor de células T (TCR β) (remítase a las Fig. 19 y 20). Además, se descubrió que las células T CD4⁺ Venus⁺ expresaban Foxp3 y otros factores asociados a células Treg tales como antígeno de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y una proteína asociada a TNFR inducida por glucocorticoides (GITR) aunque las células T CD4⁺ Venus⁺ no mostraban ninguno de los fenotipos de Th2 (productora de IL-4) y Th17 (productora de IL-17) (remítase a las Fig. 21 y 22). Además, se demostró que el nivel de expresión de CTLA-4 en las células Venus⁺ intestinal era mayor que el de células Treg GFP⁺ esplénicas aisladas de los ratones indicadores Foxp3^{eGFP} (remítase a la Fig. 22).

Ejemplo 13

Las células Venus⁺ pueden clasificarse en al menos dos subconjuntos, concretamente, células Treg Venus⁺ Foxp3⁺ doble positivas (DP) y células Treg Venus⁺ Foxp3⁻ sobre la base de la expresión intracelular de Foxp3. Las células del último conjunto corresponden a células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) (remítase a los documentos no de patente 8 y 9). A este respecto, se investigaron las células Venus⁺ (células productoras de IL-10) observadas en el Ejemplo 8 en términos de la expresión de Foxp3. Específicamente, se analizó la expresión de CD4, Foxp3 y Venus en la lamina propia del colon y la lamina propia del intestino delgado de ratones II10^{venus} mantenidos en condiciones GF o SPF por FACS, y se compararon las cantidades de células Venus⁺ en la lamina propia del tracto intestinal entre ratones II10^{venus} SPF y GF. La Fig. 23 muestra los resultados obtenidos (diagramas de puntos obtenidos cuando se establecía una sincronización en células CD4⁺).

Además, se analizó la expresión intracelular de Venus y Foxp3 en células CD4 en diversos tejidos de ratones SPF II10^{venus} por citometría de flujo. La Fig. 24 muestra los resultados obtenidos (diagramas de puntos obtenidos cuando se establecía una sincronización en células CD4⁺). Obsérvese que cada valor numérico en la Fig. 24 representa la relación de células dentro de la correspondiente región dividida en cuatro.

Además, para investigar si la presencia de bacterias comensales tenía o no alguna influencia sobre la expresión de IL-10 en células reguladoras en los tractos gastrointestinales, se prepararon ratones (GF) II10^{venus} libres de

gérmenes. Después, se causó que especies predeterminadas de bacterias colonizaran los ratones GF $\text{IL10}^{\text{venus}}$ obtenidos. Tres semanas después de colonizar las especies de bacterias, se analizó un grupo de células CD4^+ (células V^+F^- , $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^-$; células V^+F^+ , $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^+$; y células V^-F^+ , $\text{Venus}^- \text{Foxp3}^+$) en que se expresaban Foxp3 y/o Venus en el colon y el intestino delgado por citometría de flujo. La Fig. 25 muestra diagramas de puntos obtenidos cuando se establecía una sincronización en células CD4^+ colónicas, y las Fig. 26 y 27 muestran las relaciones en el grupo de células CD4^+ de cada ratón. Obsérvese que cada valor numérico en la Fig. 25 representa la relación de células dentro de la correspondiente región dividida en cuatro. Por ahora, las barras de error en las Fig. 26 y 27 representan desviaciones típicas, * indica que " $P < 0,02$ " y ** indica que " $P < 0,001$ ".

Además, para comprobar si la presencia de bacterias comensales tenía o no alguna influencia sobre la expresión de IL-10 en células reguladoras en los tractos gastrointestinal, se dieron por vía oral antibióticos con agua a cinco o seis ratones $\text{IL10}^{\text{venus}}$ por grupo durante 10 semanas. Se usaron los siguientes antibióticos en combinación.

ampicilina (A; 500 mg/l Sigma)
vancomicina (V; 500 mg/l NACALAI TESQUE, INC.)
metronidazol (M; 1 g/l NACALAI TESQUE, INC.)
neomicina (N; 1 g/l NACALAI TESQUE, INC.)

Después, se tiñeron CD4 y Foxp3 de los linfocitos de la lamina propia del colon, la lamina propia del intestino delgado (SI), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y placas de Peyer (PP) con anticuerpos, y se analizaron por FACS. Se obtuvieron los resultados de dos o más experimentos independientes que dieron resultados similares. La Fig. 28 muestra los resultados obtenidos (la relación de células Venus^+ en células CD4^+ en cada muestra). Obsérvese que cada círculo blanco en la Fig. 28 representa una muestra individual, cada barra horizontal representa un valor promedio, * indica que " $P < 0,02$ " y "AVMN" representa los tipos de antibióticos administrados usando las primeras letras de los antibióticos.

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 23 y 24, se demostró que la lamina propia del intestino delgado era rica en células $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^-$, concretamente, células tipo Tr1, y que las células Treg $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^+$ DP estaban presentes a una alta frecuencia en el colon de los ratones SPF (remítase a la Fig. 23 y 24). En contraste, aunque se observaron suficientes cantidades de células Foxp3^+ también en otros tejidos, no se observaba la expresión de Venus en casi ninguna de las células (remítase a la Fig. 24).

Además, como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 23 y 25 to 28, se demostró que todas las fracciones de células T reguladoras de $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^-$, $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^+$ y $\text{Venus}^- \text{Foxp3}^+$ en el colon disminuían significativamente en las condiciones GF (Fig. 23 y 26 a 27). Además, se observó una disminución similar en las células Venus^+ también en los ratones SPF $\text{IL10}^{\text{venus}}$ tratados con los antibióticos (remítase a la Fig. 28).

Además, como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 25 a 27, la colonización de *Clostridium* spp. inducía fuertemente todas las fracciones de células T reguladoras de $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^-$, $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^+$ y $\text{Venus}^- \text{Foxp3}^+$ en el colon, y los grados de la inducción de las mismas era iguales a los de ratones SPF (remítase a la Fig. 25 y 27). Además, se descubrió que la colonización de las tres cepas de *Lactobacillus* o la colonización de SFB tenía una influencia extremadamente pequeña sobre las cantidades de células Venus^+ y/o Foxp3^+ en el colon (remítase a las Fig. 25 y 27). Además, la colonización de 16 cepas de *Bacteroides* spp. también indujo células Venus^+ , pero la influencia de la colonización fue específica para células tipo Tr1 $\text{Venus}^+ \text{Foxp3}^-$ (remítase a la Fig. 25 y 27). Por otro lado, se descubrió que ninguna de las especies bacterianas ensayadas ejercía ninguna influencia significativa sobre la cantidad de células productoras de IL-10 en la lamina propia del intestino delgado (remítase a la Fig. 26).

Por tanto, se demostró que el género *Clostridium* colonizado en el colon o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias proporcionaba una señal para inducir la acumulación de células T reguladoras IL-10⁺ en la lamina propia del colon o la expresión de IL-10 en células T. Por ahora, se demostró que la cantidad de células Venus^+ en el intestino delgado no estaba influenciada significativamente por la situación donde no había bacterias comensales presentes o las bacterias comensales estaban disminuidas (remítase a la Fig. 23 y 26 a 28), y que las células reguladoras IL-10⁺ (células tipo Tr1) se acumulaban en la lamina propia del intestino delgado independientemente de las bacterias comensales.

Ejemplo 14

Se investigó si las células Venus^+ inducidas por el género *Clostridium* tenían o no una función inmunosupresora similar a la de células Venus^+ en el colon de ratones SPF. Específicamente, se sembraron células $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ (células T efectoras, células Teff) aisladas del bazo en una placa de 96 pocillos de fondo plano a 2×10^4 /pocillo, y se cultivaron durante tres días junto con 2×10^4 células CD11c^+ esplénicas (células presentadoras de antígeno) sometidas a tratamiento de irradiación con 30 Gy de radiación, 0,5 µg/ml de un anticuerpo anti-CD3, y un lote de células Treg. Además, durante las últimas seis horas, se cultivaron las células $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ con [³H]-timidina (1 µCi/pocillo) añadida a las mismas. Obsérvese que, las células Treg usadas en el Ejemplo 14 eran células T $\text{CD4}^+ \text{GFP}^+$ aisladas del bazo de ratones indicadores $\text{Foxp3}^{\text{eGFP}}$, o células T $\text{CD4}^+ \text{Venus}^+$ de la lamina propia del colon de ratones GF $\text{IL10}^{\text{venus}}$ en que se colonizó *Clostridium* spp. o ratones SPF $\text{IL10}^{\text{venus}}$. Después, se determinó la proliferación de las células basándose en la cantidad de captación de [³H]-timidina, y se representó por un valor de

recuento por minuto (cpm).

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 29, las células Venus⁺ CD4⁺ de los ratones en que se colonizó el género *Clostridium* suprimían *in vitro* la proliferación de células T activadas CD25⁺ CD4⁺. La actividad de supresión era ligeramente inferior a la de células GFP⁺ aisladas de los ratones indicadores Foxp3^{eGFP}, pero igual a la de células Venus⁺ aisladas de los ratones SPF IL10^{Venus}. Por consiguiente, se ha demostrado que el género *Clostridium* induce células T que expresan IL-10 que tienen suficientes actividades inmunosupresoras, y de ese modo desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en el colon.

Ejemplo 15

A continuación, se investigó la influencia sobre la respuesta inmunitaria local de la colonización de una gran cantidad de *Clostridium* y la proliferación resultante de células Treg.

Moldeo de colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS)

En primer lugar, se preparó el modelo de colitis inducida por DSS como se ha descrito anteriormente, y se investigó la influencia, sobre los ratones modelo, de la inoculación de *Clostridium* y la proliferación de células Treg. Específicamente, los ratones de control y los ratones inoculados con *Clostridium* se trataron con DSS al 2%, después se observaron y midieron durante seis días para la pérdida de peso corporal, la dureza de las deposiciones y hemorragias, y después se evaluaron numéricamente. Además, en el día 6, se recogieron los colonos, se diseccionaron y se analizaron histológicamente por tinción con HE. Las Fig. 41 a 43 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las Fig. 41 a 43, "SPF+Clost." o "SPF+Clost. n.º 1 a 3" indica los resultados de ratones C57BL/6 inoculados con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium*, y que han crecido en un entorno convencional durante seis semanas, y "SPF" o "SPF n.º 1 a 3" indica los resultados de ratones C57BL/6 (ratones de control) que han crecido en un entorno convencional durante seis semanas sin inocularse con la suspensión fecal. Además, en la Fig. 41, el eje vertical "valor de enfermedad" representa el índice de actividad de la enfermedad (DAI) descrito anteriormente, y el eje horizontal "post DSS al 2% (d)" representa los días que han pasado después de la administración inicial de DSS al 2% a los ratones. Además, en la Fig. 41, * indica que "P < 0,02" y ** indica que "P < 0,001". Por ahora, se sabe que las células Treg inducidas por células dendríticas reguladoras desempeñan un papel preventivo en un modelo de colitis inducida por DSS (véase S. Manicassamy et al., Science 329, 849 (13 de agosto de 2010)).

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 41 a 43, los síntomas de la colitis tales como pérdida de peso corporal y hemorragia rectal se suprimían significativamente en los ratones que tenían una cantidad mayor de *Clostridium* (a partir de ahora en este documento también mencionados como "ratones abundantes en *Clostridium*") en comparación con los ratones de control (véase la Fig. 41). Todas las características típicas para inflamación del colon, tales como acortamiento del colon, edema y hemorragia, se observaron de forma notable en los ratones de control en comparación con los ratones abundantes en *Clostridium* (véase la Fig. 42). Además, las características histológicas tales como erosión de la mucosa, edema, infiltración celular y pérdida de criptas eran menos graves en los ratones abundantes en *Clostridium* tratados con DSS que en los ratones de control (véase la Fig. 43).

Modelo de colitis inducida por oxazolona

A continuación, se preparó el modelo de colitis inducida por oxazolona como se ha descrito anteriormente, y se investigó la influencia, sobre los ratones modelo, de la inoculación de *Clostridium* y la proliferación de células Treg. Específicamente, ratones de control y ratones inoculados con *Clostridium* se sensibilizaron con oxazolona, y posteriormente el interior de los rectos de los mismos se trató con una solución de oxazolona al 1%/etanol al 50%. Después, se observó y midió la pérdida de peso corporal. Además, se diseccionaron los colonos, y se analizaron histológicamente por tinción con HE. Las Fig. 44 y 45 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las Fig. 44 y 45, "SPF+Clost." indica los resultados de ratones C57BL/6 (ratones abundantes en *Clostridium*) inoculados con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium*, y que han crecido en un entorno convencional durante seis semanas, y "SPF" indica los resultados de ratones C57BL/6 (ratones de control) que han crecido en un entorno convencional durante seis semanas sin inocularse con la suspensión fecal. Además, en la Fig. 44, el eje vertical "peso (% del inicial)" representa el peso corporal después de la administración de oxazolona al 1% donde el peso corporal antes de la administración se tomó como el 100%, y el eje horizontal "post oxazolona al 1% (d)" representa los días que han pasado después de la administración de oxazolona al 1% a los ratones. Por ahora, se sabe que las células T tipo Th2 están implicadas en la colitis inducida por oxazolona (véase M. Boirivant, I. J. Fuss, A. Chu, W. Strober, J Exp Med 188, 1929 (16 de noviembre de 1998)).

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 44 y 45, la colitis evolucionó junto con pérdida persistente de peso corporal en los ratones de control. Mientras tanto, la pérdida de peso corporal de los ratones abundantes en *Clostridium* se redujo (véase la Fig. 44). Además, también se reveló que partes que tenían enfermedades histológicas tales como erosión de la mucosa, edema, infiltración celular y hemorragia se redujeron en el colon de los ratones abundantes en *Clostridium* (véase la Fig. 45).

Ejemplo 16

A continuación, se investigó la influencia, sobre la respuesta inmunitaria sistémica (producción sistémica de IgE), de la colonización de una cantidad mayor de *Clostridium* y la proliferación resultante de células Treg. Específicamente, como se ha descrito anteriormente, se inmunizaron ratones de control y ratones inoculados con *Clostridium* administrando ovalbúmina (OVA) absorbida en alumbre dos veces a un intervalo de 2 semanas. Después, se recogieron los sueros de estos ratones, y se investigó el nivel de IgE específica de OVA de los mismos por ELISA. Además, se recogieron células esplénicas de los ratones en cada grupo, y se investigó la producción de IL-4 e IL-10 por reestimulación con OVA *in vitro*. Las Fig. 46 a 48 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las Fig. 46 a 48, "SPF+Clost." indica los resultados de ratones BALB/c SPF (ratones abundantes en *Clostridium*) inoculados con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium*, y que han crecido en un entorno convencional, "SPF" indica los resultados de ratones BALB/c SPF (ratones de control) que han crecido en un entorno convencional sin inocularse con la suspensión fecal y ** indica que "P < 0,001". Por ahora, en la Fig. 46, el eje vertical "IgE específica de OVA (ng/ml)" representa la concentración de IgE específica de OVA en los sueros. Además, en la Fig. 46, el eje horizontal representa los días que han pasado después de la administración inicial de la ovalbúmina absorbida en alumbre a los ratones abundantes en *Clostridium* o los ratones de control (4 semanas de edad), y "OVA+Alum" indica la cronología de la administración de la ovalbúmina absorbida en alumbre. Además, en las Fig. 47 y 48, "OVA" en el eje horizontal indica los resultados en el caso donde se realizó la reestimulación con OVA *in vitro*, y "-" indica los resultados en el caso donde no se realizó la reestimulación con OVA *in vitro*. Además, en las Fig. 47 y 48, el eje vertical "IL-4 (pg/ml)" e "IL-10 (pg/ml)" muestra la concentración de IL-4 y la concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas, respectivamente.

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 46 a 48, el nivel de IgE era significativamente inferior en los ratones abundantes en *Clostridium* que en los ratones de control (véase la Fig. 46). Además, la producción de IL-4 por la reestimulación con OVA estaba reducida (véase la Fig. 47) y la producción de IL-10 por lo tanto estaba aumentada (véase la Fig. 48) en las células esplénicas de los ratones abundantes en *Clostridium* sensibilizados con OVA y alumbre, en comparación con los ratones de control.

Por consiguiente, en consideración de los resultados mostrados en el Ejemplo 15 en combinación, se ha revelado que la inducción de células Treg por *Clostridium* en el colon desempeña un papel importante en las respuestas inmunitarias locales y sistémicas.

Ejemplo 17

A continuación, se colonizaron GF Balb/c con tres cepas de *Clostridium* pertenecientes al grupo IV (cepas 22, 23 y 32 enumeradas en la Fig. 49). Tres semanas después, se analizaron las células Treg Foxp3⁺ del colon por FACS. La Fig. 50 muestra los resultados obtenidos. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 50, los ratones gnotobióticos colonizados con tres cepas de *Clostridium* mostraron un patrón intermedio de inducción de Treg entre ratones GF y ratones inoculados con las 46 cepas.

Ejemplo 18

A continuación, se investigó si una fracción que forma esporas (por ejemplo, una resistente a cloroformo) de una muestra fecal obtenida de seres humanos tenía o no el efecto de inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras similar a la fracción que forma esporas de la muestra fecal obtenida de ratones.

Específicamente, se suspendió la deposición humana de un voluntario sano (japonés, hombre, de 29 años de edad) con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se mezcló con cloroformo (concentración final del 3%), y después se incubó en un baño de agua agitado durante 60 min. Después de la evaporación del cloroformo por burbujeo con gas N₂, las alícuotas que contenían la fracción resistente a cloroformo (por ejemplo, que forma esporas) de las bacterias intestinales humanas se inocularon por vía oral en ratones libres de gérmenes (GF) (IQI, de 8 semanas de edad). Los ratones tratados se mantuvieron en un aislante de vinilo durante 3 semanas. El colon se recogió y se abrió longitudinalmente, se lavó para retirar el contenido fecal, y se agitó en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía EDTA 5 mM durante 20 min a 37°C. Después de retirar las células epiteliales y el tejido graso, el colon se cortó en pequeños trozos y se incubó con RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 4%, 1 mg/ml de colagenasa D, 0,5 mg/ml de dispasa y 40 µg/ml de DNasa I (todo fabricado por Roche Diagnostics) durante 1 hora a 37°C en un baño de agua agitado. El tejido digerido se lavó con HBSS que contenía EDTA 5 mM, se resuspendió en 5 ml de Percoll al 40% (fabricado por GE Healthcare) y se sobrepuso sobre 2,5 ml de Percoll al 80% en un tubo Falcon de 15 ml. Se realizó separación en gradiente de Percoll por centrifugación a 780 g durante 20 min a 25°C. Las células de la superficie de contacto se recogieron y se suspendieron en tampón de tinción que contenía PBS, FBS al 2%, EDTA 2 mM y NaN₃ al 0,09% y se tñeron para CD4 superficial con Ab anti-CD4 marcado con ficoeritrina (RM4-5, fabricado por BD Biosciences). Se realizó tinción intracelular de Foxp3 usando el Ab anti-Foxp3 marcado con Alexa647 (FJK-16s, fabricado por eBioscience) y conjunto de tampón de tinción de Foxp3 (fabricado por eBioscience). Se analizó el porcentaje de células Foxp3 positivas dentro de la población de linfocitos CD4 positivos por citometría de flujo. Las Fig. 51 y 52 muestran los resultados obtenidos.

En las figuras, se muestran histogramas representativos (Fig. 51) y datos combinados (Fig. 52) para la expresión de Foxp3 por linfocitos CD4 positivos de ratones GF (GF) o ratones GF alimentados por sonda con deposición humana tratada con cloroformo (GF+Cloro.). Además, los números en la Fig. 51 indican los porcentajes de células en la sincronización. Cada círculo en la Fig. 52 representa un animal diferente, las barras de error indican las SD, y ** indica que "P < 0,001".

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en las Fig. 51 y 52, se descubrió que también cuando la fracción que forma esporas (por ejemplo, la resistente a cloroformo) de bacterias intestinal humanas se colonizaba en ratones GF, se inducía la acumulación de células reguladoras (Treg) Foxp3⁺ en la lamina propia del colon de los ratones.

A continuación, se investigó las especies de bacterias que crecían por alimentación por sonda con deposición humana tratada con cloroformo.

Específicamente, usando un mini kit QIAamp DNA Stool (fabricado por QIAGEN), se aisló el ADN genómico bacteriano de la deposición humana de un voluntario sano como se ha descrito anteriormente (deposición humana) o gránulos fecales de ratones GF alimentados por sonda con deposición humana tratada con cloroformo (GF+Cloro.). Se realizó el análisis de PCR cuantitativa usando un LightCycler 480 (fabricado por Roche). Se calculó la cantidad relativa por el método ΔC_t y se normalizó a la cantidad de bacterias totales, la dilución y el peso de la muestra. Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores:

bacterias totales

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

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

Clostridium grupo XIVa (subgrupo *Clostridium coccoides*)

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

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

Clostridium grupo IV (*Clostridium leptum*)

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

5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA-3' (SEQ ID NO: 24)

Bacteroides

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

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

La Fig. 53 muestra los resultados obtenidos.

Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Fig. 53, los ratones alimentados por sonda con deposición humana tratada con cloroformo mostraron altas cantidades de bacterias que forman esporas, tales como *Clostridium* de los grupos XIVa y IV, y una disminución importante de bacterias que no forman esporas, tales como *Bacteroides*, en comparación con la deposición humana antes del tratamiento con cloroformo.

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención hace posible proporcionar una excelente composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras (células Treg) utilizando bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias. Como la composición de la presente invención tiene efectos inmunosupresores, la composición puede usarse, por ejemplo, para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades alérgicas, así como para suprimir el rechazo inmunológico en el trasplante de órganos o similares. Además, los individuos sanos pueden ingerir fácil y rutinariamente la composición como un alimento o bebida, tal como un alimento saludable, para mejorar sus funciones inmunitarias.

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 a 20, 62 a 69

<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial

SEQ ID NO: 21 a 61

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de cada cepa de *Clostridium*

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> The University of Tokyo	
	<120> Composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras	
5	<130> 11B1040011	
	<150> JP2010/129134	
	<151> 04-06-2010	
	<150> PCT/JP2010/071746	
10	<151> 03-12-2010	
	<160> 69	
	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
20	<400> 1	
	ggcaatagtt ccttccaga gtt	23
	<210> 2	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 2	
30	gggtcgata ttgtgtact tg	22
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 3	
40	cctttgtag ccctgtcac tct	23
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 4	
	gggtcacctg tatggctta g	21
50	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 5	
	tcagtgaag atctgaagc a	21
	<210> 6	
60	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
65	<400> 6	
	acaccggaag ccaaacaca	19

	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 7	
	gattttaata agctccaaga ccaaggt	27
10	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 8	
	cttctatgca gttgatgaag atgtcaa	27
20	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 9	
	cctcgtcccg tagacaaaat g	21
30	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
35	<400> 10	
	tctccacttt gccactgcaa	20
40	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
45	<400> 11	
	ggacattgtc ttgatggca	20
50	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 12	
55	ctgtgcacgt ggtgtcactg	20
60	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 13	
	tctctggacg tcaaattgtg	20
65	<210> 14	
	<211> 19	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
5	<400> 14 gctgaacagc agagccttc	19
	<210> 15	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
15	<400> 15 aggtctggat cactccaagg	20
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
25	<400> 16 tcgcctggac cataaagaa	19
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 17 agaggatgcg tgactttgtg	20
35	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
	<400> 18 atacagcaga ccttctggca	20
45	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
50	<400> 19 agagttgat cmtggctcag	20
	<210> 20	
	<211> 16	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial	
60	<400> 20 attaccgchg ckgctg	16
	<210> 21	
	<211> 1460	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Clostridium leptum</i>	
	<220>	

ES 2 610 146 T3

<221> ARNr

<222> (1)..(1460)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 1

<400> 21

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
gagaaccatt ggatcgagga ttctgtccaag tgaagggtggg gaaagtggcg gacgggtgag      120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaaacagc cgctaatacc      180
gcatgataca gctgggaggc atctccctgg ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc      240
tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggccaccca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atatggggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaaag      420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctc agggacgaag caagtgcagg tacctgacac      480
ggctactacg gtcagcagcg cgtatacgta ggtgccagcg tatccggaat tacctgggtt      540
aaggcgtggt agccggactg cagtcagatg tgaatcacgg gctcaacttg tgctgcattg      600
gaactgtagt tctgagtact gagagcagac ggaattctag gtagcgggtga atgcgtagat      660
ataggaggac acagtgcgag gcgtctgctg acagcaactg acgctgaggc gggaagcgtg      720
ggggagccaa caggattaga tacctggtag ttcacgcctg gtaaaacgat ggatactagg      780
tgtgggggga ctgacccctc cgtggccgcc agttaacacc aataaagtat ccacactggg      840
agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg ccgcacaaag cgggtggagta      900
tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcaagaac cttaccaggg cttgacatcc cgaggaccgg      960
actagagata gtcttttctc ttccggagacc tcggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca     1020
gctcgtgtcg taagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta ttgttagttg     1080
ctacgcaaga gcaactctagc gagactgccg ttgacaaaac ggaggaaggt ggggacgacg     1140
tcaaatacatc atgcccctta tgtcctgggc cacacacgta ctacaatggt ggtcaacaga     1200
gggaagcaat accgcgaggt ggagcaaata cctaaaagcc atcccagttc ggatcgagcg     1260
ctgcaacccg cctgcgtgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg     1320
aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtcgg gaacaccgga     1380
agtccgtagc ctaaccgcaa gggggggcgc ggccgaaggt gggttcgata attgggggtga     1440
5 agtcgtaaca aggtagccgt                                     1460

```

<210> 22

<211> 1485

<212> ADN

10 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1485)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 2

15 <400> 22

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacccc tgaaggagtt ttccggacaac ggaagggact gcttagtggtg ggacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttggagtggt ggaataacag ctggaaacag ctgctaatac 180
cgcataatat atctggggccg catggctctg gatatcaaag atttatcgct ctgagatgga 240
ctcgcgtctg attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcgacga tcagtagccg 300
gactgagagg ttggccggcc acattgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggagggc 360
agcagtgggg aatattgggc aatgggcgca agcctgaccc agcaacgccg cgtgaaggaa 420
gaaggctttc gggttgtaaa cttcttttgt cagggacgaa gcaagtgcg gtacctgacg 480
aataagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggtg caagcgttat 540
ccggatttac tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggactgc aagtcagatg tgaaaaccac 600
gggctcaacc tgtgggcctg catttgaaac tgtagtctt gagtactgga gaggcagacg 660
gaattctagt tgtagcgtga aatgcgtaga tatagaagaa cacagttgcg gagccggtct 720
gcaactgacg ctgagcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc 780
acgctgtaaa cgatggatta ctaggtgtgg ggggactgac cccctccgtg ccgcagttaa 840
cacaataagt atcccacctg gggagtacga tcgcaagggt gaaactcaaa aggaattgac 900
ggggggccgc acaagcgggtg gagtatgtgg tttaaattcg aagcaacgcg aagaacctta 960
ccagggttg acatcccgtt gaccgtccta gagataggat ttcccttcg gggacactgg 1020
agacaggtgg tgcattggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcgccga 1080
acgagcgcaa cccttattgt tagttgtac gcaagagcac tctagcgaga ctgccgttga 1140
caaaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ctgggccaca 1200
cacgtactac aatggtggtc aacagaggga agcaaaagccg cgaggtggag caaatcccta 1260
aaagccatcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg gaatcgctag 1320
taatcgcgga tcagaatgcc gcggtgaata cgttccggg ccttgtagac accgcccgtc 1380
acaccatgag agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaagggg ggcgcggccc 1440
aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1485

```

<210> 23

<211> 1491

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 3

<400> 23

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacctt cgaaagagac ttccgtcaat ggaaaagaat gcttagtggt ggacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctttcagtgg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcataacgt acgggtatcg catggtatct gtaccaaaga ttatcgctg agagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtagggtaa cggcctacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgaaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggtgtgaaac ttcttttgac ggggaagagc agaagacggt acctgtcgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtaggtggca agcgttgc 540
ggatttactg ggtgtgaaag gcgtgtagcc gggctgacaa gtcagatgtg aaatccgggg 600
gctcaacccc cgaactgcat ttgaaactgt tggctctgag tatcggagag gcaggcggaa 660
ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttagggggaa caccagtggc gaagcggcct 720
gctggacgac aactgacggt gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
tggtagtcca cgctgtgaaac gatggatact aggtgtgcgg ggactgacct ctgcgtgccg 840
cagctaacgc aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga 900
attgacgggg gcccgacaaa gcggtggatt atgtggttta attcgatgca acgcgaagaa 960
ccttaccagg gcttgacatc ctactaacga agtagagata cattaggtac ccttcggggg 1020
aagtagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
cccgcaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatac tcatgccct tatgtcctgg 1200
gctacacacg taatacaatg gcggtcaaca gagggatgca aaaccgcgag gtggagcgaa 1260
cccctaaaag ccgtcccagt tcagatcgca gtctgcaacc cgactgcgtg aagtcggaat 1320
cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtcgta gcctaaccgc aaggaggggc 1440
cggccgaagg tgggttcgat aattgggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

```

<210> 24

<211> 1491

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 4

<400> 24

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttccggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120

```

ES 2 610 146 T3

```

taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtggtaca ggatggggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga 420
agtatttcgg tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaaa tgacggtacc tgactaagaa 480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggag cgtagacggc agcgcaagtc tgagtgaat cccatggctt 600
aaccatggaa ctgctttgga aactgtgcag ctggagtgca ggagagtaag cggaattcct 660
agtgtagcgt gaaatgcgta gattatagga ggaacaccag tggcgaaggc ggctaactga 720
actgtaactg acgttgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta 780
gtccacgccg taaacgatga ttactaggtg ttgggggacc aaggtcttcg gtgccggcgc 840
aaacgcatta agtaatccac ctggggagta cgttcgcaag aatgaaactc aaaggaattg 900
acgggggacc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt 960
acctgggtctt gacatcccgta tgacgagtga gcaaagtcac ttcccttcg gggcattgga 1020
gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa 1080
cgagcgcaac ccctatttcc agtagccagc aggtagagct gggcactctg gagagactgc 1140
ccgggataac cgggaggaag gcggggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgatcagg 1200
gctacacacg tgctacaatg gcgtaaacaa agggaagcga gacggtgacg ttgagcaaat 1260
cccaaaaata acgtcccagt tcggattgta gtctgcaact cgactacatg aagctggaat 1320
cgctagtaat cgcgaatcag aatgtcgcgg tgaatacggt cccgggtctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgggagtc ggaaatgccc gaagtcagtg acctaaccga aaggaaggag 1440
ctgccgaagg tggagccggt aactggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

```

<210> 25

<211> 1467

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1467)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 5

<400> 25

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagtgaaga tgctgcacg tgaacttagt ggcggacggg tgagttaaac gtgagcaacc 120
tgcctttcag agggggatta cgtttggaaa cgaacgctaa taccgcataa aatatcggag 180
tcgcatggca ctgatataa aggagcaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
cagttggcgg ggtatcggcc caccaaaccg acaatcggtg gccggactga gaggttgaac 300

```

ES 2 610 146 T3

```

ggccacattg ggactgagac gcggccccaga ctccctacggg aggcagcagt gggggatatt 360
gcacaatggg ggaaaccttg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc ctccgggttg 420
taaagtcttg tcgcagggga cgaatatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta 480
cgtgccagca gccgcggtta tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa 540
agggagcgta ggccgggagga taagttgaat gtgaaatcta tgggctcaac ccatagctgc 600
gttcaaaactg ttcttcttga gtgaagtaga ggcaggcgga attcctagtg tagcgggtgaa 660
atgcgtagat attaggagga caccagtggc gaaggcgggc tgctgggctt tactgacgct 720
gaggtctgaa agcgtgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgcggtaaac 780
gatgattact aggtgtgggt ggactgacct catccgtgcc ggagttaaca caataagtaa 840
tccacctggg gagtacggcc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggccccgaca 900
agcagtggag tatgtggttt aattcgacgc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat 960
cgagtgcagg acatagagat atgtctttcc ttcgggacac gaagacaggt ggtgcatggt 1020
tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttacc 1080
attagttgct acgcaagagc actctaattg gactgccgtt gacaaaacgg aggaaggtgg 1140
ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcca cacacgtact acaatggcgg 1200
tcaacagagg gaggcaaagc cgcgaggcag agcaaacccc taaaagccgt ctgagttcgg 1260
attgcaggct gcaactcgcc tgcatgaagt cggaattgct agtaatcgcg gatcagcatg 1320
ccgcgggtgaa tacgttcccc ggccttgtag acaccgcccg tcacaccatg agagccggta 1380
acaccggaag tcaatagtct aaccgcaagg aggacattgc cgaaggtggg attggtaatt 1440
ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgt 1467

```

<210> 26

<211> 1474

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1474)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 6

<400> 26

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggccgctgac ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg gaaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cggtggtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa ggcagcatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgcgt ggggtgaagaa 420

```


ES 2 610 146 T3

```

gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaat gacgggtacct gaagaagaag 480
ccccggctaa ctacgtgccca gcagccgcgg taatacgtag gggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggggg cgcagacggc gatgcaagcc aggagtgaag gcccggggcc 600
caacccccgg actgctcttg ggaactgcgt ggctggagtg cagagggcag cggaattcct 660
gggtgaaatgc gtagatatca gaagacacgg tgcgagggcg cctgctgact gcaactgacgt 720
tgagccgaag cgtgggggagc aaacaggatt agataccgtg gtagtcacgc cgtaaacgat 780
gattactagg tgcgggggag cagagactgc ccggtgccgc agccaacgca ttaagtaatc 840
cacctgggga gtacgttcgc aagaatgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga ccgcacaaag 900
cgggtggagca tgtggtttta ttcgaagcaa cgcgaagaac cttacctggt cttgacatcc 960
cgatgacgag tgagcaaagt cactttccct tcggggcatt ggagacaggt ggtgcatggt 1020
tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccctatt 1080
tccagtagcc agcaggtaga gctgggcact ctggagagac tgcccgggat aaccgggagg 1140
aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc cttatgatc agggctacac acgtgctaca 1200
atggcgtaaa caaagggaag cgagacggtg acgttaagca aatccccaaa ataacgtccc 1260
agttcggatt gtagtctgca actcgactac atgaagctgg aatcgctagt aatcggaat 1320
cagaatgtcg cgtggaatac gttcccggtt cttgtacaca ccgccgtca caccatggga 1380
gtcggaaatg cccgaagtca gtgacctaac cgaaaggaag gagctgccga aggtggagcc 1440
ggtaactggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgt 1474

```

<210> 27

<211> 1484

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1484)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium cepa 7*

<400> 27

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcgcgctgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttccggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgag tctgggaggc atctctcttg acgccaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgctgtctg ttagcttgtt ggcggggtaa agggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggaata cgtagggtggc aagcgttatc 540
cggatttatt ggggtgaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600

```

ES 2 610 146 T3

```

ggctcaaccc tgagcctgca ttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtgtg tagcgggtgaa atgcgtagat atacggagga caccagtggc gagcggattg 720
ctggacagta ctgacgctga agcgcgaaaag cgtgggagca aacagataga tacctggtag 780
tcacgcgtaa acgatggata ctaggtgtgg ggggactgac cccctccgtg ccgcagctaa 840
cgcaataagt atcccacctg gggagtagca tcgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg 900
ggggcccgca caagcgggtg agtatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960
agggcttgac atcctgctaa cgaaccagag atggattagg tgcccttcgg ggaaagcaga 1020
gacagggtgt gcatggttgt cgtcagctcg tgctgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa 1080
cgagcgcaac ccttattgtt agttgctacg caagagcact ctagcgagac tgccgttgac 1140
aaaacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcatcatgcc cttacgtcc tgggccacac 1200
acgtactaca atggcggcca acaaagagag gcaagaccgc gaggtggagc aaatctcaaa 1260
aagccgtccc agttcggatc gcaggctgca accgcctgc gtgaagttgg aatcgctagt 1320
aatcgcggat cagcatgccg cgggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgccgtca 1380
caccatgaga gtcgggaaca cccgaagtcc gtagcctaac cgcaaggggg gcgcggccga 1440
aggtgggttc gataattggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgt 1484

```

<210> 28

<211> 1483

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1483)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 8

<400> 28

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaa 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcgttgtcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcctttgag tgtcggagag gtaatcggga 660
ttccttgtgt agcgggtgaat gcgtagatat agagaccaca gtgccgacgc cgaatactga 720

```

ES 2 610 146 T3

cgatactgac ggtgagcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc 780
cacgctgtaa acgatcgata ctaggtgtgc ggggactgac ccctgctgc cggagttaac 840
acaataagta tcgcacctgg ggagtagcat cgcaagggtg aaactcaaag gaattgacgg 900
gggcccgcac aagcgggtga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca 960
gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg gaaagcagag 1020
acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac 1080
gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact gccgttgaca 1140
aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct gggctacaca 1200
cgtaatacaa tggcgggttaa caaagggtg caaagccgcg aggcagagcg aacccccaaa 1260
agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga atcgctagta 1320
atcgcggtac agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cggccgtcac 1380
accatgagag tcgggaacac ccgaagtcg tagcctaacc gcaaggaggg cgcggccgaa 1440
ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1483

<210> 29

<211> 1480

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1480)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 9

<400> 29

ggagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcgcgctgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
tagctgggtg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgac agtagccggc ctgagagggg 300
gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420
tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
actaagaagc cccgggctaa ctacgtgccg gcagccgcgg taatacgtag gggcaagcgt 540
tatccggatt tactgggtgt aaagggggcg cagacggcga tgcaagccag gagtgaagc 600
cggggcccaa ccccgggact gctcttgac tgcgtggctg gagtgcagag ggcagcgaat 660
tcctgtgtag cgtgaatgcg tagattcaga ggacacgtgc gagcgctgc tgactgcact 720
gacgtgagcc cgaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata cctggtagtc cacgccgtaa 780
acgatgatta ctaggtgtcg gggagcagag actgccgggt gccgcagcca acgcattaag 840
taatccacct ggggagtagc ttgcgaagaa tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc 900

ES 2 610 146 T3

acaagcgggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggccttga 960
catccccctg gatggcccgat aacgggggtca gccttttcggg gcaggggaga cagggtggtgc 1020
atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcgaacg agcgcaaccc 1080
ctgcccgcag tagccagcat tttagatggg gactctgcgg ggactgccgg ggacaacccg 1140
gaggaaggcg gggatgacgt caaatcatca tgcccccttat ggccctgggt acacacgtgc 1200
tacaatggcg ccgacagagg gaggcgaagc ggcgacgcgg agcgaacccc aaaaacggcg 1260
tcccagttcg gattgtagtc tgcaaccgca ctacatgaag ccggaatcgc tagtaatcgc 1320
ggatcagaat gccgcggtga atacgttccc ggggtcttga cacaccgccc gtcacaccat 1380
gggagccggg aatgcccgaa gtctgtgacc gaaccgtaa ggggaggggc agccgaaggc 1440
aggcccggtg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1480

<210> 30

<211> 1489

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1489)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 10

<400> 30

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcggtgc ttaacacatg caagtcgagc 60
gaagcacttt tttagaactc ttcggaggga agagaggggtg acttagcggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg ggcaacctgc cttacacagg gggataacaa ttagaaatga ttgctaatac 180
cgcataagac cacggtactg catggtacag tggtaaaaac tgagggtggtg taagatgggc 240
ccgcgtctga ttaggtagtt ggtggggtag aagcctacca agccgacgat cagtagccga 300
cctgagaggg cgaccggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggga 360
gcagtgggga atattgcaca atgggggaaa cctgatgca gcgacgccgc gtgagtgagg 420
aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc agggaagaaa atgacgggtac ctgactaaga 480
agccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggggcaa gcgttatccg 540
gatttactgg gtgtaaagg agcgtagacg gacttgcaag tctgatgtga aaatccgggg 600
cccaacccgg gactgcattg aaactgtatt ttttgagggg gtccgaggag gcaagtggaa 660
tcctgggtag cggtgaaatg gcgtagaatt cagggaggaa caccagtggc ggaaggcgaa 720
ttactggacg ataactgacg gtgaggcgcg aagcgtggga gcaaacaaga attagatacc 780
ctggtagtcg cgctgtaacg atcgatacta ggtgtgcggg gactgacccc tgcgtgccgg 840
agttaacaca ataagtatcg cactggggag tacgatcgca aggttgaaac tcaaaggaat 900
tgacgggggc ccgcacaagc ggtggattat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
ttaccagggc ttgacatcct gctaacgaag tagagataca ttaggtgcc cttcggggaaa 1020

ES 2 610 146 T3

gcagagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgctg tgagatgttg ggttaagtcc 1080
cgcaacgagc gcaacccta ttgttagttg ctacgcaaga gcaactctagc gagactgccg 1140
ttgacaaaac ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcatc atgccctta tgtcctgggc 1200
tacacacgta' atacaatggc ggttaacaaa gggatgcaaa gccgcgaggc agagcgaacc 1260
ccaaaaagcc gtcccagttc ggatcgacg ctgcaaccgc cctgcgtgaa gtcggaatcg 1320
ctagtaatcg cgatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc 1380
cgtcacacca tgagagtcgg gaacaccgca agtccgtagc ctaaccgcaa ggaggcgcg 1440
gccgaagggtg ggttcgataa ttgggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1489

<210> 31

<211> 1490

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1490)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 11

<400> 31

agagtttgat cctggctcag gatgaacgt ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttcggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagcttgtt ggcggggtaa agggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaa 420
aaggctttcg gttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgcgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggatttatt ggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca ttgaaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtgtt gtagcggtag aatgcgtaga ttataccgga ggaaccacca gtggcggaag 720
gcggattgct ggaacagtaa ctgacgctga ggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat 780
agataccctg gtagtcacag ccgtaaacga tggatactaa gtgtggggga ctgaccctt 840
cgtgcccagc taagcaataa gtttcccacc tggggagtac gatcgaggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccgcc caagcgggtg gagtaggggt taattggagc aacgggaaga 960
accttaccag ggcttgacat cctgtaacga accagaagag ggattaggtg ccttcgggga 1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt gggtaaagt 1080
ccgcaacgag cgcaaccctt attgttagtt gctacgcaag agcactctag cgagactgcc 1140
gttgacaaaa cggaggaagg tggggacgac gtcaaatcat catgcccctt acgtcctggg 1200

ES 2 610 146 T3

ccacacacgt actacaatgg cggccaacaa agagaggcaa gaccgcgagg tggagaaaat 1260
ctcaaaaagc cgteccagtt cggatcgcag gctgcaaccc gcctgctga agttggaatc 1320
gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc 1380
ccgtcacacc atgagagtcg ggaacacccg aagtccttag cctaaccgca aggggggagc 1440
ggccgaaggt gggttcgata attgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1490

<210> 32

<211> 1489

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1489)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 12

<400> 32

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gggctcatat tgaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgac agtagccggc ctgagagggt 300
gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgcg 420
tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcaagcgt 540
tatccggatt tactgggtgt aaaggagcgc tagacggcag cgcaagtctg aagtgaatc 600
ccatggctta accatggaac tgctttggaa actgtgcagc tggagtgcag gagaggtaag 660
cggaattcct agttagcgcg tgaatgcgta gatattagag gacaccagtg gcgatgcggc 720
ttactggact gtactgacgt tgagctcgaa agcgtgggga gcaccagaat tagaatactg 780
tagtcacgcc gtaaccgatg atactaggtg tgggggacca aggtctcgtg ccggcgccaa 840
acgcattaag taatccacct ggggagtacg ttgcgaagaa tgaaactcaa aggaattgac 900
ggggaccgcc acaagcgggt gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac 960
ctggtcttga catcccgatg acgagtgagc aaagtcactt tcccttcggg gcattggaga 1020
cagggtgtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 1080
agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag gtagagctgg gcactctgga gagactgccc 1140
gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgatcagggc 1200
tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgaga cggtgacgtt aagcaaatcc 1260
caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt ctgcaactcg actacatgaa gctggaatcg 1320
ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcgggt aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc 1380
cgtcacacca tgggagtcgg aaatgcccg aagtcagtgc ctaaccgaaa ggaaggagct 1440
gccgaaggtg gagccggtaa ctgggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1489

15

<210> 33

<211> 1456

<212> ADN
<213> *Clostridium coccooides*
<220>
<221> ARNr

5 <222> (1)..(1456)
<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 13

```
<400> 33
agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
gaagcacttg agaacgattc ttcggatgag gacttttgtg actgagtggc ggacgggtga      120
gtaacgcgtg ggtaacctgc cctatacagg gggataacag ttagaaatga ctgctaatac      180
cgcataagcg cactaaaacc gcatggttcg gtgtgaaaaa ctgaggtggt ataggatgga      240
cccgcgtctg attagcttgt tgggtgggta acggctcacc aaggcgacga tcagtagccg      300
gcctgagagg gcgaccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc      360
agcagtgggg gatattgcac aatgggggga accctgatgc agcgacgccg cgtgggtgaa      420
gaagcgccct gccgcgtaaa gccctgtcag cagggaagaa aatgacggta cctgaagaag      480
aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggggcaag cgttattccg      540
ggatttactg ggtgtaaagg gggcgacagc ggcgatgcaa gccaggagtg aagccccggg      600
cccaccggg actgctcttg gactgcgtgc tggagtgcag aaggggcagc gacctgtgt      660
accgtgaatt gcgtagatat cagagacacg ttgcgagcgc tgctgactgc actgacgtga      720
gcgaagctgg agcacagata gatactgtag tcagcgtaac gatgatacta gtgtcgggag      780
cagagactgc ccgttgccgc agcccaacgc attagtattc cacttgggga gtacgtttcg      840
cagaatgaac ttcaaggaaa tgacggggac ccgcacaagg cggtgagca tgtggtttaa      900
ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggc cttgacatcc cccctggatg gcccgtaacg      960
gggtcagcct ttcggggcag gggagacagg tgggtgcatg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt      1020
gagatgttgg gtaagtccc gcaacgagcg caaccctgc ccgcagtagc cagcatttta      1080
gatggggact ctgcggggac tgccggggac aaccggagg aaggcgggga tgacgtcaaa      1140
tcatcatgcc ccttatggcc tgggctacac acgtgctaca atggcgccga cagagggagg      1200
cgaagcggcg acgcggagcg aacccccaaa acggcgctcc agttcggatt gtagtctgca      1260
acccgactac atgaagccgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cggatgaatac      1320
gttcccggtt cttgtacaca ccgccgtca caccatggga gccgggaatg cccgaagtct      1380
gtgaccgaac ccgtaagggg aggggcagcc gaaggcaggc tcggtgactg gggatgaagtc      1440
gtaacaaggt agccgt                                     .....      1456
```

10 <210> 34
<211> 1475
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*
<220>

15 <221> ARNr
<222> (1)..(1475)
<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 14
<400> 34

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcgcgctgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagcacccc tgaaggagtt ttccgacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga      120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac      180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc      240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaaag      420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa      480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcgttgtec      540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg      600
gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgcggagag gtaatcgaa      660
tttcttggtg tagcgggtga tgcgtagata taaggaagga cacagtggcg agcggattac      720
tggacgatac tgacgtgagc gcgaaagcgt gggggagcaa cagaaattag atactgtagt      780
gcagctgtaa cgatcgatac tagttgcggg actgaccctt tgcgtgcgag ttacacaata      840
agtatcgcac ctgggagtag gatcgcaagg ttggaactca aaggaattga cggggcccg      900
acaagcgttg gattatgtgg tttaattcga agcaacgca agaaccctac cagggttgga      960
catcctgcta acgaagtaga gatacattag gtgcccttcg gggaaagtag agacaggtgg     1020
tgcagtgttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa     1080
cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga ctgccgttga caaaacggag     1140
gaaggcgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ctgggctaca cacgtaatac     1200
aatggcgggt aacaaaggga tgcaaagccg cgaggcagag cgaaccccaa aaagccgtcc     1260
cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga     1320
tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc acaccatgag     1380
agtcgggaac accgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag ggcgcgccg aaggtgggtt     1440
cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt                                     1475

```

<210> 35

<211> 1480

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1480)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 15

<400> 35

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg      120
agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc      180
acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtgggtat acgatggatc cgcgtctgat      240
tagctgggtg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgacg agtagccggc ctgagagggg      300
gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa      360
tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcgcgc tgagtgaaga agtatttcgg      420
tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg      480
actaagaagc cccgggtaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg ggcaagcgtt      540
atccggattt actgggtgta aaggagcgt agacggcagc gcaagtctga agtgaaatcc      600
catggcttaa cccatggaac tgctttggaa actgtgcagc tggagtgcag gagaggtaag      660
cggaattcct agtgtagcgt gaaatgcgta gattattagg aggacaacag tgcgagcgct      720
actgacgtga ggctcgaagc gtgggagcaa acaggattag atacctggta gtcacgcgta      780
aacgatgatt actaggggtg tgggggacca aggtcttcgg tgccggcgca aacgcattaa      840
gtaatccacc tggggagtac gttcgcaaga atgaaactca aaggaattga cggggaccgc      900
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta cctgggtcttg      960
acatcccgat gacgagttag caaagtcact ttcccttcgg ggcattggag acagggtggtg     1020
catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc     1080
cctatttcca gtagccagca ggtagagctg ggcactctgg agagactgcc cgggataacc     1140
gggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgatcaggg ctacacacgt     1200
gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgag acggtgacgt taagcaaata ccaaaaataa     1260
cgtcccagtt cggtattgtg tctgcaactc gactacatga agctggaata gctagtaata     1320
gcgaatcaga atgtgcgggt gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc     1380
atgggagtcg gaaatgcccg aagtcagtga cctaaccgaa aggaaggagc tgccgaagggt     1440
ggagccggta actgggggtg agtcgtaaca aggtagccgt                                1480

```

<210> 36

<211> 1486

5 <212> ADN

<213> *Clostridium papirosolvens*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1486)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 16

<400> 36

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gataaacgct ggcggcgcac ataagacatg caagtcgaac 60
ggacttaact cattctttta gattgagagc ggttagtggc ggactggtga gtaacacgta 120
agcaacctgc ctatcagagg ggaataacag tgagaaatca ttgctaatac cgcataatgct 180
cacagtatca catgatacag tgaggaaagg agcaatccgc tgatagatgg gcttgccgct 240
gattagttag ttggtggggg aacggcctac caagacgacg atcagtagcc ggactgagag 300
gttgaacggc cacattggga ctgagatacg gccagactc ctacgggagg cagcagtcgg 360
gaatattgcg caatggagga aactctgacg cagtgcgccc gcgtatagga agaaggtttt 420
cggattgtaa actattgtcg ttagggaaga taaaagactg tacctaagga ggaagccccg 480
gctaactatg tgccagcagc cgcggtaata catagggggc aagcgttatc cggaattatt 540
gggtgtaaag ggtgcgtaga cggaagaaca agttggttgt gaaatccctc ggctcaactg 600
aggaactgca accaaaacta ttctccttga gtgtcggaga ggaaagtgga attcctagtg 660
tagcgtgtaa atcgctagat attaggagga acaccagtgg cgaaggcgac tttctggacg 720
ataactgacg ttgaggcacg aaagtgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc 780
cacactgtaa acgatggata ctaggtgtag ggtgtattaa gcactctgtg ccgccgtaa 840
cgcatlaagt atcccacctg gggagtacga ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg 900
ggggcccgca caagcagtgg agtatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960
agggcttgac atataccgga atatactaga gatagtatag tccttcggga ctggtataca 1020
ggtggtgcat ggtgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag 1080
cgcaaccctt atcgttagtt gctagcaggt aatgctgaga actctagcga gactgccggt 1140
gataaatcgg aggaaggtgg ggtgacgtc aaatcatcat gccctttatg tcctgggcta 1200
cacacgtact acaatggccg taacagaggg aagcaatata gtgatatgga gcaaaaccct 1260
aaaagcggtc tcagttcgga ttgaaggctg aaattcgctt tcatgaagcc ggaattgcta 1320
gtaatggcag gtcagcatac tgccgtgaat acgttcccg gccttgta caaccgccgt 1380
cacaccatga gagttgaaa taccgaagc ctgtgagcta actgtaaaga ggcagcagtc 1440
gaaggtagag ccaatgattg ggtgaagtc gtaacaaggt agccgt 1486

```

<210> 37

<211> 1493

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 17

<400> 37

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaaccaac ggattgagga ttggtccaaa tgaagtggg gaaagtggc gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggg ttgaaacagc cgctaatacc 180

```

ES 2 610 146 T3

gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga tttagctagtt ggcggggcaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tgccgggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaa 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggacgaac aaatgacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttatcc 540
ggattttattg ggtgtaaagg gcgtgtaggc gggaaatgcaa gtcagatgtg aaaactatgg 600
gctcaaccca tagcctgcat ttgaaactgt atttcttgag tgctggagag gcaatcgaa 660
ttccgtgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tacggaggaa caccagtggc gaagcggatt 720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacaggg attagatacc 780
ctggtagtca cgcgtaaac gatggatact aggtgtgggg ggactgacct cctccgtgcc 840
gcagctaacg caataagtat ccacactggg gactacgac gcaagggttg aaactcaaag 900
gaattgacgg gggccgcac aagcgggtga gtatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca gggttgaca tcctgctaac gaaccagaga tggatcaggt gcccttcggg 1020
gaaagcagag acaggtgggt catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
gtcccgcaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact 1140
gccgttgaca aaacggagga aggtggggac gacgtcaaata catcatgccc ettacgtcct 1200
gggcccacaca cgtactacaa tggcggccaa caaagagagg caagaccgcg aggtggagca 1260
aatctcaaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa ccgcctgcg tgaagttgga 1320
atcgctagta atcgcgatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac 1380
cgcccgctac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctgacc gcaagggggg 1440
cgcgccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtagta acaaggtagc cgt 1493

<210> 38

<211> 1493

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 18

<400> 38

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtccaac 60
ggagcttata tttcagaagt ttctggatgg acgagagata agcttagtgg cggacgggtg 120
agtaacacgt gagcaacctg cctttcagag ggggataaca gttggaaacg actgctaata 180
ccgcataacg ctgcgatggg gcatcccgat gcagccaaag gagcaatccg ctgaaagatg 240
ggctcgcggc cgattagcta gttggtgggg caacggccca ccaaggcgac gatcggtagc 300

ES 2 610 146 T3

cggactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 360
gcagcagtg gggatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg 420
aagacggtct tcggattgta aacctctgtc tttggggaag aaaatgacgg tacccaaaga 480
ggaagctccg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtacggagc gagcgttgtc 540
cggaattact ggggtgtaaag ggagcgtacg cgggcgagaa agttgaatgt taaatctacc 600
ggcttaactg gtagctgctg tcaaaacttc ttgtcttgag tgaagtagag gcaggcggaa 660
ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata taggaggaca ccagtgggagc aagccgcctg 720
ctgggcttta actgacgctg aggctcgaaa gcgtggggag caaaccagga ttagataccc 780
tggtagtcaa cgctgtaaac gatgattact aggtgtgggg gggactgacc ccctccgtgc 840
cgcagttaac acaataagta tccacctggg gagtacggcc gcaaagtgtg aaaactcaaa 900
aggaatgacg ggggcccgcg caaagcagtg gagtatgtgg ttaatttcg aagcaacgcg 960
aagaacctta ccaggctctg acatcgtgcg catagcctag agataggtga agcccttcgg 1020
ggcgacacaga caggtggtgc atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcgaacg agcgcaaccc ttattattag ttgctacgca agagcactct aatgagactg 1140
ccgttgacaa aacggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg 1200
ggctacacac gtactacaat ggcactgaaa cagagggaag cgacatcgcg aggtgaagcg 1260
aatccccaaa aagtgtccca gttcggattg caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga 1320
attgctagta atcgcggtac agcatgccgc ggtgaatacg tccccgggcc ttgtacacac 1380
cgcccgctac accatgggag tcggtaacac ccgaagccag tagcctaacc gcaaggaggg 1440
cgctgtcgaa ggtgggattg atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

<210> 39

<211> 1483

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1483)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 19

<400> 39

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagtgaaga tgcttgcatc tgaacttagt ggcggcaggg tgagttaaac gtgagcaacc 120
tgcctttcag agggggataa cgtttgaaa cgaacgctaa taccgcataa aatatcgag 180
tcgcatggca ctgatatcaa aggagcaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
cagttggcgg ggtaacggcc caccaaaccg acaatcggtg gccggactga gaggttgaac 300
ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctccctacggg aggcagcagt gggggatatt 360
gcacaatggg ggaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc ctccgggttg 420
taaagttctg tcgcagggga cgaaaatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta 480

ES 2 610 146 T3

cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa 540
 agggagcgta gccgggagga taaagttgaa tgtgaaatct atgggctcaa cccatagctg 600
 cgttcaaaac tgttcttctt gagtgaagta gaggcaggcg gaattcctag tgtagcggtg 660
 aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt ggcgaaagcg gcctgctggg cttttactga 720
 cgctgaggct cgaaagcgtg ggtagcaaac agaattagat taccctgtta ttcacggcgg 780
 taaacgatga ttactagggt tgggttgacc tgaccccat tctgtccgga agtaacacca 840
 taaagtaatc cacctggggg agtacggcgg ccagggtgaa acttcaaaag gaattgacgg 900
 gggcccgcac aagcagtgga ggtatgtggt ttaatttcga cgaaacgcg aagaacctta 960
 ccagggtctt gacatcgagt gacggacata gagatatgtc ttccctttcg ggacacgaag 1020
 acagggtggt catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac 1080
 gagcgcaacc cttaccatta gttgctacgc aagagcactc tgatgggact gccgttgaca 1140
 aaacggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgcc cttatgacct gggcgacaca 1200
 cgtactacaa tggcgggtcaa cagagggagg caaagccgcg aggcagagca aaccctaaa 1260
 agccgtctca gtccgattg caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga attgctagta 1320
 atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1380
 accatgagag ccggtaacac ccgaagtcaa tagtctaacc gcaaggagga cattgccgaa 1440
 ggtgggattg gtaattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1483

<210> 40

<211> 1511

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1511)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 20

<400> 40

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
 agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
 acagcttcgc atgaaacagt gtgaaaaact ccggtgggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
 tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgatc agtagccggc ctgagaggggt 300
 gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
 tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420
 tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
 actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagcccggtt aatacgtagg ggcaagcgtt 540
 atccggattt actgggtgta aaggagcgt agacggcagc gcaagtcctga gtgaaatccc 600

ES 2 610 146 T3

atggcttaac catggaactg ctttggaac tgtgcagctg gagtgcagga gaggtaaagc 660
ggaattccta gtgtagcggg tgaaatgcgt agatatagga ggaacaacag tggcggaagg 720
cggctactgg gactgtaact gacgttgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780
ataccctggt agtcacgccg taaacgatga ttactagggtg ttgggggacc ataggctctc 840
ggtgccggcg caaacgcaat taagtaatcc acctggggga gtacgttcgc aagaatgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaaagc 960
aaacgcgaag aaaccttacc tggctctgac atcccgatga cgagtgcagca aagtcacttt 1020
cccttcgggg caattggaga caggtggtgc atgggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 1080
gttggtttaa gtcccgaac gagcgcaacc cctatttcca gtagccagca ggtagagctg 1140
ggcactctgg agagactgcc cgggataacc gggaggaagg cggggatgac gtcaaactat 1200
catgccccct atgatcaggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgag 1260
acggtgacgt taagcaaate ccaaaaataa cgtcccagtt cggattgtag tctgcaactc 1320
gattacatga agctggaatc gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc 1380
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtcg gaaatgcccg aagtcagtga 1440
cctaaccgaa aggaaggagc tgccgaaggt ggagccggtg actggggtga agtagataac 1500
aaggtagccg t 1511

<210> 41

<211> 1495

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1495)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 21

<400> 41

agagtttgat cctgcgctca ggacgaacgc tggcggcgcg cctaacacat gcaagtcgaa 60
cgggactatt ttgggagaag ttttcggatg gatctcggga tagtttagtg gcggacgggt 120
gagtaacgcg tgggcaacct gccttacaca gggggataac aattagaaat gattgctaata 180
accgcataag accacggtac tgcattggtac agtggttaaaa actgaggtgg tgtaagatgg 240
gcccgcgtct gattaggtag ttggtggggg agaagcctac caagccgacg atcagtagcc 300
gacctgagag ggcgacgggc cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc ctacgggagg 360
cagcagtggg gaattattgca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc gcgtgagtga 420
ggaagtattt cggtatgtaa agctctatca gcagggaaga aaatgacggt acctgactaa 480
gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac gtagggggca agcgttatcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggacttgcaa gtctgatgtg aaaatccggg 600
ggcccaaccc cggaactgca ttggaaactg tatatctaga gtgtcggaga ggcaagtgga 660
atttcctggt gtagcgggtg aatgcgtaga tatcagagga acaccagtgg cgaaggcgct 720

ES 2 610 146 T3

```

tgcctgacga tgactgacgt tgaagctcga aaagcgtggg tagcaaacag aattagatac 780
cctggtaagt caaccgggta aacgatgatt actaggtttt gggtggactg accccatccg 840
tgccggagta acaccaataa gttatccaac ctgggaagta cgcccgagcag gttgaaactc 900
aaaaggaaat gacggggggc cgcacaagca gttgaagtat gtgggttaat tcgacgcaaa 960
cgcaagaac cttaccaggt cttgacatcg agtgacggac atagagatat gtctttcctt 1020
cgggacacga agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
aagtcccgca acgagcgcaa cccttaccat tagttgctac gcaagagcac tctgatggga 1140
ctgccgttga caaacgggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac 1200
ctgggcgaca cacgtactac aatggcggtc aacagaggga ggcaaagccg cgaggcagag 1260
caaaccccta aaagccgtct cagttcggat tgcaggctgc aactcgctg catgaagtcg 1320
gaattgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac 1380
accgcccgtc acaccatgag agccggtaac acccggaagtc aatagtctaa ccgcaaggag 1440
gacattgccg aaggtgggat tggtaattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495

```

<210> 42

<211> 1491

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium cepa 22*

<400> 42

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggccggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttccggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgag tctgggagcg atctctctgg acgccaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagcttggt ggccggggtaa agggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttacc 540
cggatttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca tttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtgtg tagcggtgaa atgcgtagat atacggagga caccagtggc gaagcggatt 720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct 780
ggtagtccac gccgtaaagc atggatacta ggtgtggggg gactgacccc ctccgtgccg 840

```

ES 2 610 146 T3

```

cagctaacgc aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caagggtgaa actcaaagga 900
attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagt atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa 960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga accagagatg gattaggtgc ccttcgggga 1020
aagcagagac aggtgggtga tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
cccgcaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatac tcatgcccct tacgtcctgg 1200
gccacacacg tactacaatg gcggccaaca aagagaggca agaccgcgag gtggagcaaa 1260
tctcaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgaacc cgctgcgtg aagttggaat 1320
cgctagtaat cgcgatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
cccgctcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aagggggggc 1440
cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

```

<210> 43

<211> 1495

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1495)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 23

<400> 43

```

agagtttgat cctgtgcctc aggatgaacg ctggcggcgt gcttaacaca tgcaagtcca 60
acgagaacca acggattgag gattcgtcca aatgaagttg gggaaagtgg cggacgggtg 120
agtaacgcgt gagcaatctg ccttgagatg gggaataacg gttggaaaca gccgctaata 180
ccgcatgatg cgtctgggag gcattctctt ggacgcaaaa gatttatcgc tctgagatga 240
gctcgcgtct gattagctag ttggcggggc aacggcccac caaggcgacg atcagtagcc 300
ggactgagag gttggccggc cacattggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg 360
cagcagtggg gaatattggg caatgggcgc aagcctgacc cagcaacgcc gcgtgaagga 420
agaaggtctt cgggttgtaa acttctttta agggggacga acaaatacgc gtaccctctg 480
aataagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggttg caagcgttat 540
ccggatttat tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggaatgc aagtcagatg tgaaaactat 600
gggctcaacc catagcctgc atttgaaact gtatttcttg agtgctggag aggcaatcgg 660
aattccgtgt gtagcggtag aatgcgtaga tatacggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
attgctggac agtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatggat actaagtgtg gggggactga cccctccgt 840
gccgcagcta acgcaataag tatccacact ggggagtacg atcgcaaggt tgaaactcaa 900
aggaattgac gggggccgcg acaagcggtg gagtatgttg ttaattcga agcaacgcga 960
agaaccttac cagggcttga catcctgcta acgaaccaga gatggatcag gtgcccttcg 1020

```


ES 2 610 146 T3

gggaaagcag agacaggtgg tgcattggtg tgcagcgtc gtgtcgtgag atgttggtgt 1080
aagtcgccga acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttacgtc 1200
ctgggccaca cacgtactac aatggcggcc aacaaagaga ggcaagaccg cgaggtggag 1260
caaattctcaa aaagccgtcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg 1320
gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcgtggaata cgttcccggt cttgtacac 1380
accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac accgaagtc cgtagcctga ccgcaagggg 1440
ggcgcggccg aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495

<210> 44

<211> 1440

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1440)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 24

<400> 44

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtccaac 60
ggagtgaaga tgctcgcatc tgaacttagt ggcggaacgg tgagttaaac gtgagcaacc 120
tgcctttcag agggggataa cgtttggaaa cgaacgctaa taccgcataa aatattcgag 180
tcgcattggca ctgatataca aggagtaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
cagttggcgg ggtaacggcc caccaaaccg acaatcggtg gccggactga gaggttgaac 300
ggccacattg ggaactgagac acggcceaga ctctacggg aggcagcagt ggggatatt 360
gcacaatggg ggaaccctg atgcagcgtg gccgcgtgaa tgaagacggc cttcggttg 420
taaagttctg tcgcagggga cgaataatgac ggtaccctgc aagaagctc cggctaacta 480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa 540
agggagcgta ggcgggagga taagttgaat gtgaaatcta tgggctcaac ccatagttgc 600
gttcaaaact gttcttcttg agtgaagtag aggcaggcgg aattcctagt gtagcgtga 660
aatgcgtaga tattagagga acaccagtgg cgaagcggcc tgctgggctt ttactgacgc 720
tgagctcgaa agcgtgggta gcaacaggat tagataccct gtagtccac gcggtaaacg 780
atgattacta gtgtgggttg actgacccat ccatgccgga gtaacacaa tagtaatcca 840
cctggggagt acgcgcagtg aactcaaagg attgacgggg ccgcacaaag cagtgaatat 900
gtggtttatt cgacgcacgc gagactacag tcttgacatc gatgacggac tagagatatg 960
tctttctcgg acacgaagac aggtggtgca tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020
tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct taccattagt tgttacgcaa gagcactcta 1080
atgggactgc cgttgacaaa acggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccct 1140
tatgacctgg gcgacacacg tactacaatg gcggtcaaca gagggaggca aagccgcgag 1200
gcagagcaaaa cccctaaaag ccgtctcagt tcggattgca ggctgcaact cgcctgcatg 1260
aagtcggaat tgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1320
gtacacaccc cccgtcacac catgagagcc ggtaacaccc gaagtcaata gtctaaccgc 1380
aaggaggaca ttgccgaagg tgggatggta attgggtgta agtagtaaca aggtagccgt 1440

<210> 45
 <211> 1495
 <212> ADN
 <213> *Clostridium leptum*
 5 <220>
 <221> ARNr
 <222> (1)..(1495)
 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 25
 <400> 45
 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gagaaccatt ggatcgagga ttctccaag tgaaggtggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaacagc cgctaatacc 180
 gcatgataca gctgggaggc atctccctgg ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaa 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttgc agggacgaag caagtgcgag tacctgacga 480
 ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtagtggca agcgttatcc 540
 ggatttattg ggggtgaaag ggcgtgtagg cgggaatgca agtcagatgt gaaaactatg 600
 gggctcaacc catagcctgc atttgaaact gtatttcttg agtgctggag aggcaatcga 660
 attccgtgtg tagcgggtga aatgcgtaga tatacggagg aacaccagtg gcgaagcgga 720
 ttgctggaca agtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
 ccctggtagt ccacgcgcta aacgatggat actaggtgtg gggggactga cccctccgt 840
 gccgcagcta acgcaataag tatccacct ggggagtagc atcgcaaggt tgaaactcaa 900
 aggaattgac gggggccgc acaagcgtg gagtatgtg ttaattcga cgcaacgcga 960
 agaaccttac cagggcttga catcctacta acgaaccaga gatggattag gtgcccttcg 1020
 gggaaagtag agacaggtg tgcatggttgc tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttggtt 1080
 aagtcgccga acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
 ctgccgttga caaacggag gaaggtggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttacgtc 1200
 ctgggccaca cacgtactac aatggcggcc aacaaagaga ggcaaagccg cgaggtggag 1260
 caaatctcaa aaagccgtcc cagttcgat cgcaggtgc aaccgcctg cgtgaagttg 1320
 10 gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggt ccttgtacac 1380
 accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac acccgaaagtc cgtagcctaa ccgcaagggg 1440
 ggcgcggccg aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495
 15 <210> 46
 <211> 1495
 <212> ADN
 <213> *Clostridium leptum*
 <220>
 <221> ARNr
 20 <222> (1)..(1495)
 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 26
 <400> 46

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac    60
ggagcacccc tgaaggagtt ttccggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga    120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac    180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc    240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggccaccca aggcgacgat cagtagccgg    300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca    360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaaag    420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa    480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggaatac gtaggtggca agcgttgctc    540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg    600
gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgcggagag ggtaatcgga    660
attcctttgt gtagcgggtg aatgcgtaga tataagaaga acaccagtgg cgaaggcgga    720
ttactggacg ataactgacg gtgaggcgcg aaagcgtggg ggagcaacag attaaatacc    780
ctggtagtcc acgctgttaa cgatcgatac taggtgtgcc gggactgacc ccctgcgtgc    840
ccggagttaa ccacaataag tatcgacact ggggagtagc atcgcaaggt gaacttcaaa    900
ggaattgacg ggggcccggc ccaagccgtg gattatgtgg ttaattcgaa gcaacgcgaa    960
gaacctaccc agggcttgac atcctgctaa cgaagtagag atacattagg tgccctttcg   1020
gggaaagcag agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atggtggggt   1080
aagtcccgca acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga   1140
ctgccgttga caaaacggag gaaggcgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc   1200
ctgggttaca cacgtaatac aatggcggtt aacaaaggga tgcaaagccg cgaggcagag   1260
cgaaccccaa aaagccgtcc cagttcggtt cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagtcg   1320
gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggt ccttgtagac   1380
accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag   1440
ggcgcggccg aaggtggggt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt      1495

```

<210> 47

<211> 1509

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1509)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 27

<400> 47

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac    60
ggagtagcccc tgaaggaggtt ttccggacaac tgatgggact acttagtggc ggacgggtga    120
gtaacgcgtg agtaacctgc cttggagtg ggaataacag ctggaaacag ctgctaatac    180
cgcataatat gtctgtgtcg catggcactg gacatcaaag atttatcgct ctgagatgga    240
ctcgctctg attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcgacga tcagtagccg    300
gactgagagg ttggccggcc acattgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc    360
agcagtgggg aatattgggc aatgggcga agcctgaccc agcaacgccg cgtgaaggaa    420
gaaggctttc gggttgtaaa cttcttttaa gggggaagag cagaagacgg tacccttga    480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttgc    540
cggatttact ggtgtgaaag ggcgtgcagc cggagagaca agtcagatgt gaaatccacg    600
ggctcaaccc gtgaactgca ttgaaactg tttcctggag ttcggagggt atggaattct    660
tgttagcggg gaaatgctgt agatatggga gaaccaccag tgcgaggggg cttccgggac    720
tgtacttgac ttagaggtc tcaaagctgg gggagcaccg aggaatgaga taccgtgata    780
gtcccacgcg gtaacggatg attactaggt gttgggggga cccaggctct ttcggtgccg    840
ggcgcaaacc ctttaggaat tccacctggg gaattacgtt tggcaagaaa ggaacttcaa    900
agaaattgaa cgggggaccc cccaaccgg tggaggcatg gtgttttatt tcggaggaa    960
gggaagaacc ttaccttgt tctgacctc cggatgacga agtgagcaaa gtcaacttcc    1020
cttcggggcc atggaggaca ggtggtggca tggttggtcg tcagctcgtg tcgtgagatg    1080
ttgggttaag tcccgaacg agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag gtagagctgg    1140
gcactctgga gagactgccc gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatac    1200
atgcccctta tgatcagggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag ggaagcgaga    1260
cgggtgacgtt aagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt ctgcaactcg    1320
actacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgcgcgggtg aatacgttcc    1380
cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcgg aaatgcccg agtcagtga    1440
ctaaccgaaa ggaaggagct gccgaagggt gagccggtaa ctggggtgaa gtcgtaacaa    1500
ggtagccgt                                     1509

```

<210> 48

<211> 1583

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1583)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 28

<400> 48

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtcgaac    60
ggagcttata tttcagaagt tttcggatgg acgagagata agcttagtg cgacgggtg    120
agtaacacgt gagcaacctg cctttcagag ggggataaca gttggaaacg actgctaata    180
ccgcataacg ctgcgatggg gcatcccgat gcagccaaag gagcaatccg ctgaaagatg    240
ggctcgcggc cgattagcta gttggtgggg caacggccca ccaaggcgac gatcggtagc    300
cggactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag    360
gcagcagtgg gggatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg    420
aagacggtct tcggattgta aacctctgtc tttggggaag aaaatgacgg tacccaaaga    480
ggaagctccg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggggag cgagcgttgt    540
ccggaattac tgggtgtaaa gggagcgtag cgggcgagaa agttgaatgt taaatctacc    600
ggcttaactg gtagctgcgt ccaaaacttc ttggtcttga gtgaaagtaa gaggccaggg    660
cggaaattct tagtgtaagc gggtgaaaat gcgttagata ttagggagga accaccagg    720
gggcgaaggg cgccttgctg ggctttaact ggacggctgg aggcttgga aaggcgtggg    780
gagagcaaac acagggaatt aagtataccc tggatatatg cacacgcttg taaagagtat    840
gattaactta gggtggtggg gggaacttga cctttcgtg tgcgcgcagg ttaacacaca    900
tttagagtat atccaacttg gggagagtac ggccggcaaa gtttgaaact tcaaaagga    960
aattgagacc ggggggccc gccaccaagc acagtggaga gtatggtggg ttaatttcg    1020
agaagcaacc ggcggaagag aaactttacc agtccttgac atcgggtggc gcataagccc    1080
tagagattag gtgaagccct tcggggggcc caccagacag gtggtgcatg gttgtcgtca    1140
gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc ccgcaaacga gcgcaaccct tattattagt    1200
ttgtacgca agagcactct aatgagactg ccgttgacaa aacggaggaa ggtggggatg    1260
acgtcaaate atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtactacaat ggactgaaa    1320
cagagggaag cgacatcgcg aggtgaagcg aatccccaaa aagtgtcca gttcggattg    1380
caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga attgctagta atcgcggatc agcatgccgc    1440
ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tcggtaacac    1500
ccgaagccag tagcctaacc gcaaggaggg cgctgtcgaa ggtgggattg atgactgggg    1560
tgaagtcgta acaaggtagc cgt    1583

```

<210> 49

<211> 1519

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1519)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 29

<400> 49

ES 2 610 146 T3

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac      60
gggtgtacgg gaaggaaggc ttgggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag      120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc      180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cggtggtaca ggatgggccc      240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc      300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc      360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgcgt ggggtgaagaa      420
gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaaa tgacgggtacc tgaagaagaa      480
gccccgggct aactacgtgc cagcagccgg cggttaattac gtaggggggc aggcgttacc      540
cggatttact ggggtggtaaa ggggggcgca aacggcgatg gcaggccagg aatggaaagc      600
ccggggggccc aaccccgga cttgctcttg ggaaactggc ttggctggga gtggcaggag      660
gggcaggcgg aaattcctgg tggtagcggg ggaatatggc taaaaatcaa gaagaaaaac      720
cgggtgggaa aggcggcctg gtgggactgc gaactgacgt tgaaggcccg aaagcgtggg      780
gaacaaacag gatagattcc ctggtagtcc cagccgtaa acgatgatta ctagggtgctg      840
gggagcagag actgcccggt gccgcagcca acgcattaag taatccacct ggggagtacg      900
ttcgcaagaa tgaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcgggt gagcatgtgg      960
tttaattcga agcaacgcga agaaccttac ctggtcttga catcccgatg acgagtgagc     1020
aaagtcactt tcccttcggg gcattggaga caggtgggtg atggttgctg tcagctcgtg     1080
tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ctatttcag tagccagcag     1140
gtagagctgg gactctgga gagactgccc gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg     1200
tcaaatacat atgcccctta tgatcagggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag     1260
ggaagcgaga cggtgacgtt aagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt     1320
ctgcaactcg actacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg     1380
aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcgg aaatgcccga     1440
agtcagtgac ctaaccgaaa ggaaggagct gccgaaggtg gagccggtaa ctggggtgaa     1500
gtcgtaacaa ggtagccgt                                     1519

```

<210> 50

<211> 1497

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1497)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 30

<400> 50

ES 2 610 146 T3

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggggtatata agcggaaagt tacggatgga aggttatata cttagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtgg gcaacctgcc ccgtgccggg ggataaccgc tggaaacagg cgctaatacc 180
 gcataagcgc atacagccgc atgggtgtat gcggaagct ccggcggcac gggatgggcc 240
 cgcgcccgat tagccagttg gcggggtaac ggcccaccaa agcgacgac ggtagccggc 300
 ctgagagggc ggacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag 360
 cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag caacgccgcg tgggtgaagg 420
 agcgtttcgg cgcgtaaagc cctgtcagcg gggaagaaga aagacggtag ccgaccaaga 480
 agccccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggggcgag cgttatccgg 540
 aattactggg tgtaaaggga gcgtagacgg cgaggttaagc ctgaagtggg agcccgccgc 600
 ccaaccgcgg aactgctttg ggaactgttt tgctggagta tgggaggggt aagcggaatt 660
 cctggtgtag cgttgaaatg cgtagatata aggaggaaca ccggtggcga aggcggctta 720
 ctggaccata actgacgttg aggtcgaata gcgtggggag cgaacaggat tagataccct 780
 ggtagtccac gcgtaaacga tgattaccag gtgtcgggtg tcgaaggacg gcccggtgcc 840
 gcagcgaacg cagtaagtaa tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga aactcaaagg 900
 aattgacggg gacccgcaca agcgggtggg catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga 960
 accttaccgc gccttgacat cccctggaca gcatatgtaa tgtatgtttc cttcgggacc 1020
 agggagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggtcaagtcc 1080
 cgcaacgagc gcaaccctg ccccagtag ccagcattta agatgggcac tctgggggga 1140
 ctgccgggga taaccgggag gaaggcgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatggc 1200
 cggggctaca cacgtgtac aatggcgtaa acagagggag gcgagacagc gatgttaagc 1260
 gaaccccaaa aataacgtcc cagttcggat tgcagcctgc aactcggctg catgaagctg 1320
 gaatcgctag taatcgcgga tcagaatgcc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtagac 1380
 accgcccgtc acaccatggg agtcgggaac gcccgaaagg ggtgaccgaa cccgaaaggg 1440
 gaggagccgt cgaaggcggg cctggtgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgt 1497

<210> 51

<211> 1475

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1475)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 31

<400> 51

gagtttgatc ctggctcagg ataaacgctg gcggcgacac taagacatgc aagtcgaacg 60
 aacttaatac cttgcttgca aggttaagcgg ttagtgccgg actggtgagt aacacgtaag 120

ES 2 610 146 T3

```

aaatctgcct atcagagggg aataacagtg agaaatcact gctaataccg catatgccat 180
agttatcgca tgataatagt gggaaagaag caattcgctg atagatgagc ttgcggctga 240
ttagctagtt ggtggggtaa cggcctacca aggcgacgat cagtagccgg cctgagaggg 300
tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggga gcagtgggga 360
atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgacgccgc gtgagtgaag aagtatttcg 420
gtatgtaaag ctctatcagc agggaaagaaa atgacgggtac ctgactaaga aagccccggc 480
taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggggcaa gcgttatccg gatttactgg 540
tgtaaaggga gcgtagacgg cagcgcaagt ctgagtgaag tcccatggct taccatgaa 600
actgctttgg aaactgtgca gctggagtgc aggagaggta agcgggaatcc tagtgtagcg 660
gttgaatatgc gtagattatc agaaggaaca ccggtggccg aggcggcctg ctgggctttt 720
actgacgctg aggcctcgaag cgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 780
cggtaaacga tgattactag gtgtgggtgg actgacccca tccgtgccgg agttaacaca 840
ataagtaatc cacctgggga gtacggccgc aaggttgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 900
ccgcacaaag cagtggagta tgtggtttaa ttcgacgcaa cgcgaagaac cttaccaggt 960
cttgacatcg agtgacggac atagagatat gtctttcctt cgggacacga agacaggtgg 1020
tgcattggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa 1080
cccttaccat tagttgctac gcaagagcac tctaattggga ctgccgttga caaacggag 1140
gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggcgaca cacgtactac 1200
aatggcggtc aacagaggga ggcaaagccg cgaggcagag caaacccta aaagccgtct 1260
cagttcggat tgcaggctgc aactcgctcg catgaagtcg gaattgctag taatcgcgga 1320
tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acaccatgag 1380
agccggtaac acccgaagtc aatagtctaa ccgcaaggag gacattgccg aaggtgggat 1440
tggtaatggg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1475

```

<210> 52

<211> 1491

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 32

<400> 52

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatcagt ggattgagga ttcgtccaaa tgaaactgag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgataca gttgggaggc atctctctga ctgtcaaaga ttatcgctc tgagatgagc 240

```


ES 2 610 146 T3

```

tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cgccccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaa 420
aaggctttcg ggtgtaaac ttcttttctg ggggacgaac aaatgacggt accccaggaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac gtaggtggca agcgttatcc 540
ggatttattg ggtgtaaagg gcgtgtaggc gggaatgcaa gtcagatgtg aaaactatgg 600
gctcaaccca tagcctgcat ttgaaactgt atttcttgag tgctggagag gcaatcggaa 660
ttccgtgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tacggaggaa caccagtggc gaagcggatt 720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
tggtagtcca cgccgtaacg atggatacta gtgtgggggg actgaccccc tccgtgccgc 840
agctaacgca ataagtatcc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga 900
attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagt atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa 960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga accagagatg gattaggtgc ccttcgggga 1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgccctt tacgtcctgg 1200
gccacacacg tactacaatg gcggttaaca aagagaggca agaccgcgag gtggagcaaa 1260
tctcaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc cgctgcgtg aagttggaat 1320
cgctagtaat cgcgatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtcgta gcctaaccgc aagggggggcg 1440
cgccgaagg tgggttcgat aattgggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

```

<210> 53

<211> 1495

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1495)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 33

<400> 53

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttccggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaacct tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtggtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctacccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc_ gacgccgcgt ggggtgaagaa 420

```

ES 2 610 146 T3

gagcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaat gacgggtacct gaagaagaag 480
 ccccggttaa ctacgtgccg gcagccggcg taatacgtag ggggcaagcg ttatccggat 540
 ttactgggtg taaagggggc gcagacggcg atgcaagcca ggagtgaag cccggggccc 600
 aaccccgga ctgctcttgg aactgcgtgg ctggagtgcg ggaggggag gcggaattcc 660
 tgggtgtagc gtgaaatgcg tagatatcag aggaacaccg gtggcgaaag cggcctgctg 720
 gactgcaact gacgttgagg cccgaaagcg gtgggagcaa acaggattag ataccctggt 780
 agtccacgcc gtaaagcatg attactaggt gtcggggagc agagactgcc cggtgccgca 840
 gcccaacgca ttaagtatcc acctggggag tacgttcgca agaataaaac tcaaaggaaat 900
 tgacggggag ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
 ttaccaggcc ttgacatccc cctggatggc ccgtaacggg gccagccctt tttgggcagg 1020
 ggagacaggt ggtgcatggt tgcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg 1080
 caacgagcgc aacccctgcc cgcagtagcc agcatcttag atggggactc tgcggggact 1140
 gccggggaca acccgaggga aggcggggat gacgtcaaata catcatgccc cttatggcct 1200
 gggctacaca cgtgctacaa tggcgccgac agaggggagga gaagcggcga cgcggagcga 1260
 acccaaaaaa cggcgtccca gttcggattg tagtctgcaa cccgactaca tgaagccgga 1320
 atcgctagta atcgcgatc agaataccgc ggtgaatacg ttcccggtc ttgtacacac 1380
 cggccgtcac accatgggag ccgggaatgc ccgaagtctg tgaccgaacc cgtaagggga 1440
 ggggcagccg aaggcaggcc cggtgactgg ggtgaagtgc taacaaggta gccgt 1495

<210> 54

<211> 1493

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 34

<400> 54

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagaccccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtgtc ggactggtga 120
 gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
 cgcattgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
 tcgcgtctga tttgttagtt ggtgaggtaa cggccaccca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttgtcc 540

- - -

ES 2 610 146 T3

```

ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag gtaatcggaa 660
ttccttggtg agcggtgaaa tgcgtagata taaggaagaa caccagtggc gaaggcggat 720
tactggacga taactgacgg tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
ctggtagttcc acgctgtaaa cgatcgatac taggtgtgcg gggactgacc cctgctgtgc 840
cggagttaac acaataagta tcgcacctgg ggagtagcat cgcaagggtg aaactcaaag 900
gaattgacgg gggcccgac aagcgggtga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca gggcttgaca tctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg 1020
gaaagcagag acaggtgggt catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
gtcccgaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact 1140
gccgttgaca aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgcc cttatgtcct 1200
gggctacaca cgtaatacaa tggcgggtta caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg 1260
aaccceaaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga 1320
atcgctahta atcgcggtac agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac 1380
cgcccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtcg tagcctaacc gcaaggaggg 1440
cgcgccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

```

<210> 55

<211> 1498

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1498)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 35

<400> 55

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacag aagggaagat tacggtcgga aggtctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cggtggtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt attttttttg tcagggtaac ggcctaccaa agcgacgac agtagccggc 300
ctgagagggc ggacggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag 360
cagtggggga tattgcacaa tggggggaac cctgatgcag cgacgccgcg tgggtgaaga 420
agcgctcgg cgcgtaaagc cctgtcagca gggaagaaaa tgacgggtacc tgaagaagaa 480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta aggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggggg cgcagacggc gatgcaagcc aggagtgaag gcccggggcc 600
caaccccggg actgctcttg ggaactgcgg tggctggagt gcaggagggg caggccggaa 660
ttcctggtgt agcggtgaaa tgcgtagata tcaggaggaa caccgggtggc gaaggcggcc 720

```

tgctggactg caactgacgt tgaggcccgga aagcgtgggg agcaaacagg attagataacc 780
ctggttagtca cgccgtaaac gatgattact aggtgtcggg gagcagagac tgcccgggtgc 840
cgcagccaac gcattaagta atccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg aaactcaaag 900
gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca ggccttgaca tccccctgga tggcccgtaa cggggtcagc ctttcggggc 1020
aggggagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc 1080
cgcgaacgag cgcaaccctt gccgcagta gccagcattt tagatgggga ctctgcgggg 1140
actgccgggg acaaccggga ggaaggcggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatgg 1200
cctgggctac acacgtgcta caatggcgcc gacagaggga ggcgaagcgg cgacgcggag 1260
cgaaccccaa aaacggcgtc ccagttcgga ttgtagtctg caaccgcact acatgaagcc 1320
ggaatcgcta gtaatcgcg atcagaatgc cgcggtgaat acgttcccgg gtcttgtaca 1380
caccgcccg caccatcg ggcggggaa tgcccgaagt ctgtgaccga acccgtaagg 1440
ggaggggcag ccgaaggcag gcccggtgac tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgt 1498

<210> 56

<211> 1491

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 36

<400> 56

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcaagc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcgccta tgaaggagat ttcggtcaac ggaataggct gcttagtggc tgacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctttcagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcataacac ataggtgtcg catggcattt atgtcaaaga tttatcgctg aaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggctacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tagccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag aggggaagagc agaagacggt acctcttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac gtagtggcaa gcgttgctcg 540
gatttactgg gtgtaaaggg cgtgtagccg ggctgacagt cagatgtgaa attccggggc 600
tcaaccccg accctgcattt gaaactgttg gtcttgagta tcggagaggc aggcggaatt 660
cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt aggaggaaca ccagtggcga aggcggcctg 720
ctggacgaca actgacgggtg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct 780
ggtagtccac gctgtaaagc atggatacta ggtgtgcggg gactgacccc ctgcgtgccg 840

ES 2 610 146 T3

cagttaacac aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caagggtgaa actcaaagga 900
 attgacgggg gcccgacaaa gcggtggatt atgtggttta attcgatgca acgcgaagaa 960
 ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga ggtagagata cgtcagggtgc ccttcgggga 1020
 aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
 cccgcaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
 cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgcccct tatgtcctgg 1200
 gctacacacg taatacaatg gcggtaaaca gagggatgca atactgcgaa gtggagcgaa 1260
 cccctaaaag ccgtcccagt tcagattgca gtctgcaact cgactgcatg aagtcggaat 1320
 cgctagtaat cgcggatcag catgccggcg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
 cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtcgta gcctaaccgc aaggaggggc 1440
 cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

<210> 57

<211> 1493

5 <212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium cepa 37*

<400> 57

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggccgctgac ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggggtgtacgg ggaggaaggc ttccggccga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
 gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
 gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa ggcagcatca gtagccggcc 300
 tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
 agtgggggat attgcacaat ggggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga 420
 agtatttcgg tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaaa tgacggtacc tgactaagaa 480
 gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg gggggcaagc gttatccgga 540
 ttactgggt gtaaggggag cgtagacggc agcgcaagtc tgaagtgaag tccatggct 600
 taaccatgga actgctttgg aaactgtgca gctggagtgc aggagaggta agcggaattc 660
 ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa ggcggttac 720
 tggactgtac tgacgttgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg 780
 tagtccacgc cgtaaagcat gattactagg tgttggggga ccaaggctct cgggtgccggc 840
 gcaaacgcac taagtaatcc acctggggag tacgttcgca agaataaaac tcaaaggaat 900
 tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
 ttacctggtc ttgacatccc gatgacgagt gagcaaaagtc actttccctt cggggcattg 1020

ES 2 610 146 T3

gagacagggtg gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc 1080
aacgagcgca acccctatct ccagtagcca gcaggtagag ctgggcactc tggagagact 1140
gcccgggata accgggagga aggcggggat gacgtcaa atcatgccc cttatgatca 1200
gggttacaca cgtgctacaa tggcgtaa acgaggaagc gagacgggtga cgttgagcaa 1260
atcccaaaaa taacgtccca gttcggattg tagtctgcaa ctgcactaca tgaagctgga 1320
atcgctagta atcgcgaaatc agaattgtgc ggtgaatacgt tccccgggtc ttgtacacac 1380
cgcccgctac accatgggag tcggaaatgc ccgaagtcag tgacctaac gaaaggaagg 1440
agctgccgaa ggtggagccg gtaactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

<210> 58

<211> 1493

5 <212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

10 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 38

<400> 58

aaagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga ttatcgctg gaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccc gtgaaggaa 420
aaggctttcg ggttgtaa ac tcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagtggaac gcgttgctcc 540
gatttactgg gtgtaaaggc cgtgcagccg gagagacaag tcagatgtga aatccacggg 600
ctcaaccctg gaactgcatt tgaaactggt tcccttgagt gtcggagagg taatcggaat 660
tccttggtga gcggtgaaat gcgtagatat aaggaagaac accagtggcg aaggcggatt 720
actggacgat aaactgacgg tgagggcgca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
ctggtagtcc acgctgtaaa cgatcgatac taggtgtgcg gggactgacc ccctgcgtgc 840
cggagttaac acaataagta tcgcacctgg ggagtagcat cgcaagggtt aaactcaaag 900
gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg 1020
gaaagtagag acaggtgggt catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
gtcccgcaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact 1140

ES 2 610 146 T3

gccgttgaca aaacggagga aggcggggac gacgtcaa at catcatgccc cttatgtcct 1200
 gggctacaca cgtaatacaa tggcgggttaa caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg 1260
 aacccccaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga 1320
 atcgctagta atcgcgatc agcatgccgc ggtgaatacg tccccgggcc ttgtacacac 1380
 cccccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtcg tagcctaacc gcaaggaggg 1440
 cgcggccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

<210> 59

<211> 1511

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1511)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium cepa* 39

<400> 59

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagcacccc tgaaggagtt ttccgacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
 gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
 cgcgatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaa 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac gtaggtggca agcgttgtcc 540
 ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
 gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgcggagag gtaatcggaa 660
 ttcccttgtgt agcggtgaaa tgcgtagata taaggaagac accagtggcg aagcggatta 720
 ctggacgata actgacgggt aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataacctg 780
 ggtagtcaac gctgtaaacg atcgatacta ggtggtgcgg gggacttgac ccctgcccgt 840
 tgccggagtt aacaccaata aagtattcgg caccctgggg agtacgatcg caaaggttga 900
 aaactcaaaa gaaatggacg gggggccccc ccccaagcgg gtgggattat gttggtttat 960
 ttcgaaagca acgcgaagaa ccctaacagg gcttgacatc ctgctaacga agtagagata 1020
 cattaggtgc ccttcgggga aagtagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt 1080
 cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgctacgcaa 1140
 gagcactcta gcgagactgc cgttgacaaa acggaggaag gcggggacga cgtcaaatca 1200
 tcatgcccct tatgtccttg gctacacacg taatacaatg gcggttaaca aagggatgca 1260
 aagccgcgag gcagagcgaa ccccaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc 1320

ES 2 610 146 T3

cgctgctg aagtcggaat cgctagtaat cgcggtatcag catgccgcgg tgaatacgtt 1380
cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtcgcta 1440
gcctaaccgc aaggaggggc cgccgaagg tgggttcgat aattgggggtg aagtcgtaac 1500
aaggtagccg t 1511

<210> 60
<211> 1499
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*
<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1499)

<223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 40

<400> 60

agagtttgat cctggctcag gataaacgct ggcggtatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagcgcctt ggaaggagac ttcggtcaac ggaagaggag gcttagtggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctcagagagg gggataacac accgaaaggt gtgctaatac 180
cgcataacat atgagagggg catcccttcc atatcaaaga tttattgctt tgagatggcc 240
tcgctgcca ttagctagtt ggtgaggtaa cggccaccca aggcgacgat tggtagccgg 300
actgagaggt tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgcaca atggggggaa ccctgatgca gcaatgccgc gtgaaggatg 420
aaggttttcg gattgtaaac ttcttttgta cgggacgaag aaagtgcagg taccgtaaga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggatttact ggggtgaaag ggcgagtagg cgggattgca agtcagatgt gaaaactatg 600
ggctcaaccg atagagtgc tttgaaactg cagttcttga gtgatggaga ggcaggcgga 660
attcccggtg tagcgggtga atgcgtagat atcgggaggg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
cctgctggac attaaactgac gctgatgcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt cacgctgtaa acgatgatta ctaggtgtgg ggggtactga ccccttccc 840
gtgccggagt taacacaata agtaatccac ctggggagta cgccgcgaag gttgaaactc 900
aaaggaattg acggggggccc gcacaagcag tggagtatgt ggttttaatt cgaagcaacg 960
cgaagaacct taccagggct tgacatgggg atgaccgctt tagagataga gctttctctt 1020
cggagacatc ccacacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgctgtg agatgttggg 1080
ttaagtcacc caacgagcgc aacccttatt gttagttgct acgcaagagc actctagcga 1140
gactgccgtt gacaaaacgg aggaagggtg ggacgacgtc aaatcatcat gccctttatg 1200
tcctgggcta cacacgtact acaatggcgg acatacagag ggaagcaaga cagcgtatgt 1260
gagcaaatcc ctaaaagccg tctcagttca gattgcaggc tgcaaccgc ctgcatgaag 1320
tcggaattgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta 1380
cacaccgccc gtcacacat gagagtcgga aacaccgaa gcctgtagcc caaccgcaag 1440
gggggcgcag tcgaagggtg gtctgataat tggggtgaag tcgtaacaaa ggtagccgt 1499

<210> 61
<211> 1512
<212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1512)

5 <223> Secuencia génica codificante de ARNr 16S de *Clostridium* cepa 41

<400> 61

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagatatca ttttcgaagc gattagttta ctaagagcgg agatgttgct atcttagtgg      120
cggacgggtg agtaacgcgt gggtaacctg ccttgccactg ggggataaca cttagaaata      180
ggtgctaata ccgcataaca gtaggagacg catgtctttt acttgaaaac tccggtggtg      240
taagatggac ccgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa cgcccacca aggcaacgat      300
cagtagccgg cctgagaggg tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct      360
acgggaggca gcagtgggga atattggaca atggggggaa ccctgatcca gcgacgccgc      420
gtgagtgaag aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc agggaagaaa gaaatgacgg      480
tacctgacta agaagccccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtataa cgtagggggc      540
aagcgttata cggatttact ggggtgtaaag ggagcgtaga cgcgcatgca agtctgaagt      600
gaaaggcggg ggcccaaccc ccggactgct ttggaactg tatggctgga gtgcaggaga      660
ggtaagtgga attcctagtg tagcgggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg      720
cgaaagcggc ttactggact gtaactgacg ttgaggctcg aaagcgtggg gagcaaacaa      780
gattagatac ctggtagtca cgccgtaaac gatgatcacc ggtttcgggtg gggttatggac      840
ccatcggttg cgcagcaaac gcagtagtga tccacctggg gagtaacgtt cgcaagaatg      900
aaacttcaaa ggaatgacg ggggacccgg cacaagcggg ggaggcatgt gtttaattcg      960
aagcaacgcg aagaacctta cccaagtctt gacatcccgt gacgagtgag taacgtcact     1020
ttcccttcgg ggcagcggag acagggtggt catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat     1080
gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cctatcctta gtagccagcg agttaggctc     1140
ggcactctag ggagactgcc ggggacaacc cggaggaagg tggggatgac gtcaaactcat     1200
catgcccctt atgatttggt ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgag     1260
cctgtgaagg taagcgaatc ccagaaataa cgtctcagtt cggattgtag tctgcaactc     1320
gactacatga agctggaatc gctagtaatc gcggatcaga atgccgcggg gaatacgttc     1380
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtcg gaaatgcccg aagtctgtga     1440
cccaacctga gaaggaggga gcagccgaag gcaggtcgga tgactggggg gaagtcgtaa     1500
caaggtagcc gt                                     - - - - -     1512

```

<210> 62

10 <211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial

15 <400> 62

ggtgaatacg ttccgg

17

<210> 63

20 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

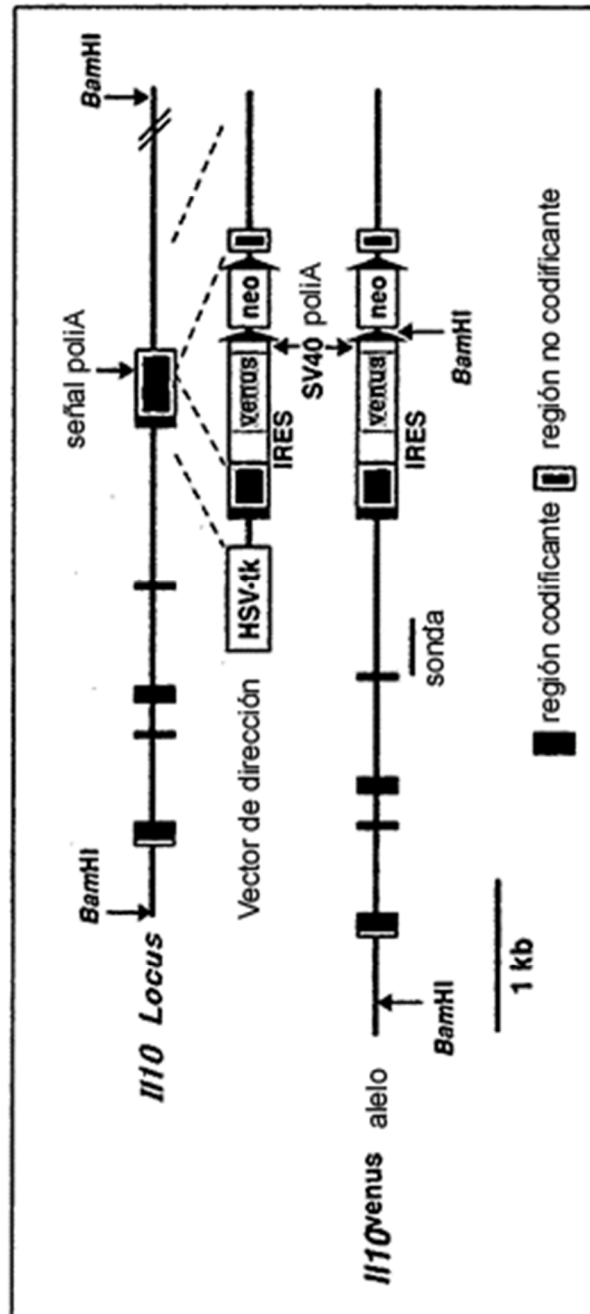
ES 2 610 146 T3

	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 63 tacggctacc ttgttacgac tt	22
5	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220>	
10	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 64 aaatgacggt acctgactaa	20
15	<210> 65 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial <220>	
20	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 65 cttgagttt cattctgcg aa	22
25	<210> 66 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial <220>	
30	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 66 gcacaagcag tggagt	16
35	<210> 67 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial <220>	
40	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 67 cttctccgt ttgtcaa	18
45	<210> 68 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial <220>	
50	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 68 gagaggaagg tccccac	18
55	<210> 69 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial <220>	
	<223> Secuencia cebadora sintetizada de forma artificial <400> 69 cgctactgg ctggttcag	19

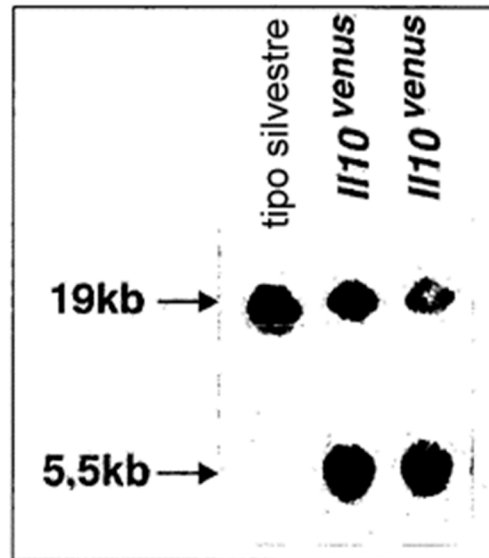
REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada de enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria o enfermedad alérgica en un individuo, comprendiendo la composición, como ingrediente activo, bacterias que comprenden bacterias que forman esporas pertenecientes a los grupos IV y XIVa de *Clostridium* en combinación, que es una combinación que induce la proliferación o acumulación de células T reguladoras factor de transcripción Foxp3-positivas en dicho individuo.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona de: rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esprue, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, enfermedad de injerto contra hospedador y esclerosis múltiple.
3. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las bacterias pertenecientes a los grupos IV y XIVa de *Clostridium* en combinación comprenden múltiples cepas de bacterias pertenecientes al grupo XIVa o grupo IV de *Clostridium* en combinación como un ingrediente activo.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende adicionalmente, como ingrediente activo, una o más cepas de bacterias pertenecientes a un grupo de *Clostridium* diferente del grupo XIVa o grupo IV de *Clostridium*.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es una composición farmacéutica.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa en combinación con una composición terapéutica adicional seleccionada de: corticosteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolina de sodio, anti-leucotrienos, fármacos anti-colinérgicos para la rinitis, descongestivos anti-colinérgicos, estabilizantes de mastocitos, anticuerpos monoclonales anti-IgE y combinaciones de los mismos.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas bacterias pertenecientes a los grupos IV y XIVa de *Clostridium* están en forma de esporas.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas bacterias se obtienen de una fracción que forma esporas de una muestra fecal obtenida de un ser humano.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha fracción que forma esporas es una fracción resistente a cloroformo de dicha muestra fecal.

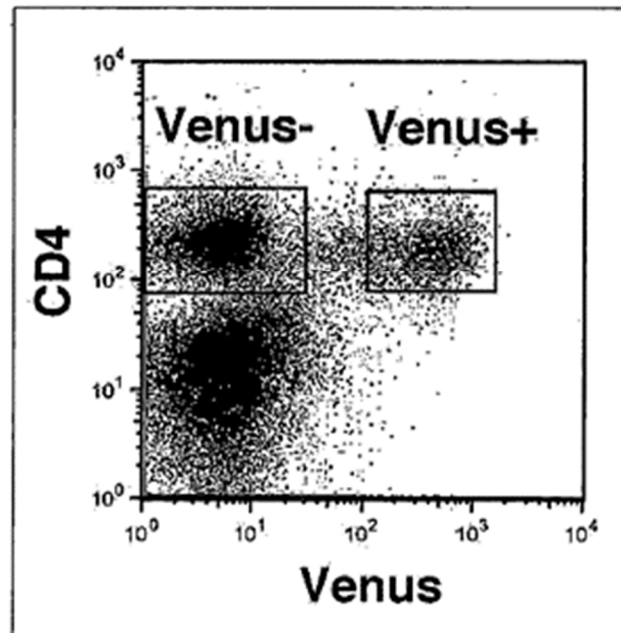
[Fig. 1]



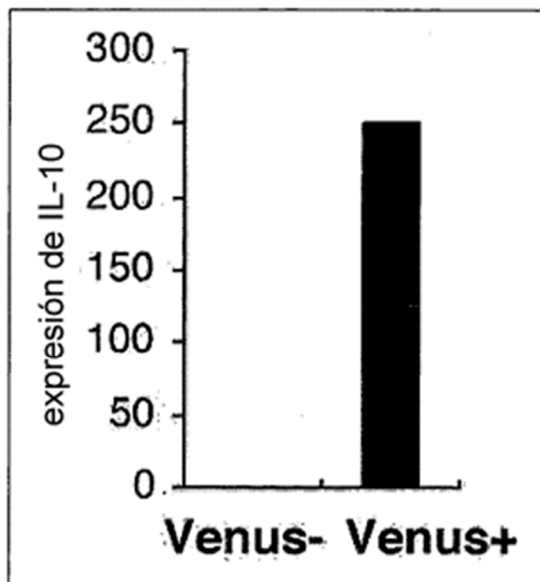
[Fig. 2]



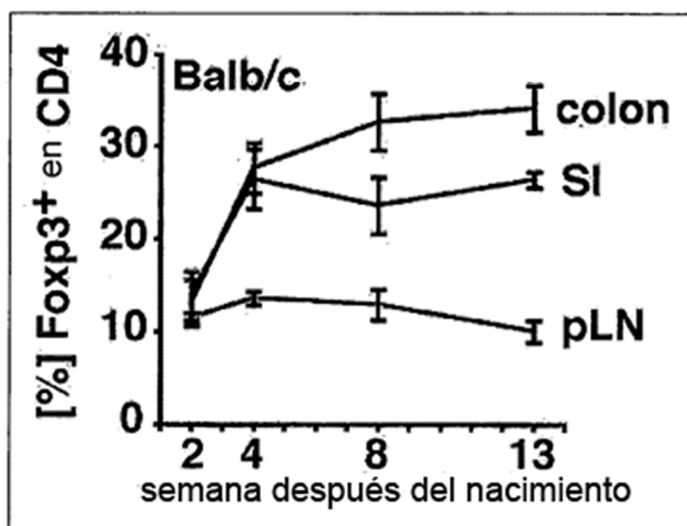
[Fig. 3]



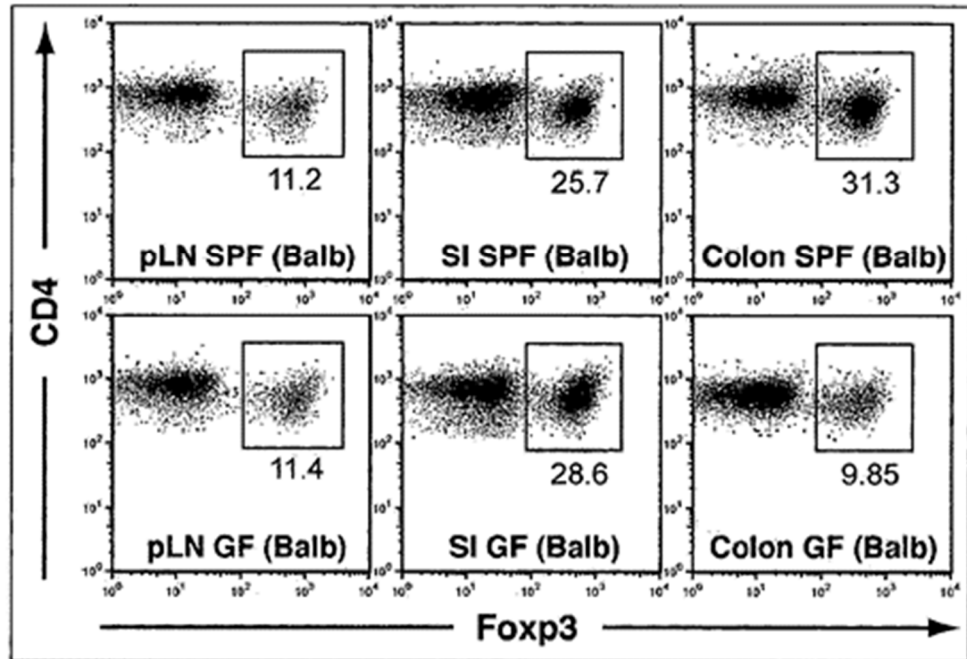
[Fig. 4]



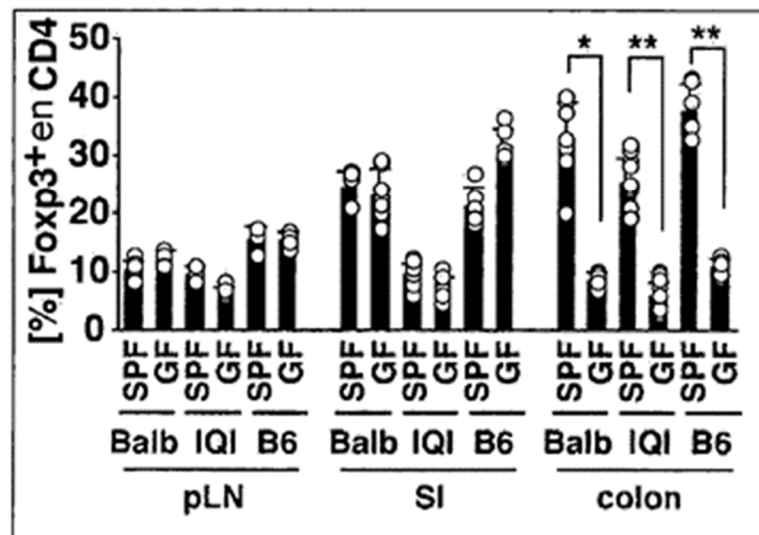
[Fig. 5]



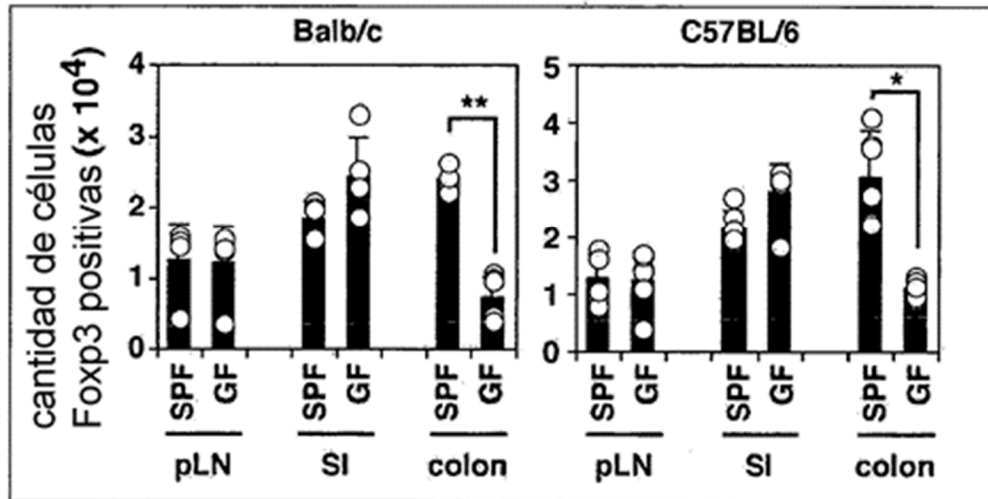
[Fig. 6]



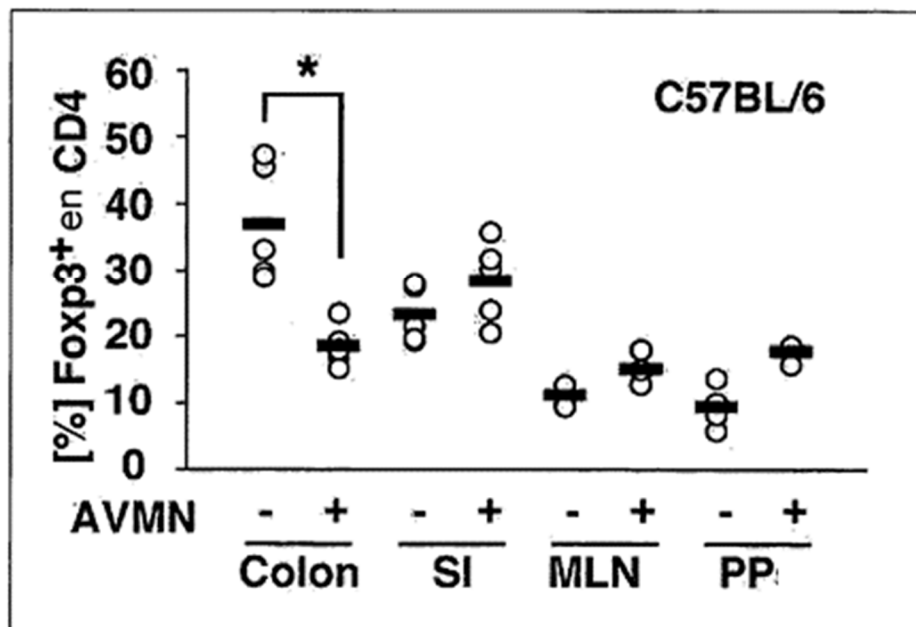
[Fig. 7]



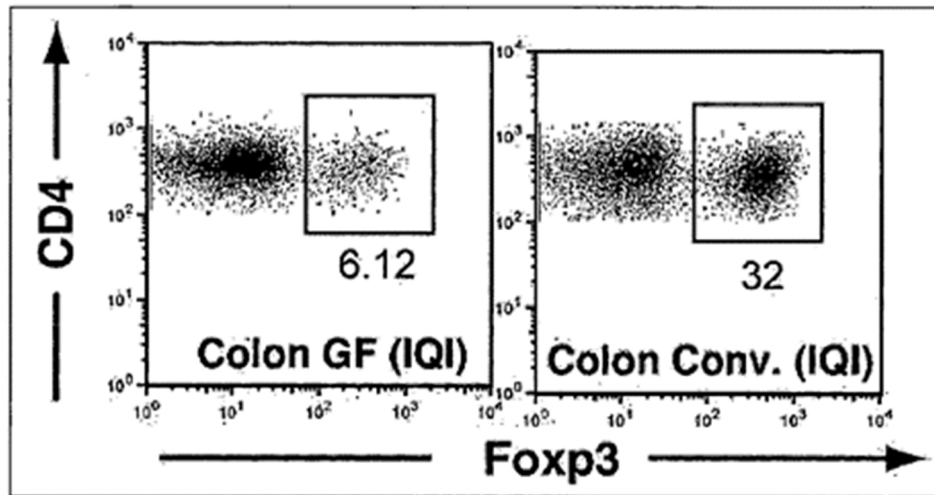
[Fig. 8]



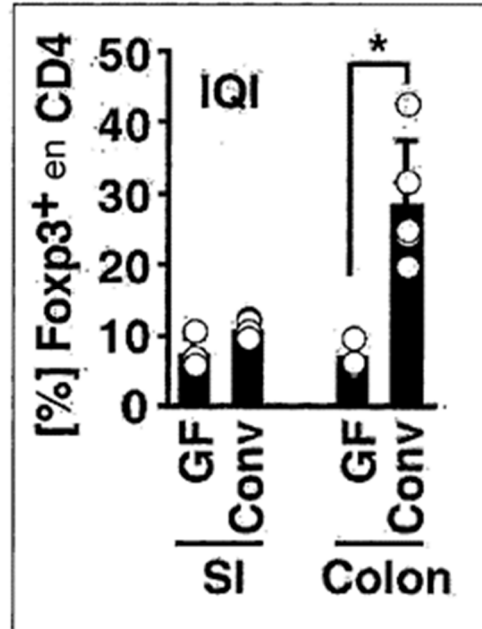
[Fig. 9]



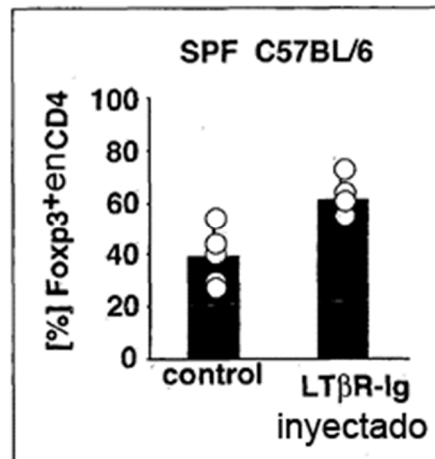
[Fig. 10]



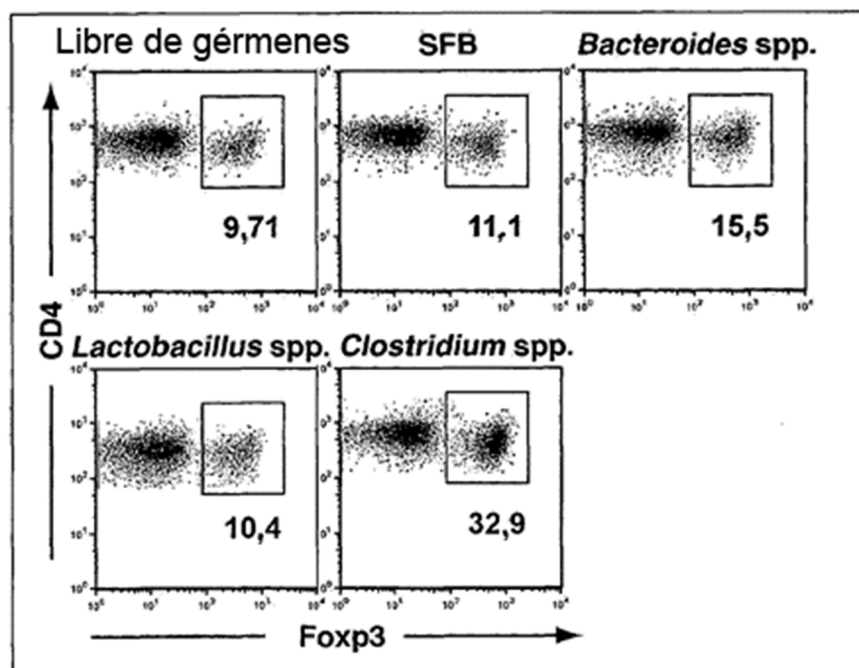
[Fig. 11]



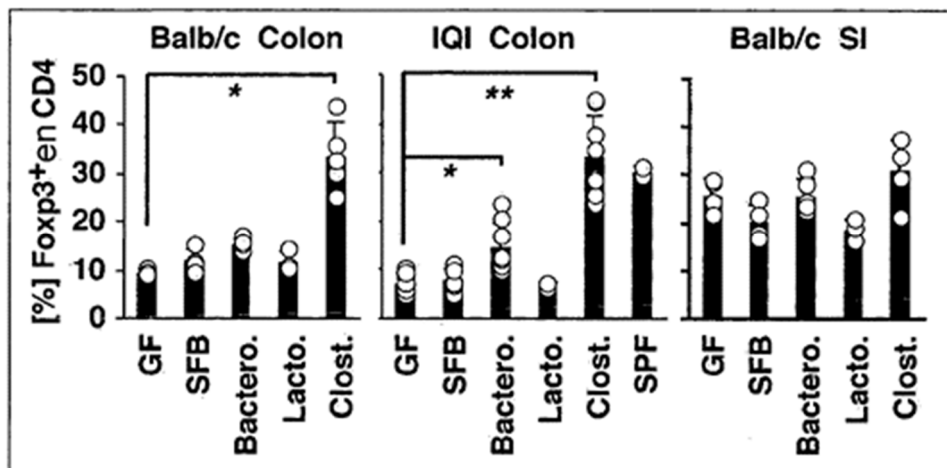
[Fig. 12]



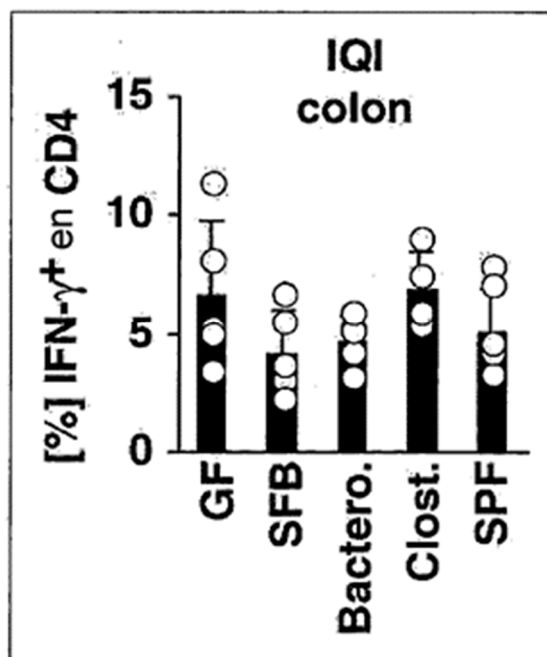
[Fig. 13]



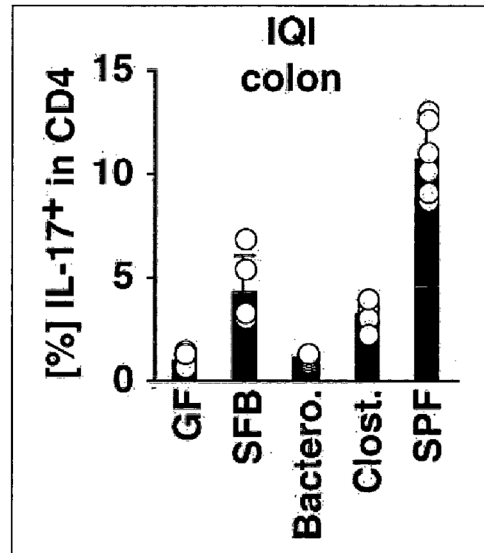
[Fig. 14]



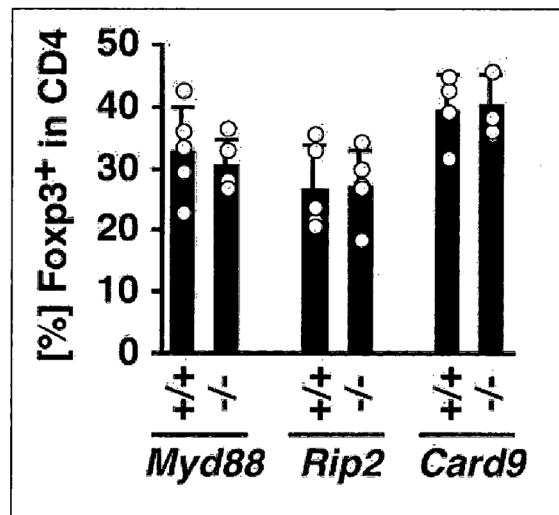
[Fig. 15]



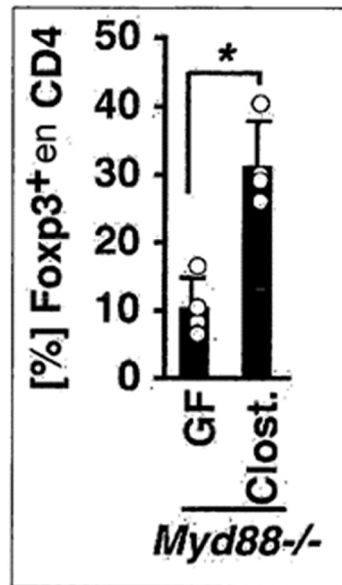
[Fig. 16]



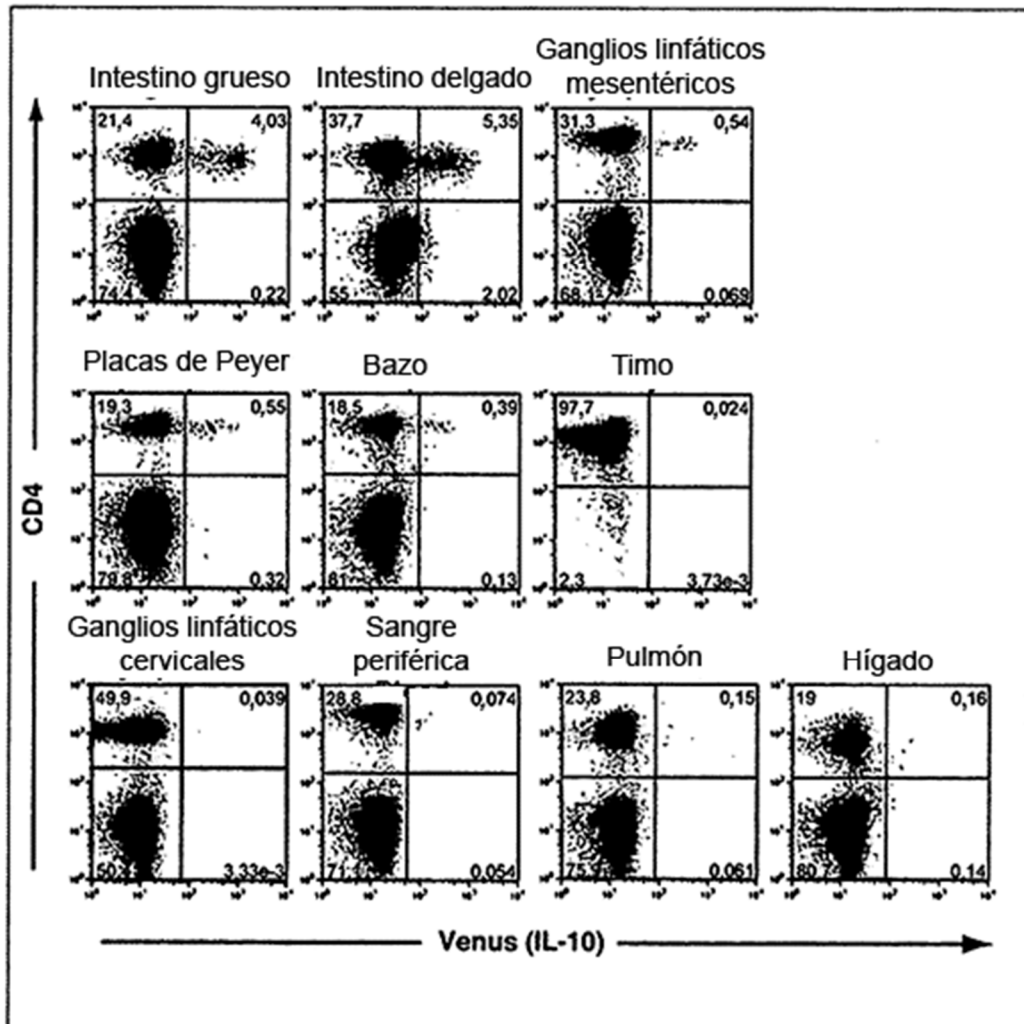
[Fig. 17]



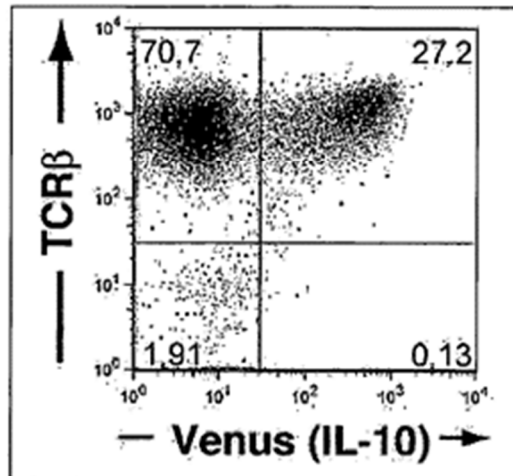
[Fig. 18]



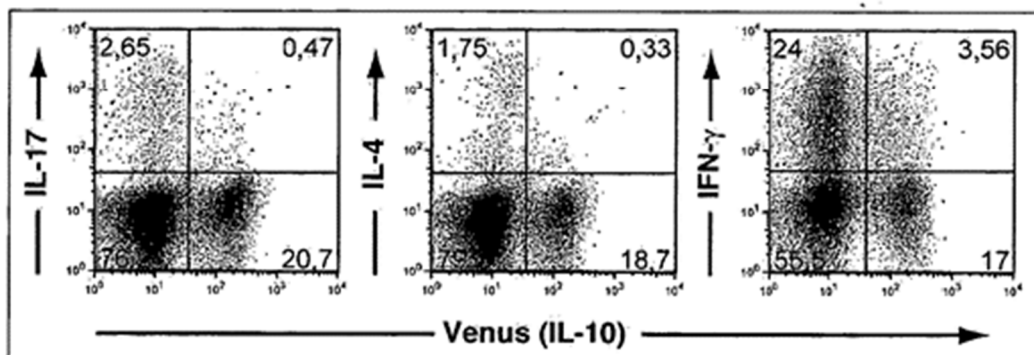
[Fig. 19]



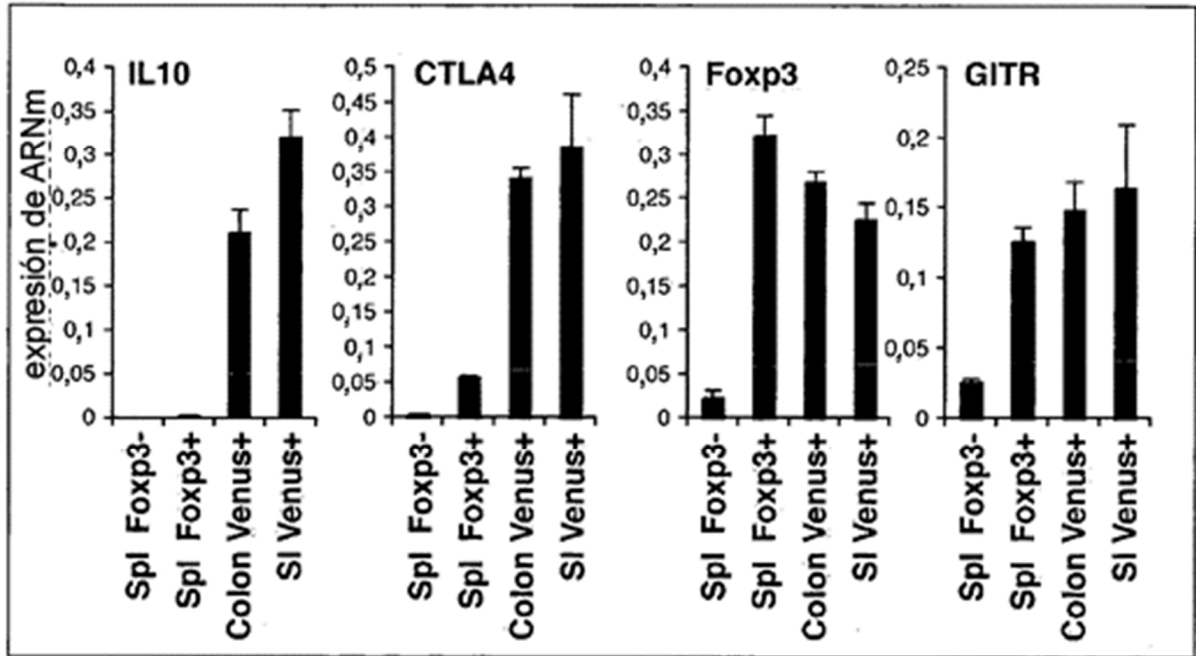
[Fig. 20]



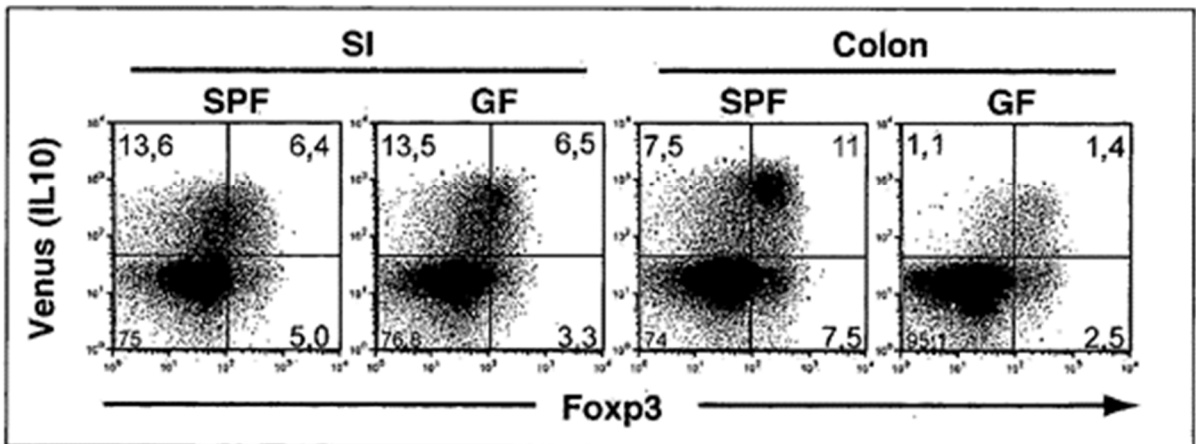
[Fig. 21]



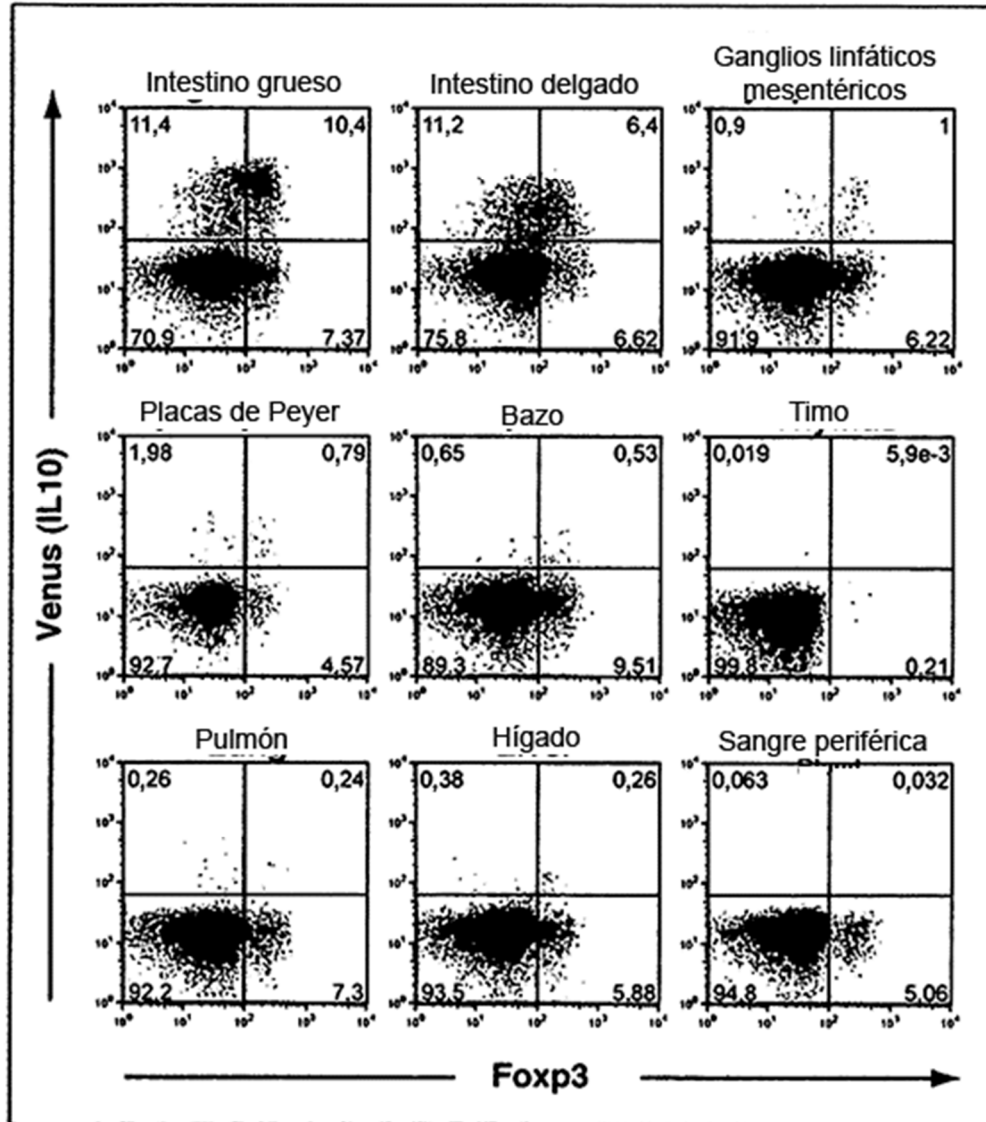
[Fig. 22]



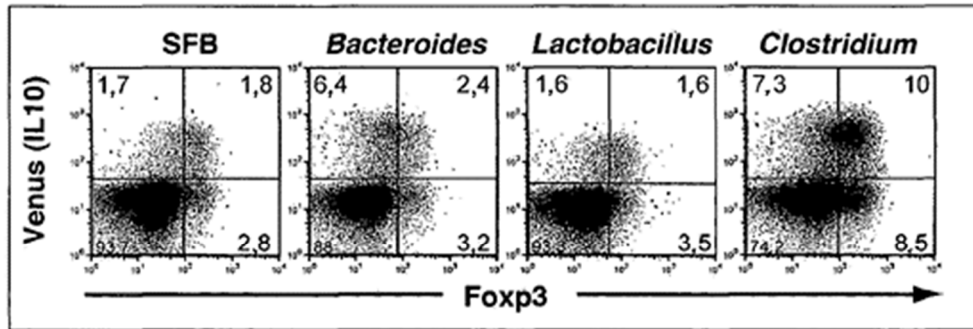
[Fig. 23]



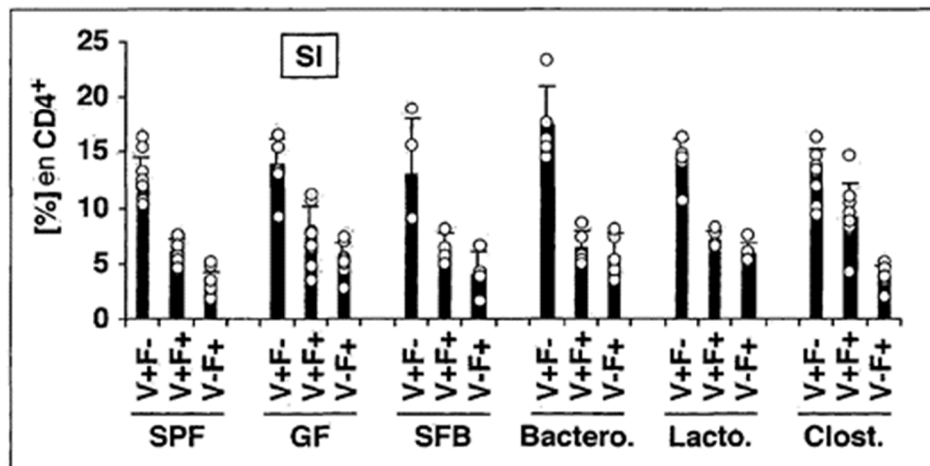
[Fig. 24]



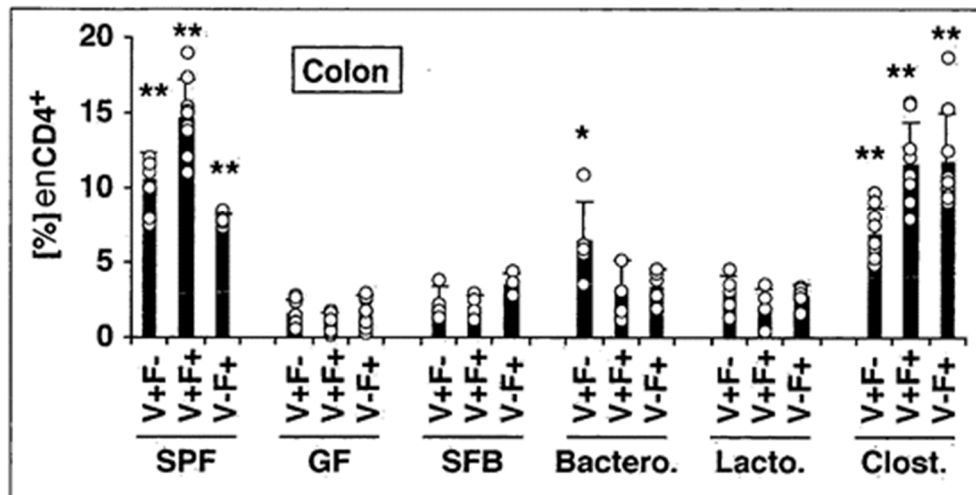
[Fig. 25]



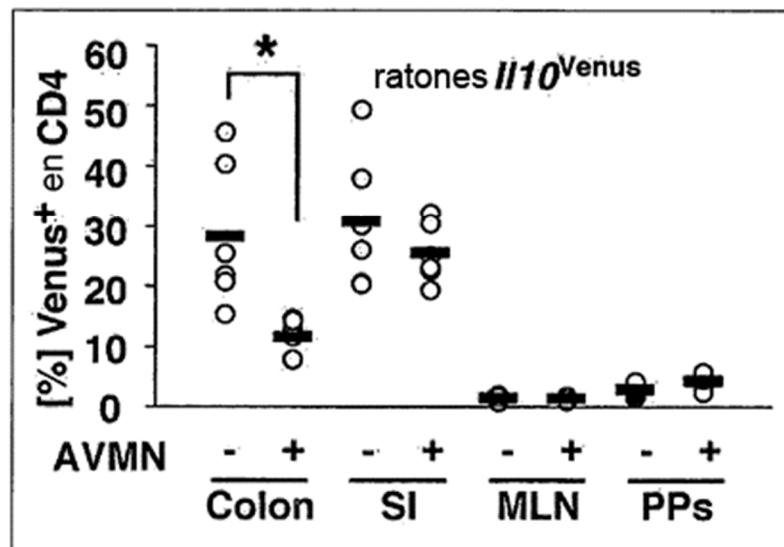
[Fig. 26]



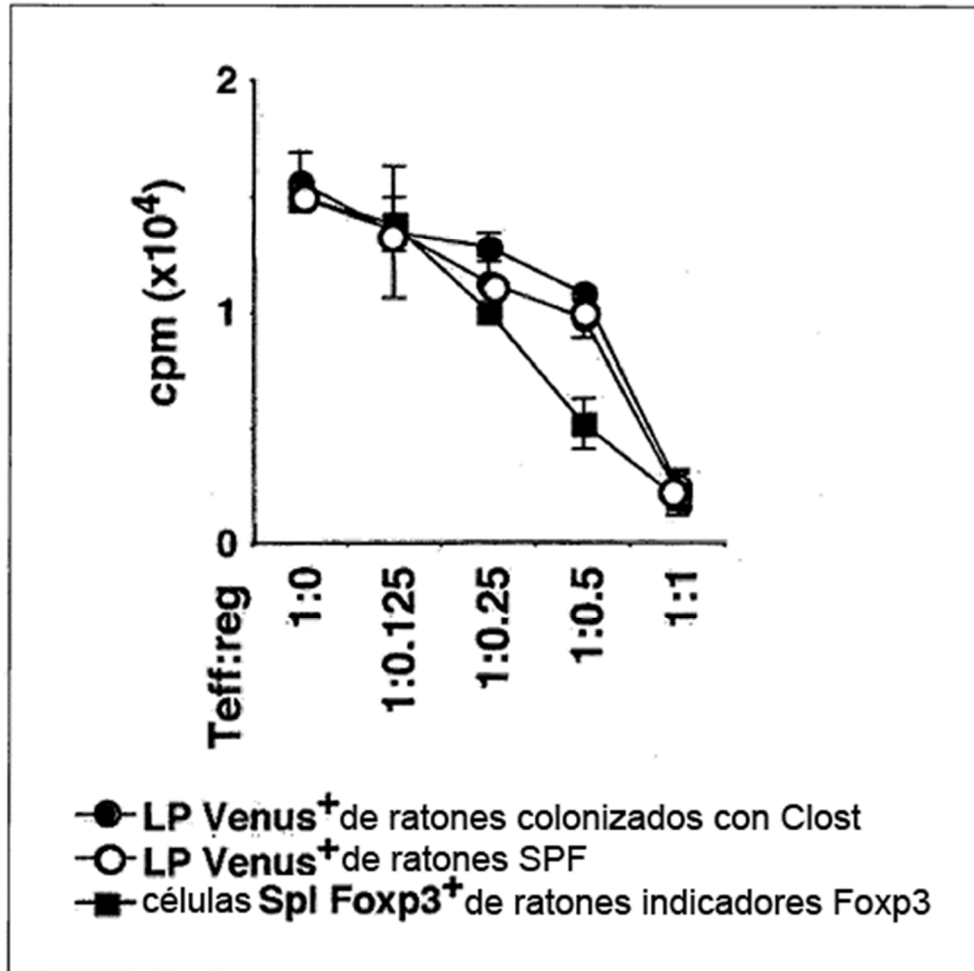
[Fig. 27]



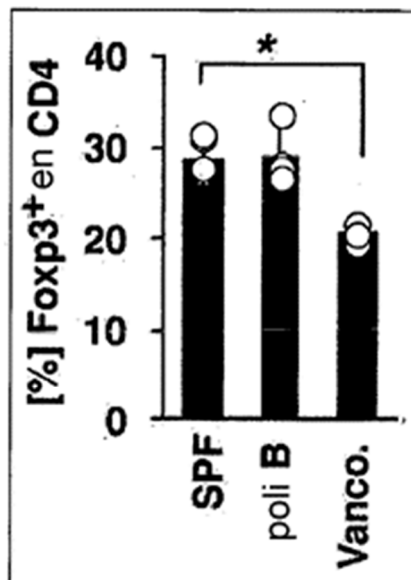
[Fig. 28]



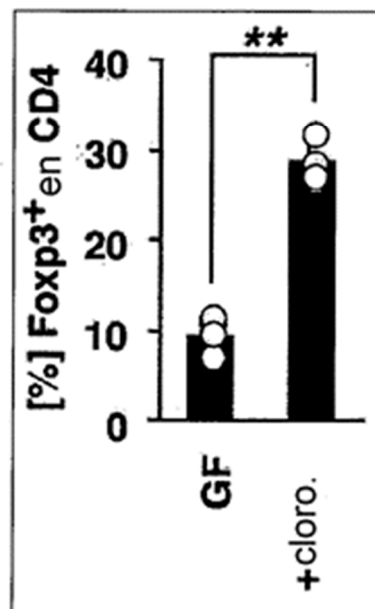
[Fig. 29]



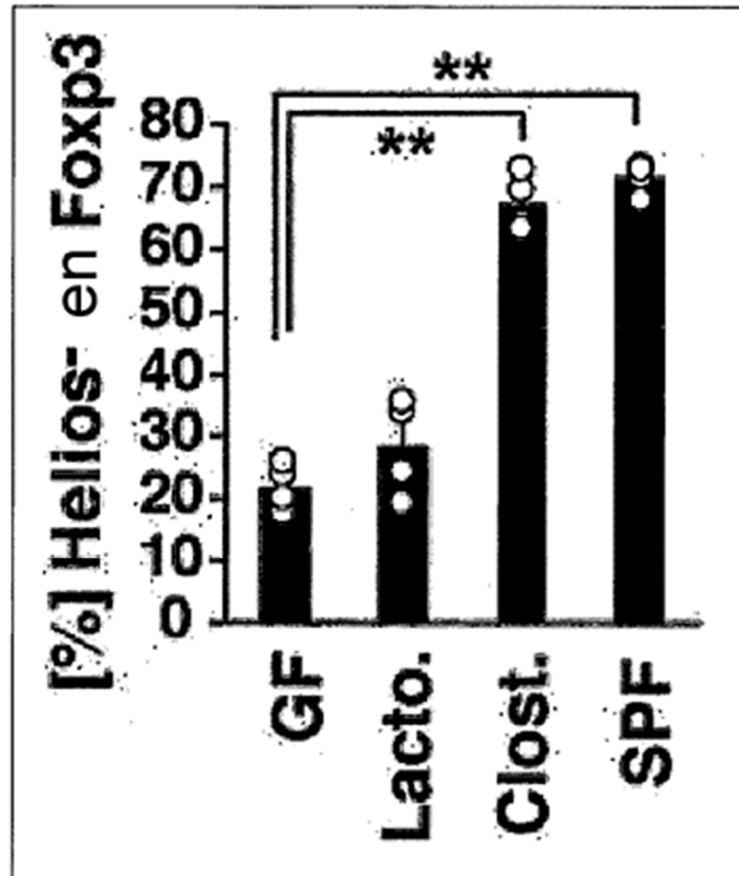
[Fig. 30]



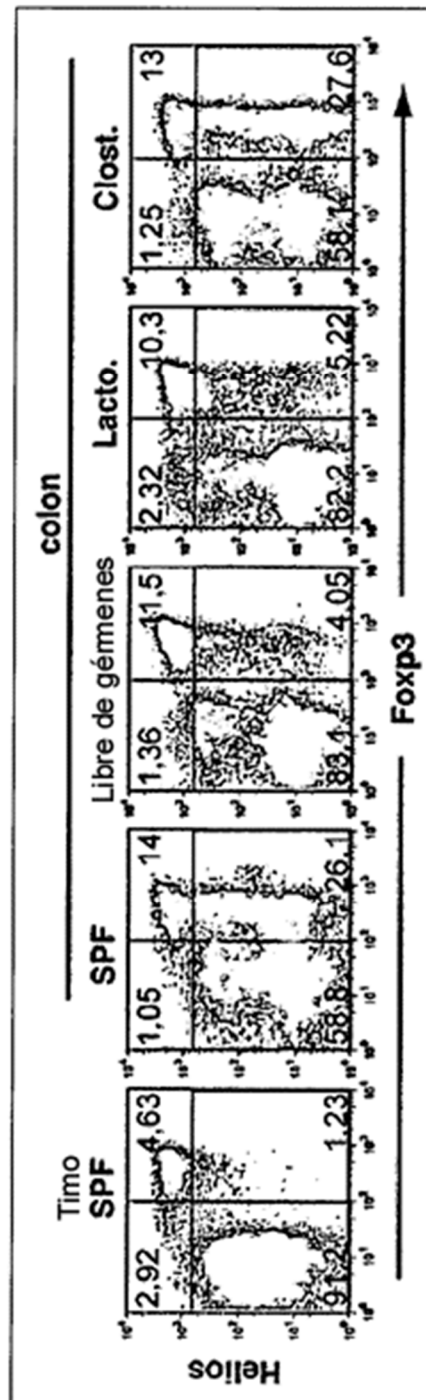
[Fig. 31]



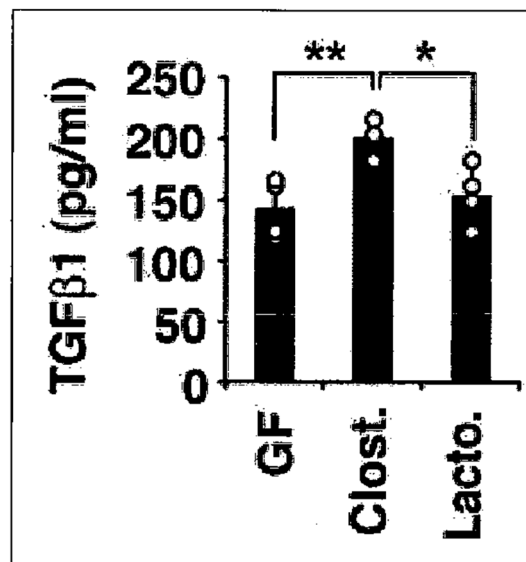
[Fig. 32].



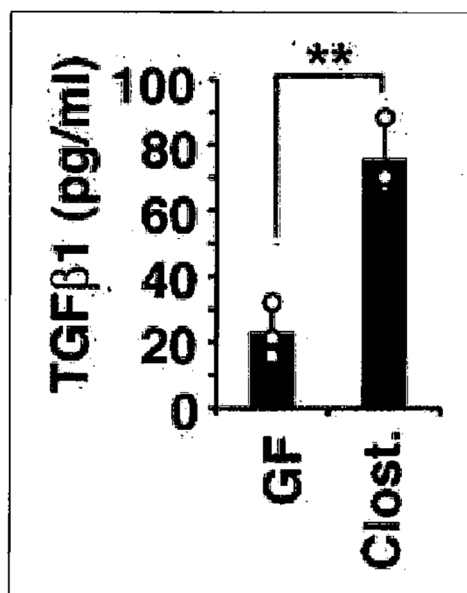
[Fig. 33]



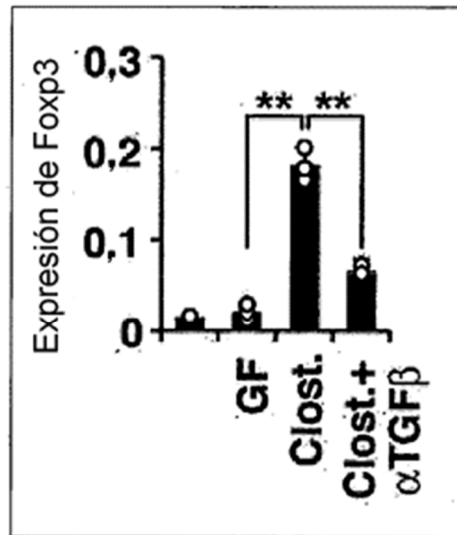
[Fig. 34]



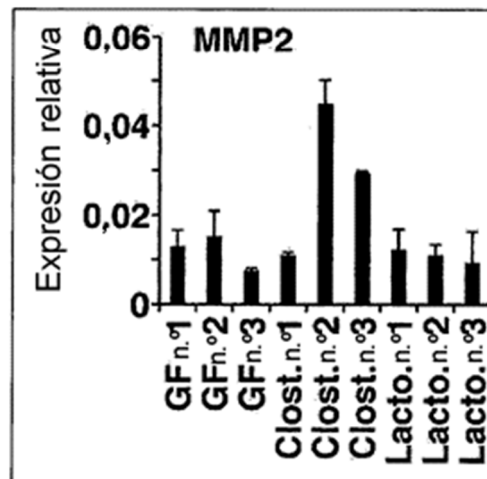
[Fig. 35]



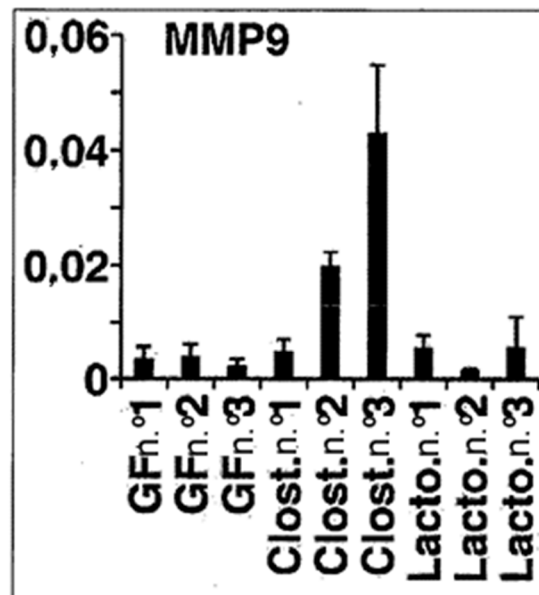
[Fig. 36]



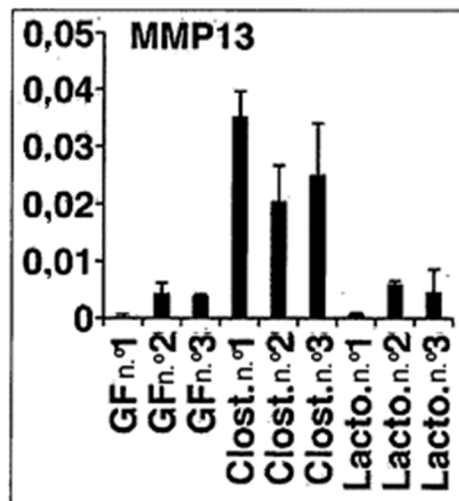
[Fig. 37]



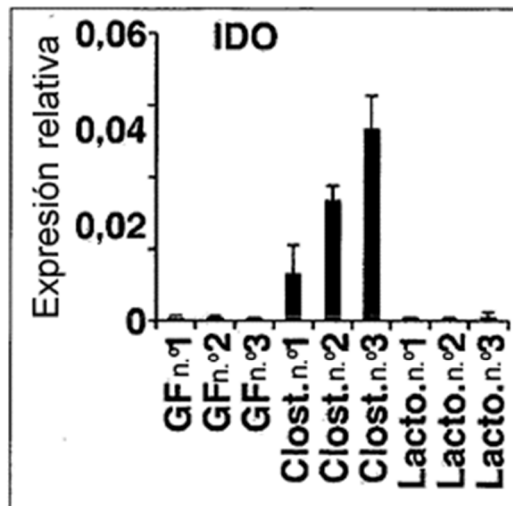
[Fig. 38]



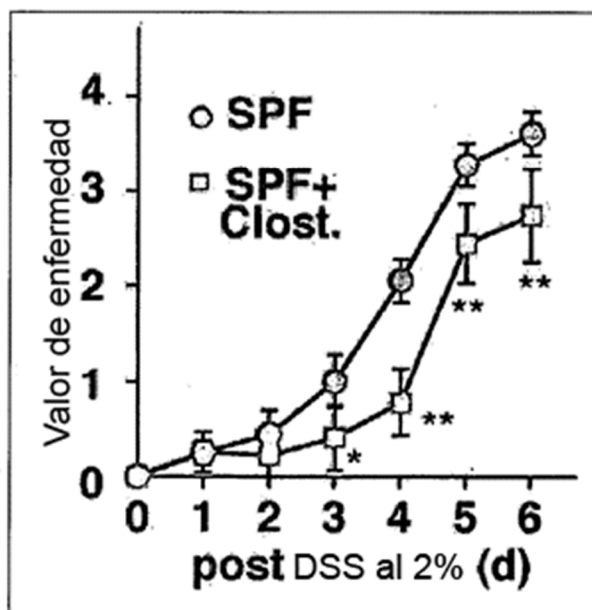
[Fig. 39]



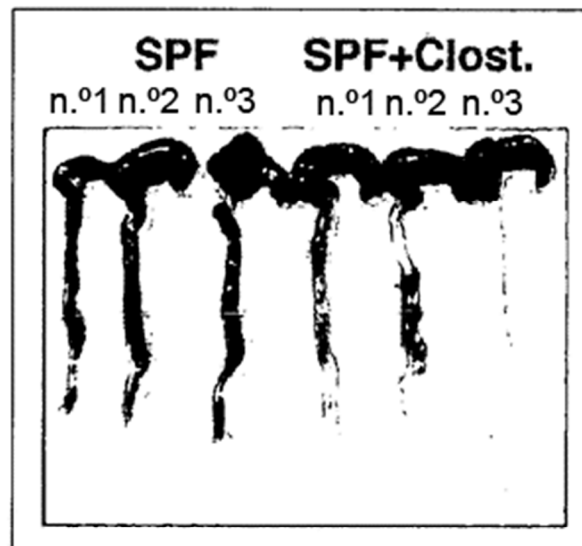
[Fig. 40]



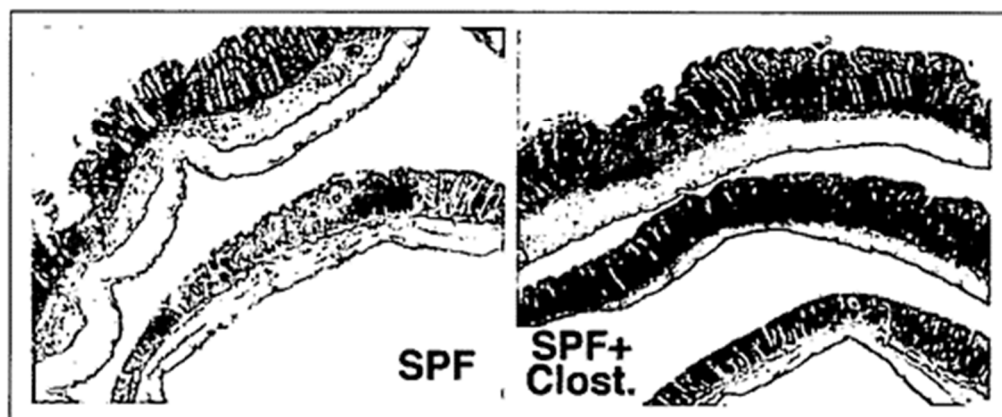
[Fig. 41]



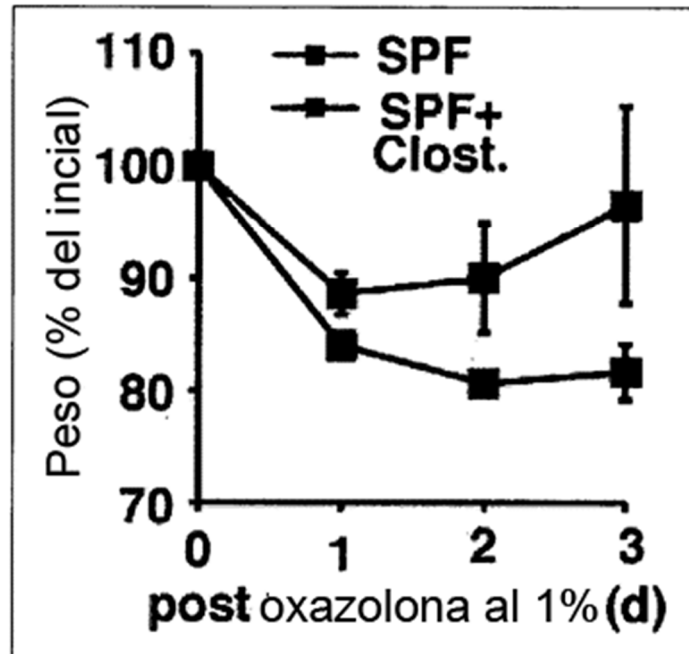
[Fig. 42]



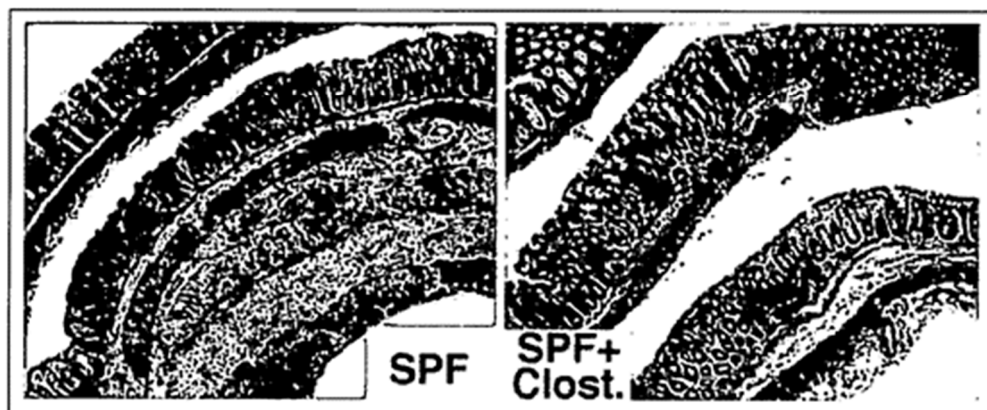
[Fig. 43]



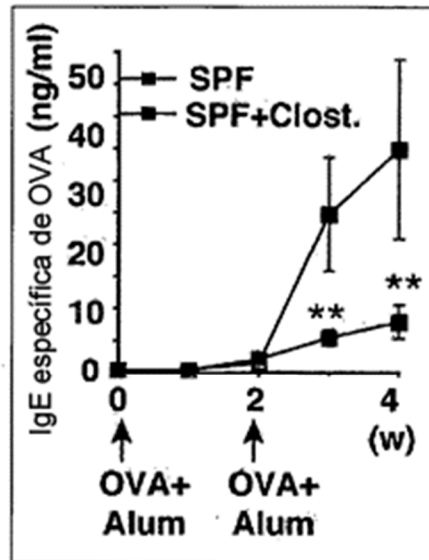
[Fig. 44]



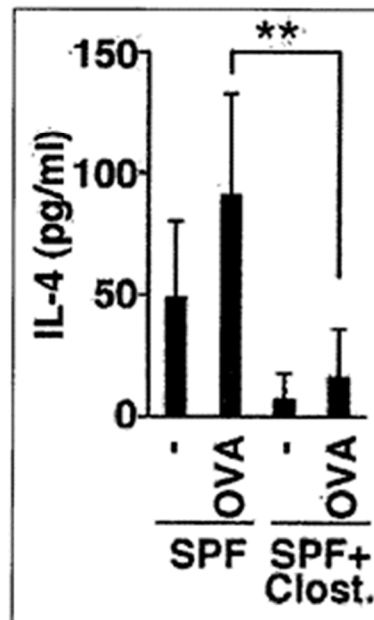
[Fig. 45]



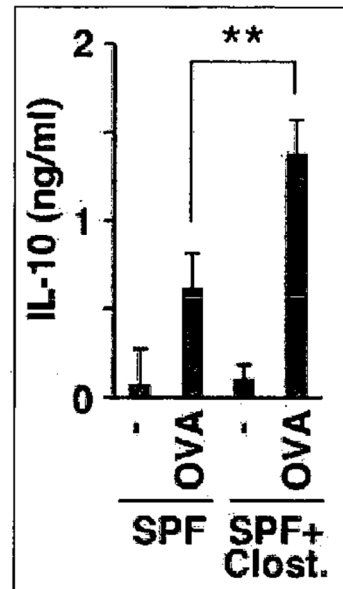
[Fig. 46]



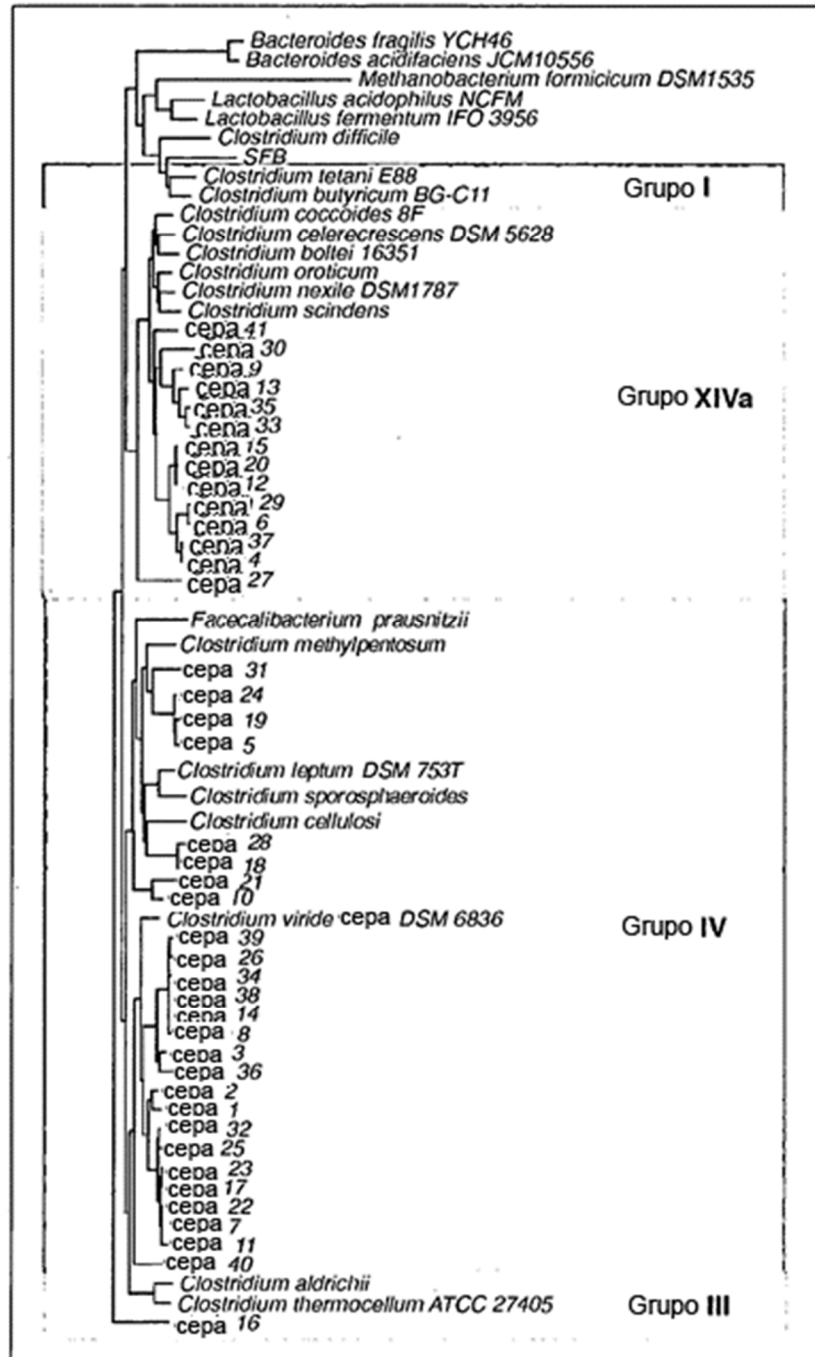
[Fig. 47]



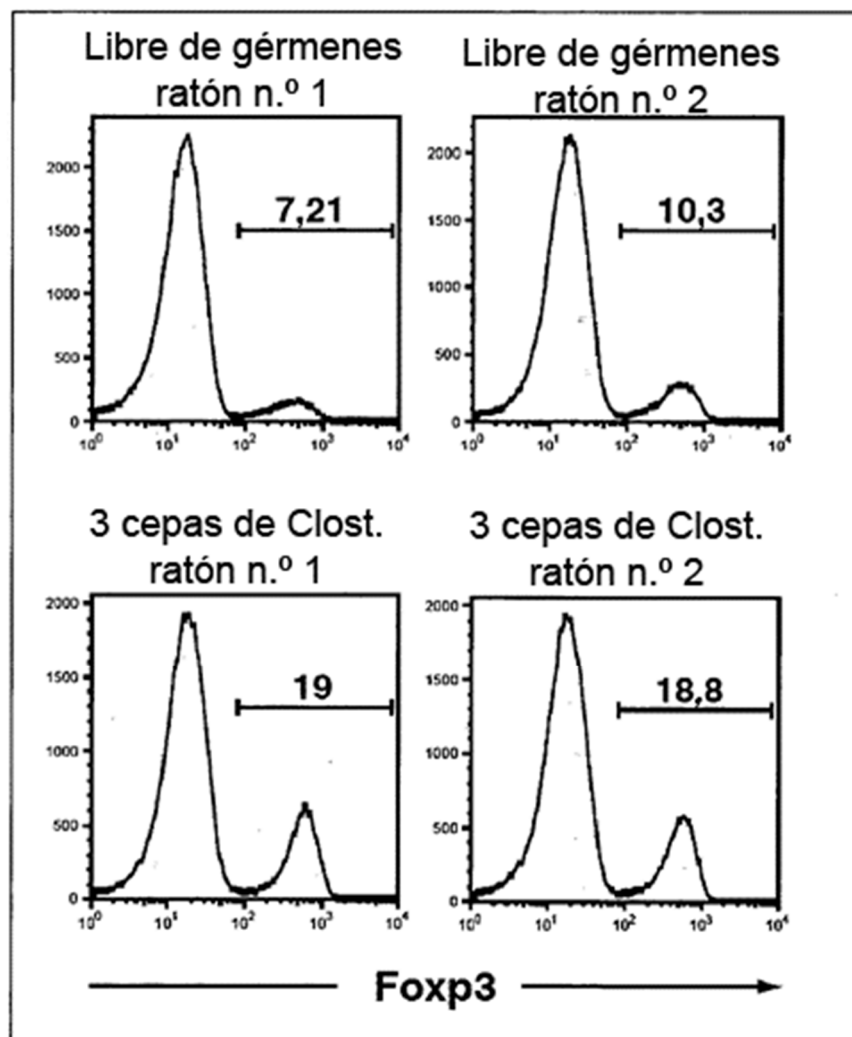
[Fig. 48]



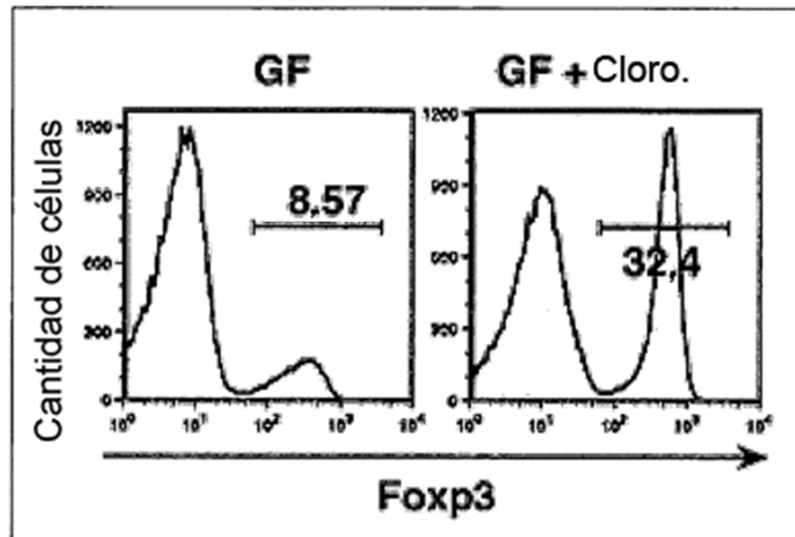
[Fig. 49]



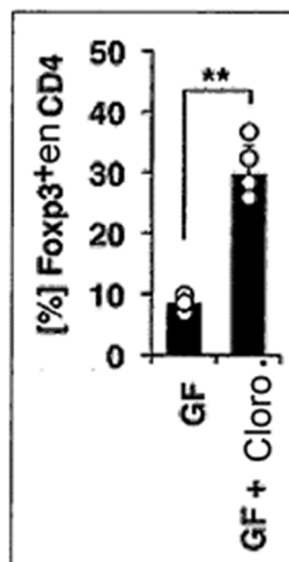
[Fig. 50]



[Fig. 51]



[Fig. 52]



[Fig. 53]

