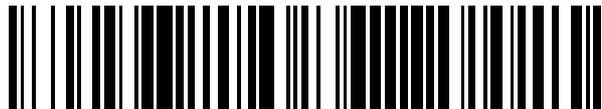


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 617**

51 Int. Cl.:

A61K 35/744 (2015.01)

C12N 1/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2016 PCT/GB2016/053622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085520**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2016 E 16801286 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 3209310**

54 Título: **Composiciones que comprenden cepas bacterianas**

30 Prioridad:

20.11.2015 GB 201520502
23.03.2016 GB 201604924

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MULDER, IMKE ELISABETH;
HOLT, AMY BETH;
PANZICA, DOMENICO y
MCCLUSKEY, SEANIN MARIE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 662 617 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).

Composiciones que comprenden cepas bacterianas

Descripción

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] Esta invención está en el campo de las composiciones que comprenden cepas bacterianas aisladas en el tracto digestivo de los mamíferos y el uso de tales composiciones en el tratamiento de la enfermedad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Se cree que el intestino humano es estéril *en el útero*, pero se expone a una gran variedad de microbios maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento. Posteriormente, se produce un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciado por factores tales como el modo de administración, el medio ambiente, la dieta y el genotipo del huésped, todo lo cual afecta la composición de la microbiota intestinal, particularmente durante los primeros años de vida. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y se vuelve adulta [1]. La microbiota intestinal humana contiene más de 500-1000 filotipos diferentes que pertenecen esencialmente a dos divisiones bacterianas principales, los Bacteroidetes y los Firmicutes [2]. Las exitosas relaciones simbióticas que surgen de la colonización bacteriana del intestino humano han producido una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales, protectoras y otras beneficiosas. Las actividades metabólicas mejoradas del intestino colonizado aseguran que los componentes dietéticos no digeribles se degraden con la liberación de subproductos que proporcionan una importante fuente de nutrientes para el huésped. Del mismo modo, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es bien reconocida y se ejemplifica en animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunitario deteriorado que se reconstituye funcionalmente después de la introducción de bacterias comensales [3-5].

[0003] Los cambios dramáticos en la composición de la microbiota se han documentado en los trastornos gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Por ejemplo, los niveles de bacterias XIVA de racimo *Clostridium* se reducen en pacientes con EII, mientras que el número de *E. coli* se aumenta, lo que sugiere un cambio en el equilibrio de simbiosis y pathobiontes dentro del intestino [6 - 9]. Curiosamente, esta disbiosis microbiana también se asocia con desequilibrios en las poblaciones de células efectoras T.

[0004] En reconocimiento del efecto positivo potencial que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino de los animales, se han propuesto diversas cepas para uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, por ejemplo, [10-13]). Además, ciertas cepas, incluyendo principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se han propuesto para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes que no están directamente relacionadas con los intestinos (véanse [14] y [15] para revisiones). Sin embargo, la relación entre diferentes enfermedades y diferentes cepas bacterianas, y los efectos precisos de cepas bacterianas particulares sobre el intestino y a nivel sistémico y sobre cualquier tipo particular de enfermedades, están mal caracterizados. Por ejemplo, ciertas especies de *Enterococcus* han sido implicadas en la causa del cáncer [16].

[0005] El documento JP H08-259450 describe el uso de *Enterococcus spp.* inactivado por calor para modular la producción de interferón.

[0006] El documento JP 2007-116991 describe el uso de *E. faecalis* inactivada por calor en productos alimenticios.

[0007] Existe un requisito en la técnica para nuevos métodos de tratamiento de enfermedades. También hay un requisito para que los efectos potenciales de las bacterias intestinales se caractericen para que se puedan desarrollar nuevas terapias que usan bacterias intestinales.

50 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0008] Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades. En particular, los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir el cáncer. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la especie *Enterococcus gallinarum* pueden ser eficaces para tratar y prevenir el cáncer. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Enterococcus gallinarum* puede reducir el tamaño del tumor en modelos de cáncer en ratones.

[0009] En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum*, para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, como el de mama, de pulmón o cáncer de hígado. Los inventores han identificado que el tratamiento con composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum* puede reducir el crecimiento tumoral en modelos de ratón de cáncer de mama, pulmón e hígado. En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un método para reducir el tamaño del tumor o prevenir el crecimiento tumoral en el tratamiento del cáncer. Las composiciones que usan *Enterococcus gallinarum* pueden ser particularmente eficaces para reducir el tamaño del tumor o prevenir el crecimiento tumoral en el tratamiento del cáncer.

[0010] La cepa bacteriana en la composición de la invención es de *Enterococcus gallinarum*. Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 2.

[0011] En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas de la invención puede ser efectiva para tratar el cáncer. Además, la administración oral es conveniente para pacientes y médicos y permite la administración y/o colonización parcial o total del intestino.

[0012] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más vehículos farmacéuticamente excipientes o vehículos aceptables.

[0013] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica efectiva y conveniente para preparar composiciones estables que permiten el suministro de bacterias.

[0014] En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se describió anteriormente.

[0015] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se describe anteriormente.

[0016] Además, se describe aquí un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum*.

[0017] En el desarrollo de la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. La cepa de *Enterococcus gallinarum* de la invención se muestra eficaz para tratar el cáncer. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una célula de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488, o un derivado de la misma. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales células, o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también proporciona una célula de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488 para uso en terapia, en particular para cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018]

Figura 1: Modelo de ratón de cáncer de mama - volumen del tumor.

Figura 2: Modelo de ratón de cáncer de pulmón - volumen del tumor.

Figura 3: Modelo de ratón de cáncer de hígado: peso del hígado.

Figura 4A: Niveles de citocina (pg/ml) en células dendríticas inmaduras (sin bacterias).

Figura 4B: Niveles de citocina (pg/ml) en células dendríticas inmaduras después de la adición de LPS.

Figura 4C: Niveles de citoquinas (pg/ml) en células dendríticas inmaduras después de la adición de MRX518.

Figura 4D: Niveles de citocina (pg/ml) en células dendríticas inmaduras después de la adición de MRX518 y LPS.

Figura 5A: Niveles de citocina en células THP-1 (sin bacterias).

Figura 5B: Niveles de citocina en células THP-1 después de la adición de sedimento bacteriano.

Figura 5C: Niveles de citoquina en células THP-1 después de la adición de MRX518 solo o en combinación con LPS.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Cepas bacterianas

[0019] Las composiciones de la invención comprenden una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum*. Los ejemplos demuestran que las bacterias de esta especie son útiles para tratar o prevenir el cáncer.

[0020] Como se describe en este documento hay composiciones que comprenden una cepa bacteriana que tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 95% idéntica a la secuencia ARNr 16s de una cepa bacteriana de

Enterococcus gallinarum para uso en terapia, por ejemplo, para uso en un método de tratar o prevenir el cáncer. En particular, la descripción también proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana que tiene una secuencia de ARNr 16s que es idéntica al menos en un 95% a SEQ ID NO: 2 para uso en terapia, por ejemplo, para uso en un método para tratar o prevenir cáncer. En algunas realizaciones de la divulgación, la cepa bacteriana en la composición no es de *Enterococcus gallinarum*, sino que es una cepa estrechamente relacionada.

[0021] La invención proporciona un *Enterococcus gallinarum* para uso en terapia, por ejemplo, para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. De manera similar, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum*, para uso en terapia, por ejemplo, para uso en el tratamiento o prevención del cáncer. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento comprenden una cepa bacteriana que tiene una secuencia de ARNr 16s que es idéntica al menos en un 95% a SEQ ID NO: 2, por ejemplo, que es un *Enterococcus gallinarum*, y no contiene ningún otro género bacteriano. En ciertas realizaciones, las composiciones de la divulgación comprenden una única cepa de una cepa bacteriana que tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos idéntica en un 95% a SEQ ID NO: 2, por ejemplo, que es un *Enterococcus gallinarum*, y no contiene cualquier otra cepa o especie bacteriana.

[0022] *Enterococcus gallinarum* forma células cocoides, la mayoría en pares o en cadenas cortas. Es inmóvil y colonias en el agar de sangre o el agar nutriente son circulares y lisas. *Enterococcus gallinarum* reacciona con antisueros del grupo D de Lancefield. La cepa tipo de *Enterococcus gallinarum* es F87/276 = PB21 = ATCC 49573 = CCUG 18658 = CIP 103013 = JCM 8728 = LMG 13129 = NBRC 100675 = NCIMB 702313 (anteriormente NCDO 2313) = NCTC 12359 [17]. El número de acceso GenBank para una secuencia de gen ARNr 16S de *Enterococcus gallinarum* es AF039900 (descrito aquí como SEQ ID NO: 1). Una cepa ejemplar de *Enterococcus gallinarum* se describe en [17].

[0023] La bacteria *Enterococcus gallinarum* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488 fue probado en los ejemplos y también se denomina en este documento como cepa MRX518. Las referencias a MRX518 y MRX0518 se usan de forma intercambiable. Una secuencia 16S ARNr para la cepa MRX518 que se probó se proporciona en SEQ ID NO: 2. La cepa MRX518 fue depositada en la autoridad internacional de depósito NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por 4D Pharma Research Ltd. (Edificio de Innovación en Ciencias de la Vida, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 16 de noviembre de 2015 como "*Enterococcus sp*" y se le asignó el número de acceso NCIMB 42488.

[0024] El genoma de cepa MRX518 comprende un cromosoma y el plásmido. Se proporciona una secuencia cromosómica para la cepa MRX518 en la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias publicado con WO 2017/085520. Se proporciona una secuencia de plásmido para la cepa MRX518 en la SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias publicado con WO 2017/085520. Estas secuencias se generaron utilizando la plataforma PacBio RS II.

[0025] También se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa probadas en los ejemplos sean eficaces para tratar o prevenir el cáncer. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana como se describe en este documento tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Enterococcus gallinarum*. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la divulgación tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a SEQ ID NO: 1 o 2. Preferiblemente, la identidad de secuencia es para SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 2.

[0026] También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso 42488 sean eficaces para tratar o prevenir el cáncer. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas o muy similares características fisiológicas y bioquímicas.

[0027] Las cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488 y que son adecuados para uso en la invención pueden identificarse por secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488. Por ejemplo, sustancialmente la totalidad del genoma puede secuenciarse y una cepa de biotipo para usar en la invención puede tener al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en al menos 80% de su genoma completo (por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95% o 99%, o en todo su genoma). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene al menos 98% de identidad de secuencia a lo largo de al menos 98% de su genoma o al menos 99% de identidad de secuencia en 99% de su genoma. Otras secuencias adecuadas para usar en la identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas tales como BOX, ERIC, (GTG)s, o REP o [18]. Las cepas de biotipo pueden tener secuencias con al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42488. En algunas realizaciones, una cepa de biotipo tiene una secuencia con al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la cepa MRX518 depositada como NCIMB 42488 y tiene la secuencia ARNr 16s de SEQ ID NO:2.

[0028] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana como se describe en el presente documento tiene un cromosoma

con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para uso en la divulgación tiene un cromosoma con al menos un 90% de identidad de secuencia (p. ej., Al menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % de identidad de secuencia) a SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en al menos 60% (por ejemplo, al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520. Por ejemplo, la cepa bacteriana para uso en la divulgación puede tener un cromosoma con al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 70% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o en al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en 80% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en 90% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 a través de 100% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en 70% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en 80% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en el 90% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 a través del 100% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos 98% se identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 70% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos un 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 80% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en 90% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 98% de identidad a SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 95% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos un 98% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 100% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 99,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en 90% de SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520, o al menos 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 95% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos un 99,5% de identidad con la SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 en un 98% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, o al menos el 99,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 en el 100% de la SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520.

[0029] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana como se describe en el presente documento tiene un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para uso en la divulgación tiene un plásmido con al menos 90% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de secuencia identidad) a SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 a través de al menos 60% (por ejemplo, al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % o 100%) de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520. Por ejemplo, la cepa bacteriana para uso en la divulgación puede tener un plásmido con al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 en un 70% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o en al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 en 80% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 across 90% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 a través del 100% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 de WO 2017/085520 en 70% de SEQ ID NO: 4 de WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 de WO 2017/085520 en 80% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 en un 90% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 a través del 100% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 98% de la identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 en un 70% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos un 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 en un 80% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 en un 90% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, o al menos un 98% de secuencia de identidad con la SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520 a través del 100% de SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520.

[0030] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 y un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520.

[0031] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, por ejemplo como se describe anteriormente, y una secuencia de ARNr 16s con identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 1 o 2, por ejemplo como se describió anteriormente, preferiblemente que comprende la secuencia ARNr 16s de SEQ ID NO: 2, y opcionalmente comprende un plásmido con identidad de secuencia para SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, como se describe anteriormente.

[0032] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de

secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, por ejemplo como se describe anteriormente, y opcionalmente comprende un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, como se describió anteriormente, y es eficaz para tratar o prevenir el cáncer.

5 **[0033]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, por ejemplo como se describe anteriormente, y una secuencia de ARNr 16s con identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 1 o 2, por ejemplo como se describió anteriormente, y opcionalmente comprende un plásmido con identidad de secuencia para SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, como se describió anteriormente, y es eficaz para tratar o prevenir el cáncer.

10 **[0034]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la divulgación tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, que comprende la secuencia ARNr 16s de SEQ ID NO: 2) y un cromosoma con al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 a través de al menos 90% de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, y opcionalmente comprende un plásmido con identidad de secuencia para SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, como se describió anteriormente, y que es eficaz para tratar o prevenir el cáncer.

15 **[0035]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la divulgación tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 99%, 99,5% o 99,9% idéntico a la secuencia de ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, que comprende la secuencia ARNr 16s de SEQ ID NO: 2) y un cromosoma con al menos 98% de identidad de secuencia (p. ej. al menos 99% o al menos 99,5% de identidad de secuencia) con SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520 a través de al menos 98% (por ejemplo, al menos 99% o al menos 99,5%) de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, y opcionalmente comprende un plásmido con identidad de secuencia para SEQ ID NO: 4 del documento WO 2017/085520, como se describió anteriormente y que es efectivo para tratar o prevenir el cáncer.

20 **[0036]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención es un *Enterococcus gallinarum* y tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, que comprende la secuencia ARNr 16s de SEQ ID NO: 2) y un cromosoma con al menos 98% de identidad de secuencia (p. ej. al menos 99% o al menos 99,5% de identidad de secuencia) con SEQ ID NO: 3 de WO 2017/085520 a través de al menos 98% (por ejemplo, al menos 99% o al menos 99,5%) de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2017/085520, y opcionalmente comprende un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 de WO 2017/085520, como se describió anteriormente, y que es efectivo para tratar o prevenir el cáncer.

25 **[0037]** Alternativamente, cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488 y que son adecuados para uso en la invención pueden identificarse usando el depósito con número de acceso NCIMB 42488 y análisis de fragmentos de restricción y/o análisis de PCR, por ejemplo mediante el uso de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado fluorescente (FAFLP) y la toma de huellas dactilares de elemento de ADN repetitivo (PCR), o perfil de proteína, o secuenciación de ADNr 16S o 23s parcial. En realizaciones preferidas, tales técnicas pueden usarse para identificar otras cepas de *Enterococcus gallinarum*.

30 **[0038]** En ciertas realizaciones, cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488 y que son adecuadas para uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que la bacteria depositada con número de acceso NCIMB 42488 cuando se analizan mediante análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), por ejemplo cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI (para ejemplos de métodos y orientación, véase, por ejemplo, [19]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42488. En algunas realizaciones, el patrón de fermentación de carbohidratos se determina usando el panel API 50 CHL (bioMerieux). En algunas realizaciones, la cepa bacteriana usada en la invención es:

35 (i) positiva para la fermentación de al menos uno de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o todos): L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetilglucosamina, amidalina, arbutina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, sacarosa, D-trehalosa, gentiobiosa, D-tagatosa y gluconato de potasio; y/o

40 (ii) intermedia para la fermentación de al menos uno de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4 o todos): D-manitol, metilatoD-glicopiranosido, D-lactosa, almidón y L-fucosa; preferiblemente como se determina por análisis API 50 CHL (preferiblemente usando el panel API 50 CHL de bioMerieux).

45 **[0039]** Otras cepas de *Enterococcus gallinarum* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, tales como biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488, pueden identificarse usando cualquier método o estrategia apropiada, incluyendo los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para uso en la invención se pueden identificar cultivando en YCFA anaerobio y/o administrando las bacterias al modelo de ratón de artritis inducida por colágeno tipo II y luego evaluando los niveles de citocina. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento similares, tipo metabólico y/o antígenos de superficie a la

bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42488 pueden ser útiles en la invención. Una cepa útil tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42488. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en los modelos de la enfermedad del cáncer a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

[0040] En algunas realizaciones, la cepa bacteriana usada en la invención es:

- (i) Positiva para al menos uno de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos): fermentación de manosa, descarboxilasa de ácido glutámico, arilamidasa de arginina, arilamidasa de fenilalanina, arilamidasa de ácido piroglutámico, arilamidasa de tirosina, arilamidasa de histidina y arilamidasa de serina; y/o
- (ii) Intermedia para al menos uno de (por ejemplo, al menos 2 o todos): β -galactosidasa-6-fosfato, β -glucosidasa y N-acetilo- β -glucosaminidasa; y/o
- (iii) Negativa para al menos uno de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6 o todos): fermentación de la rafinosa, arilamidasa de la prolina, arilamida de la leucilglicina, arilamidasa de la leucina, arilamidasa de alanina, arilamidasa de glicina y arilamidasa de ácido glutámico de glutamilo,

preferiblemente como se determina mediante un ensayo de metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y nitratos, y opcionalmente un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina, más preferiblemente como se determina por análisis de ID 32A rápida (preferiblemente usando el sistema Rapid ID 32A de bioMerieux).

[0041] En algunas formas de realización, la cepa bacteriana utilizada en la invención es:

- (i) Negativa para al menos uno (por ejemplo, al menos 2, 3 o los 4 de) arilamidasa de glicina, fermentación de la rafinosa, arilamidasa de prolina y arilamidasa de leucina, por ejemplo, según lo determinado por un análisis de carbohidratos, aminoácidos y metabolismo de nitratos, preferiblemente como se determina por el análisis Rapid ID 32A (preferiblemente usando el sistema Rapid ID 32A de bioMerieux); y/o
- (ii) Positiva intermedia para la fermentación de L-fucosa, preferiblemente como se determina por análisis API 50 CHL (preferiblemente usando el panel API 50 CHL de bioMerieux).

[0042] En algunas formas de realización, la cepa bacteriana utilizada en la invención es un productor de ATP extracelular, por ejemplo uno que produce 6-6,7 ng/ μ l (por ejemplo, 6,1-6,6 ng/ μ l o 6,2-6,5 ng/ μ l o $6,33 \pm 0,10$ ng/ml) de ATP medida usando el kit de ensayo ATP (Sigma-Aldrich, MAK190). La ATP extracelular bacteriana puede tener efectos pleiotrópicos incluyendo la activación de la señalización mediada por el receptor de células T (Schenk et al., 2011), la promoción de la diferenciación de células Th17 intestinales (Atarashi et al., 2008) y la inducción de la secreción del mediador proinflamatorio IL-1 β mediante la activación del inflammasoma NLRP3 (Karmarkar et al., 2016). Por consiguiente, una cepa bacteriana que es un productor de ATP extracelular es útil para tratar o prevenir el cáncer.

[0043] En algunas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención comprende uno o más de los siguientes tres genes: proteína de elemento móvil; transportador de xilosa ABC, componente de permeasa; y FIG00632333: proteína hipotética. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para su uso en la invención comprende genes que codifican la proteína del elemento móvil y el transportador de xilosa ABC, componente de permeasa; proteína del elemento móvil y FIG00632333: proteína hipotética; transportador de xilosa ABC, componente de permeasa y FIG00632333: proteína hipotética; o proteína de elemento móvil, transportador de xilosa ABC, componente de permeasa, y FIG00632333: proteína hipotética.

[0044] Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa *Enterococcus gallinarum* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42488. Esta es la variedad MRX518 ejemplar ensayada en los ejemplos y se muestra eficaz para tratar la enfermedad. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488. La invención también proporciona una composición que comprende una célula de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488. La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488. La invención también proporciona una célula de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488, para uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas aquí. Un derivado de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42488 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada) del original.

[0045] Un derivado de una cepa de la invención puede ser modificado, por ejemplo a nivel genético, sin ablación de la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la invención es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa original NCIMB 42488. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables en los modelos de la enfermedad del cáncer a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos. Un derivado de la cepa NCIMB 42488 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42488.

[0046] Las referencias a células de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las

cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42488, y dichas células están abarcadas por la descripción. Así, en algunas realizaciones, la referencia a células de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488 se refiere solo a la cepa MRX518 depositada bajo NCIMB 42488 y no se refiere a una cepa bacteriana que no se depositó bajo NCIMB 42488. En algunas realizaciones, la referencia a células de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488 se refiere a células que tienen las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42488, pero que no son la cepa depositada bajo NCIMB 42488.

[0047] En realizaciones preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino.

Tratamiento del cáncer

[0048] En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. Los ejemplos demuestran que la administración de las composiciones de la invención puede conducir a una reducción en el crecimiento tumoral en varios modelos tumorales.

[0049] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en el tamaño del tumor o una reducción en el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor o reducir el crecimiento tumoral. Las composiciones de la invención pueden ser efectivas para reducir el tamaño del tumor o el crecimiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en pacientes con tumores sólidos. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir o prevenir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer. Las composiciones de la invención pueden tener un efecto sobre los sistemas inmune o inflamatorio, que tienen papeles centrales en la angiogénesis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de metástasis.

[0050] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar el cáncer de mama. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento tumoral o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de mama. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma mamario. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama en etapa IV.

[0051] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de pulmón. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar el cáncer de pulmón. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento tumoral o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de pulmón. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de pulmón.

[0052] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer de hígado. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar el cáncer de hígado. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento tumoral o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de hígado. En realizaciones preferidas, el cáncer es hepatoma (carcinoma hepatocelular).

[0053] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer de colon. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención tienen un efecto sobre las células de cáncer de colon y pueden ser eficaces para tratar el cáncer de colon. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento tumoral o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de colon. En realizaciones preferidas el cáncer es adenocarcinoma colorrectal.

[0054] En algunas realizaciones, el cáncer es del intestino. En algunas realizaciones, el cáncer es de una parte del cuerpo que no es el intestino. En algunas realizaciones, el cáncer no es cáncer del intestino. En algunas realizaciones, el cáncer no es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer no es cáncer del intestino delgado. En algunas realizaciones, el tratamiento o prevención ocurre en un sitio que no sea en el intestino. En algunas realizaciones, el tratamiento o prevención ocurre en el intestino y también en un sitio que no sea en el intestino.

[0055] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de carcinoma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar numerosos tipos de carcinoma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención de cáncer no inmunogénico. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar cánceres no inmunogénicos.

[0056] Los efectos terapéuticos de las composiciones de la invención sobre el cáncer pueden estar mediados por un

mecanismo pro-inflamatorio. Los ejemplos 2, 4 y 5 demuestran que la expresión de varias citoquinas proinflamatorias puede aumentar después de la administración de MRX518. La inflamación puede tener un efecto supresor del cáncer [20] y las citocinas proinflamatorias como el TNF α se están investigando como terapias contra el cáncer [21]. La regulación positiva de genes tales como TNF mostrada en los ejemplos puede indicar que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar el cáncer mediante un mecanismo similar. La regulación positiva de los ligandos CXCR3 (CXCL9, CXCL10) y los genes inducibles por IFN γ (IL-32) puede indicar que las composiciones de la invención provocan una respuesta de tipo IFN γ . IFN γ es un potente factor activador de los macrófagos que puede estimular la actividad tumoricida [22], y CXCL9 y CXCL10, por ejemplo, también tienen efectos contra el cáncer [23-25]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para promover la inflamación en el tratamiento del cáncer. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en la promoción de la inflamación Th1 en el tratamiento del cáncer. Las células Th1 producen IFN γ y tienen potentes efectos contra el cáncer [20]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de un cáncer en estadio temprano, tal como un cáncer que no se ha metastatizado, o un cáncer en etapa 0 o etapa 1. Promover la inflamación puede ser más eficaz contra los cánceres en etapa inicial [20]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para promover la inflamación para potenciar el efecto de un segundo agente anticancerígeno. En ciertas realizaciones, el tratamiento o prevención del cáncer comprende aumentar el nivel de expresión de una o más citoquinas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el tratamiento o prevención del cáncer comprende aumentar el nivel de expresión de uno o más de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , por ejemplo, IL-1 β e IL-6, IL-1 β y TNF- α , IL-6 y TNF- α o los tres de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Se sabe que los aumentos en los niveles de expresión de cualquiera de IL-1 β , IL-6 y TNF- α son indicativos de eficacia en el tratamiento del cáncer.

[0057] Ejemplos 4 y 5 demuestran que cuando una cepa bacteriana tal como se describe en el presente documento se usa en combinación con lipopolisacáridos (LPS), hay un aumento sinérgico de IL-1 β . Se sabe que el LPS provoca un efecto proinflamatorio. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el tratamiento o prevención comprende el uso de una cepa bacteriana como se describe en este documento en combinación con un agente que regula por incremento la IL-1 β . En ciertas realizaciones, el tratamiento o prevención comprende usar una cepa bacteriana como se describe aquí en combinación con LPS. Por consiguiente, una composición de la invención puede comprender adicionalmente un agente que regula por incremento IL-1 β . Por consiguiente, una composición de la invención puede comprender adicionalmente LPS.

[0058] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento de un paciente que ha recibido previamente quimioterapia. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de un paciente que no ha tolerado un tratamiento de quimioterapia. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente adecuadas para tales pacientes.

[0059] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para prevenir la recaída. Las composiciones de la invención pueden ser adecuadas para administración a largo plazo. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención del avance del cáncer.

[0060] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de carcinoma de pulmón de células no pequeñas. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento del carcinoma de pulmón de células pequeñas. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento del adenocarcinoma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de tumores glandulares, tumores carcinoides o carcinomas indiferenciados.

[0061] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de hepatoblastoma, colangiocarcinoma, cistadenocarcinoma colangiocelular o cáncer de hígado como resultado de una infección viral.

[0062] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento de carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ o carcinoma lobular invasivo.

[0063] En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención de leucemia aguda limfoblástica (ALL), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, tumor de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tallo encefálico, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, glioma, vía visual infantil e hipotalámica, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma de células de islote, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe

leucemias, linfomas, mesotelioma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paratiroideo, cáncer de próstata, adenoma pituitario, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, sarcoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer uterino.

5 **[0064]** Las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces cuando se utiliza en combinación con otros agentes terapéuticos. Los efectos inmunomoduladores de las composiciones de la invención pueden ser eficaces cuando se combinan con agentes anticáncer más directos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum* y un agente anticancerígeno. En realizaciones preferidas, el agente anticanceroso es un inhibidor del punto de control inmune, una inmunoterapia dirigida de anticuerpos, una terapia de células CAR-T, un virus oncolítico o un fármaco citostático. En realizaciones preferidas, la composición comprende un agente anticanceroso seleccionado del grupo que consiste en: Yervoy (ipilimumab, BMS); Keytruda (pembrolizumab, Merck); Opdivo (nivolumab, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Tremelimumab (AZ/MedImmune); CT-011 (pidilizumab, Cu-reTech); BMS-986015 (lirilumab, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (urelumab, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (varilumab, CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (indoximod, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); anti-VISTA (JnJ); Epcadostat (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Universidad de Pensilvania); MGA271 (Macrogenix); Emactuzumab (Roche/Genentech); Galunisertib (Eli Lilly); Ulocuplumab (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Baviximab (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Universidad de Mujeres de Ewha, Corea); Vemurafenib (Plexxikon); Dabrafenib (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center); Unituxin (dinutuximab, United Therapeutics Corporation); Blincyto (blinatumomab, Amgen); Cyramza (ramucirumab, Eli Lilly); Gazyva (obinutuzumab, Roche/Biogen); Kadcylla (ado-trastuzumab emtansine, Roche/Genentech); Perjeta (pertuzumab, Roche/Genentech); Adcetris (brentuximab vedotina, Takeda/Milenio); Arzerra (ofatumumab, GSK); Vectibix (panitumumab, Amgen); Avastina (bevacizumab, Roche/Genentech); Erbitux (cetuximab, BMS/Merck); Bexxar (tositumomab-I131, GSK); Zevalina (ibritumomab tiuxetan, Biogen); Campath (alemuzumab, Bayer); Mylotarg (gemtuzumab ozogamicina, Pfizer); Herceptina (trastuzumab, Roche/Genentech); Rituxan (rituximab, Genentech/Biogen); volociximab (Abbvie); Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); Elotuzumab (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Abylnx); Ozaralizumab (Abylnx); Actimab-C (Actinio); Actimab-P (Actinio); Milatuzumab-dox (Actinio); Emab-SN-38 (Actinio); Naptumomab estafenatox (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (samalizumab, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (adecatumumab, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); Rilotumumab (Amgen); Denosumab (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Moxetumomab pasudotox (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); Anetumab ravtansine (Bayer); vantiactumab (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Sibrotuzumab (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); β-701 (BioClin); BILB015 (Biogen); Obinutuzumab (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Necitumumab (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); patritumab (Daiichi Sankyo); tigatuzumab (Daiichi Sankyo); nimotuzumab (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); cixutumumab (Eli Lilly); Flanvotumab (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); Ramucirumab (Eli Lilly); Tabalumab (Eli Lilly); Zano limumab (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); catumaxomab (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (demcizumab, GSK); mapatumumab (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (Immuno-Gen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); milatuzumab-dox (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); Epratuzumab (Immunomedics); Clivatuzumab (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); Daratumumab (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (siltuximab, Janssen); KB004 (KaloBios); mogamulizumab (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871 (ecromeximab, Life Science); Sonepcizumab (Lpath); Margetuximab (Macrogenia); Enoblituzumab (Macrogenia); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); MK-0646 (dalotuzumab, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xmab5574 (Morphosys); BPC-1C (ensituximab, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (lucatumumab, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); vantiactumab (Oncomed/Bayer); CMC-544 (inotuzumab ozogamicina, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer);

PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (nesvacumab, Regeneron/Sanofi); REGN421 (enoticumab, Regenero/Sanofi); RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (pararsatumab), RG7160 (imgatuzumab), RG7159 (obintuzumab), RG7686, RG3638 (onartuzumab), RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi), SGN-LIV1A (lintuzumab, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotin, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ibritumomab tiuxetan (Espectro); MLN0264 (Takeda); ganitumab (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (trombogénico); VB4-845 (Viventia); Xmab2512 (Xencor); Xmab5574 (Xencor); nimotuzumab (YM Biosciences); Carlumab (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Cellestis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNAtrix); VCN-01 (VCN Biociencias); Colo-Adl (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Reolisina (oncología biotecnológica); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, ácido folínico, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, Zykadia (Novartis), Tafinlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Gilotrif (Boehringer Ingelheim), Tarceva (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), Veliparib (Abbvie), AZD9291 (AZ), Alectinib (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetesipib (Synta Pharma), Tergenpumatumucel-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), Tivantinib (ArQule); Cytosan (BMS); Oncovin (Eli Lilly); Adriamycin (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (Debiopharm); Taxotere (Sanofi); Nexavar (Bayer); IM- MU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Thermodox (Celsion); Cometriq (Exellxis); Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); y TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

[0065] En algunas realizaciones, la una o más cepas bacterianas de *Enterococcus gallinarum*, es/son el único agente terapéuticamente activo en una composición de la invención. En algunas realizaciones, la(s) cepa(s) bacteriana(s) en la composición es (son) el (los) único(s) agente(s) terapéuticamente activo(s) en una composición de la invención.

Modos de administración

[0066] Preferiblemente, las composiciones de la invención se administran al tracto gastrointestinal con el fin de permitir la entrega y/o colonización/o parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención. Generalmente, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero pueden administrarse por vía rectal, intranasal, o vía bucal o sublingual.

[0067] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse en forma de espuma, como una pulverización o un gel.

[0068] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en la forma de un aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (por ejemplo, suppicire, witepsol), glicero-gelatina, polietilenglicol o composición de glicerina en jabón.

[0069] En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra en el tracto gastrointestinal a través de un tubo, tal como un tubo nasogástrico, sonda orogástrica, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía percutánea endoscópica (PEG), o un puerto, como un puerto de pared de cofre que proporciona acceso al estómago, al yeyuno y a otros puertos de acceso adecuados.

[0070] Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o se pueden administrar de forma secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención deben administrarse diariamente.

[0071] En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento según la invención está acompañada por la evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si no se logra el suministro y/o colonización parcial o total con la cepa de la invención de modo que no se observe eficacia o el tratamiento puede cesar si el parto y/o colonización parcial o total es exitosa y se observa eficacia.

[0072] En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal preñado, por ejemplo un mamífero tal como un ser humano con el fin de reducir la probabilidad de desarrollar cáncer en su hijo en el útero y/o después de su nacimiento.

[0073] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido diagnosticado con cáncer, o que ha sido identificado como de riesgo de un cáncer. Las composiciones también pueden administrarse como una medida profiláctica para prevenir el desarrollo de cáncer en un paciente sano.

[0074] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido identificado como teniendo una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener colonización reducida o ausente por *Enterococcus gallinarum*.

5 [0075] Las composiciones de la invención se pueden administrar como un producto alimenticio, como un suplemento nutricional.

10 [0076] Generalmente, las composiciones de la invención son para el tratamiento de los seres humanos, a pesar de que se pueden utilizar para tratar animales incluyendo mamíferos monogástricos como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los animales. Si se administra a animales, se puede usar la sonda oral.

Composiciones

15 [0077] Generalmente, la composición de la invención comprende bacterias. En realizaciones preferidas de la invención, la composición se formula en forma liofilizada. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender gránulos o cápsulas de gelatina, por ejemplo cápsulas de gelatina dura, que comprende una cepa bacteriana de la invención.

20 [0078] Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento bien establecido y se dispone de orientación relevante en, por ejemplo, las referencias [26-28].

[0079] Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano vivo, activo.

25 [0080] En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha inactivado, por ejemplo, no ha sido inactivado por calor. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha eliminado, por ejemplo, no se ha eliminado por calor. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha atenuado, por ejemplo, no se ha atenuado por calor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención no se ha eliminado, inactivado y/o atenuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición de la invención es viable y capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino.

35 [0081] En algunas realizaciones, la composición comprende una mezcla de cepas bacterianas vivas y cepas bacterianas que se han matado.

40 [0082] En realizaciones preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir la administración de la cepa bacteriana en el intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la administración en la ubicación diana a través de, por ejemplo, ruptura con estímulos químicos o físicos tales como presión, actividad enzimática o desinsectación física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Se puede usar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación ejemplares incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción sobre superficies de soporte sólido, autoagregación por floculación o con agentes de reticulación, y contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. La orientación sobre la encapsulación que puede ser útil para preparar las composiciones de la invención está disponible en, por ejemplo, las referencias [29] y [30].

50 [0083] La composición se puede administrar por vía oral y puede estar en la forma de un comprimido, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque *Enterococcus gallinarum* son anaerobios. Otros ingredientes (tales como la vitamina C, por ejemplo) pueden incluirse como eliminadores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar el suministro y/o la colonización parcial o total y la supervivencia *in vivo*. Alternativamente, la composición probiótica de la invención puede administrarse por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, tal como leche o productos lácteos fermentados a base de suero, o como un producto farmacéutico.

55 [0084] La composición puede formularse como un probiótico.

60 [0085] Una composición de la invención incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana de la invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso sobre un paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar como resultado la administración y/o colonización parcial o total del intestino del paciente.

65 [0086] Una dosis diaria adecuada de las bacterias, por ejemplo para un ser humano adulto, puede ser de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU); por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} CFU; en otro ejemplo de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} CFU.

[0087] En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{11} CFU/g, respecto al peso de la composición; por ejemplo, de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{10} CFU/g. La dosis puede ser, por ejemplo, 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

5 **[0088]** Típicamente, un probiótico, tales como la composición de la invención, se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico es generalmente un carbohidrato no digerible tal como un oligo o polisacárido o un alcohol de azúcar, que no se degrada ni se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como inulina y transgalactooligosacáridos.

10 **[0089]** En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 30% en peso, respecto a la composición de peso total, (por ejemplo de 5 a 20% en peso). Los carbohidratos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: fructooligosacáridos (o FOS), fructooligosacáridos de cadena corta, inulina, isomaltosoligosacáridos, pectinas, xilooligosacáridos (o XOS), quitosano y oligosacáridos (o COS), beta-glucanos, almidones modificados y resistentes a la goma arábiga, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarrobo, avena y fibras cítricas. En un aspecto, los
15 prebióticos son los fructooligosacáridos de cadena corta (por simplicidad, mostrados a continuación como FOSs-cc); dichos FOSs-cc no son carbohidratos digeribles, generalmente obtenidos por la conversión del azúcar de remolacha e incluyendo una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

20 **[0090]** Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales excipientes adecuados se pueden encontrar en la referencia [31]. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [32]. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, celulosa de metilo, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol,
25 glicerol y agua. La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar con respecto a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante adecuado, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa,
30 edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

[0091] Las composiciones de la invención pueden formularse como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la invención, tal como en un suplemento nutricional. De forma similar, un producto alimenticio puede formularse para mejorar el
40 sabor de la composición de la invención o para hacer que la composición sea más atractiva de consumir al ser más similar a un artículo alimenticio común, en lugar de a una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición de la invención se formula como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier producto líquido o semi-sólido a base de leche o suero que tenga un contenido variable de grasa. El producto lácteo puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche desnatada, leche entera, leche recombinada de leche en polvo y suero de leche sin ningún procesamiento, o un producto procesado,
45 como yogur, leche cuajada, cuajada, leche agria, leche entera agria, leche de mantequilla y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye las bebidas lácteas, como las de suero de leche, leches fermentadas, leches condensadas, leches para bebés; leches con sabor, helado; alimentos que contienen leche como dulces.

50 **[0092]** En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen una sola cepa o especie bacteriana y no contienen otras cepas bacterianas o especies. Tales composiciones pueden comprender solo cantidades *mínimas* o biológicamente irrelevantes de otras cepas o especies bacterianas. Tales composiciones pueden ser un cultivo que está sustancialmente libre de otras especies de organismos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una o más cepas de la especie *Enterococcus gallinarum*,
55 que no contiene bacterias de ninguna otra especie o que comprende solo cantidades *mínimas* o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra especie para uso en terapia.

[0093] En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden más de una cepa o especie bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden más de una cepa de la misma especie (por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 cepas) y,
60 opcionalmente, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 cepas de la misma especie (por ejemplo, menos de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5), 4 o 3 cepas) y, opcionalmente, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 o 31-50 cepas de la misma especie y, opcionalmente, no contienen bacterias de ninguna otra especie. En algunas realizaciones, las composiciones de

la invención comprenden más de una especie del mismo género (por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 30, 35 o 40 especies), y, opcionalmente, no contienen bacterias de ningún otro género. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 especies del mismo género (por ejemplo, menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 especies) y, opcionalmente, no contienen bacterias de ningún otro género. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 o 31-50 especies del mismo género y, opcionalmente, no contienen bacterias de ningún otro género. La invención comprende cualquier combinación de lo anterior.

[0094] En algunas realizaciones, la composición comprende un consorcio microbiano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición comprende *Enterococcus gallinarum*, como parte de un consorcio microbiano. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la cepa bacteriana está presente en combinación con una o más (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20) otras cepas bacterianas de otros géneros con los que puede vivir simbióticamente *in vivo* en el intestino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición comprende *Enterococcus gallinarum*, en combinación con una cepa bacteriana de un género diferente. En algunas realizaciones, el consorcio microbiano comprende dos o más cepas bacterianas obtenidas de una muestra de heces de un solo organismo, por ejemplo, un ser humano. En algunas realizaciones, el consorcio microbiano no se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el consorcio microbiano comprende cepas bacterianas obtenidas de muestras de heces de al menos dos organismos diferentes. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son de la misma especie, por ejemplo, dos seres humanos diferentes, por ejemplo, dos bebés humanos diferentes. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son un humano infantil y un humano adulto. En algunas realizaciones, los dos organismos diferentes son un mamífero humano y no humano.

[0095] En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende, además, una cepa bacteriana que tiene la misma seguridad y las características de eficacia terapéutica como la cepa MRX518, pero que no es MRX518 depositada como NCIMB 42488, o que no es un *Enterococcus gallinarum*.

[0096] En algunas realizaciones en las que la composición de la invención comprende más de una cepa bacteriana, especie o género, las cepas bacterianas individuales, especies o géneros pueden ser para administración separada, simultánea o secuencial. Por ejemplo, la composición puede comprender todas las más de una cepa bacteriana, especie o género, o las cepas bacterianas, especies o géneros pueden almacenarse por separado y administrarse por separado, simultáneamente o secuencialmente. En algunas realizaciones, las más de una cepa bacteriana, especie o género se almacenan por separado pero se mezclan entre sí antes de su uso.

[0097] En algunas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención se obtiene a partir de heces infantiles humanos. En algunas realizaciones en las que la composición de la invención comprende más de una cepa bacteriana, todas las cepas bacterianas se obtienen de heces de bebés humanos o si están presentes otras cepas bacterianas, están presentes solo en cantidades *mínimas*. Las bacterias pueden haber sido cultivadas después de ser obtenidas de las heces de los bebés humanos y ser usadas en una composición de la invención.

[0098] Como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, la una o más cepas bacterianas de *Enterococcus gallinarum*, es el único agente terapéuticamente activo en una composición de la invención. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana en la composición es el único agente terapéuticamente activo en una composición de la invención.

[0099] Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden o no requerir la aprobación de comercialización.

[0100] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que dicha cepa bacteriana está liofilizada. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que dicha cepa bacteriana se seca por pulverización. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana está liofilizada o secada por pulverización y en la que está viva. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana está liofilizada o secada por pulverización y en la que es viable. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana está liofilizada o secada por pulverización y en la que es capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino. En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cepa bacteriana está liofilizada o secada por pulverización y en la que es viable y capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino.

[0101] En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada o secada por pulverización se reconstituye antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito en este documento.

[0102] Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0103] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa

bacteriana como se ha usado en la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno es cáncer de mama. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma mamario. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama en etapa IV.

[0104] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana como se usa en la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno es cáncer de pulmón. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de pulmón.

[0105] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana como se usa en la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno es cáncer de hígado. En realizaciones preferidas, el cáncer es hepatoma (carcinoma hepatocelular).

[0106] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno es cáncer de colon. En realizaciones preferidas, el cáncer es adenocarcinoma colorrectal.

[0107] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno es carcinoma.

[0108] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno es un cáncer no inmunogénico.

[0109] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, tumores glandulares, tumores carcinoides carcinomas indiferenciados.

[0110] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en hepatoblastoma, colangiocarcinoma, cistadenocarcinoma colangiocelular o cáncer de hígado que resulta de una infección viral.

[0111] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ o carcinoma lobular invasivo.

[0112] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que la necesita; y en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma basocelular, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, tumor óseo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco cerebral, cerebro tumor, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, glioma, vía visual infantil e hipotálamo, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, leucemias, linfocitos, mesotelioma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paratiroideo, cáncer de faringe, adenoma

hipofisario, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, sarcoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer uterino.

5 **[0113]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cantidad de la cepa bacteriana es de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo con respecto a un peso de la composición.

10 **[0114]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la composición se administra a una dosis de 1 g, 3 g, 5 g o 10 g.

[0115] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en administración oral, rectal, subcutánea, nasal, bucal y sublingual.

15 **[0116]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un vehículo seleccionado del grupo que consiste en lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol y sorbitol.

20 **[0117]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste en etanol, glicerol y agua.

25 **[0118]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorante de maíz, goma arábiga, tragacanto, alginato sódico, celulosa de carboximetilo, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

30 **[0119]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de entre un conservante, un antioxidante y un estabilizante.

[0120] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un conservante seleccionado del grupo que consiste en benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

35 **[0121]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que cuando la composición se almacena en un recipiente sellado a aproximadamente 4°C o aproximadamente a 25°C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene 50% de humedad relativa, a al menos el 80% de la cepa bacteriana, medida en unidades formadoras de colonias, permanece después de un período de al menos aproximadamente: 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

40 **[0122]** En algunas realizaciones, la composición de la invención se proporciona en un recipiente sellado que comprende una composición como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el contenedor sellado es una bolsita o botella. En algunas realizaciones, la composición de la invención se proporciona en una jeringa que comprende una composición como se describe en este documento.

45 **[0123]** La composición de la presente invención puede, en algunas realizaciones, proporcionarse como una formulación farmacéutica. Por ejemplo, la composición puede proporcionarse como una tableta o cápsula. En algunas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina ("cápsula de gel").

50 **[0124]** En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran por vía oral. La administración oral puede implicar la deglución, de modo que el compuesto ingrese al tracto gastrointestinal y/o la administración bucal, lingual o sublingual por la cual el compuesto ingresa al torrente sanguíneo directamente desde la boca.

55 **[0125]** Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen tapones sólidos, micropartículas sólidas, semisólidos y líquidos (incluyendo múltiples fases o sistemas dispersos), tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi- o nanopartículas, líquidos (por ejemplo, soluciones acuosas), emulsiones o polvos; pastillas (incluidas las llenas de líquido); masticas; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; aerosoles; y parches bucales/mucoadhesivos.

60 **[0126]** En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación entérica, es decir, una formulación gastrorresistente (por ejemplo, resistente al pH gástrico) que es adecuada para la administración de la composición de la invención al intestino mediante administración oral. Las formulaciones entéricas pueden ser particularmente útiles cuando la bacteria u otro componente de la composición es sensible a los ácidos, por ejemplo propenso a la degradación bajo condiciones gástricas.

65 **[0127]** En algunas realizaciones, la formulación entérica comprende un recubrimiento entérico. En algunas

realizaciones, la formulación es una forma de dosificación entérica recubierta. Por ejemplo, la formulación puede ser una tableta con recubrimiento entérico o una cápsula con recubrimiento entérico, o similar. El recubrimiento entérico puede ser un revestimiento entérico convencional, por ejemplo, un revestimiento convencional para una tableta, cápsula o similar para administración oral. La formulación puede comprender un recubrimiento de película, por ejemplo, una capa de película delgada de un polímero entérico, por ejemplo, un polímero insoluble en ácido.

[0128] En algunas realizaciones, la formulación entérica es intrínsecamente entérica, por ejemplo, gastroresistente sin la necesidad de un recubrimiento entérico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la formulación es una formulación entérica que no comprende un recubrimiento entérico. En algunas realizaciones, la formulación es una cápsula hecha de un material termogelificante. En algunas realizaciones, el material termogelificante es un material celulósico, tal como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En algunas realizaciones, la cápsula comprende una cubierta que no contiene ningún polímero formador de película. En algunas realizaciones, la cápsula comprende una cubierta y la cubierta comprende hidroxipropilmetilcelulosa y no comprende ningún polímero formador de película (por ejemplo, véase [33]). En algunas realizaciones, la formulación es una cápsula intrínsecamente entérica (por ejemplo, Vcaps® de Capsugel).

[0129] En algunas realizaciones, la formulación es una cápsula blanda. Las cápsulas blandas son cápsulas que pueden, debido a las adiciones de suavizantes, tales como, por ejemplo, glicerol, sorbitol, maltitol y polietilenglicoles, presentes en la cubierta de la cápsula, tener una cierta elasticidad y suavidad. Las cápsulas blandas pueden producirse, por ejemplo, sobre la base de gelatina o almidón. Las cápsulas blandas a base de gelatina están disponibles comercialmente de varios proveedores. Dependiendo del método de administración, tal como, por ejemplo, por vía oral o rectal, las cápsulas blandas pueden tener diversas formas, pueden ser, por ejemplo, redondas, ovaladas, oblongas o con forma de torpedo. Las cápsulas blandas se pueden producir mediante procesos convencionales, tales como, por ejemplo, mediante el proceso Scherer, el proceso Accogel o el proceso de formación de gotas o soplado.

Métodos de cultivo

[0130] Las cepas bacterianas para uso en la presente invención pueden ser cultivadas utilizando técnicas estándar de microbiología como se detalla en, por ejemplo, las referencias [34-36].

[0131] El medio sólido o líquido usado para cultivo puede ser agar YCFA o medio YCFA. El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): Casitona (1,0 g), extracto de levadura (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteína (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄·7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 mg), cobalamina (1 mg), ácido *p*-aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) y piridoxamina (15 µg).

Cepas bacterianas para su uso en composiciones de vacunas

[0132] Los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la invención son útiles para tratar o prevenir el cáncer. Es probable que esto sea el resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen sobre el sistema inmune del huésped. Por lo tanto, las composiciones de la invención también pueden ser útiles para prevenir el cáncer, cuando se administran como composiciones de vacuna. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención son viables. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención son capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino. En otras ciertas formas de realización, las cepas bacterianas de la invención pueden eliminarse, inactivarse o atenuarse. En ciertas de tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración mediante inyección, tal como a través de inyección subcutánea.

General

[0133] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, las referencias [37] y [38-44], etc.

[0134] El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo. una composición que comprende "X" puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

[0135] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x ± 10%.

[0136] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo. una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

[0137] Las referencias a una identidad de secuencia porcentual entre dos secuencias de nucleótidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se puede determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. [45]. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman utilizando una búsqueda de hueco afín con una penalización abierta de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se describe en la ref. [46].

[0138] A menos que se establezca específicamente, un proceso o método que comprende numerosos pasos puede comprender pasos adicionales al comienzo o al final del método, o puede comprender pasos intermedios adicionales. Además, los pasos se pueden combinar, omitir o realizar en un orden alternativo, si corresponde.

[0139] Varias realizaciones de la invención se describen en este documento. Se apreciará que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones destacadas en este documento como adecuadas, típicas o preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando sean mutuamente excluyentes).

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

Ejemplo 1 - Eficacia de inóculos bacterianos en modelos de cáncer de ratón

Resumen

[0140] Este estudio probó la eficacia de composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención en cuatro modelos tumorales.

Materiales

[0141] **Sustancia de prueba** - cepa bacteriana #MRX518.

[0142] **Sustancia de referencia** - Anticuerpo anti-CTLA-4 (clon: 9H10, catálogo: BE0131, isotipo: Hámster sirio IgG1, Bioxcell).

[0143] **Vehículos de ensayo y sustancias de referencia** - Medio de cultivo bacteriano (extracto de levadura, casitona, medio de ácido graso (YCFA)). Cada día de inyección a ratones, el anticuerpo se diluyó con PBS (ref: BE14-516F, Lonza, Francia).

[0144] **Tratamiento de dosis** - Bacterias: 2×10^8 en 200 μ L. El α -CTLA-4 se inyectó a 10 mg/kg/inj. Se administró anti-CTLA-4 a un volumen de dosis de 10 mL/kg/adm (es decir, para un ratón que pesa 20 g, se administrarán 200 μ L de sustancia de prueba) de acuerdo con el peso corporal más reciente de los ratones.

[0145] **Vías de administración:** el inóculo bacteriano se administró por sonda oral (por vía oral, PO) a través de una cánula. Las cánulas fueron descontaminadas todos los días. Se inyectó anti-CTLA-4 en la cavidad peritoneal de los ratones (intraperitonealmente, IP).

[0146] **Condiciones de cultivo de la cepa bacteriana** - Las condiciones de cultivo para la cepa bacteriana fueron las siguientes:

- Pipetear 10 mL de YCFA (de los frascos de laboratorio de E&O preparados de 10 mL) en tubos Hungate
- Sellar los tubos y purgar con CO₂ usando una jeringa de entrada y sistema de escape
- Autoclavar los tubos Hungate
- Al enfriarse, inocular los tubos Hungate con 1 mL de las reservas de glicerol
- Colocar los tubos en una incubadora estática a 37°C durante aproximadamente 16 horas.
- Al día siguiente, tomar 1 mL de este subcultivo e inocular 10 mL de YCFA (tubos Hungate precalentados y enjuagados de nuevo, todos por duplicado)
- Colocarlos en una incubadora estática a 37°C durante 5 a 6 h

Línea celular de cáncer y condiciones de cultivo -

[0147] Las líneas celulares que se utilizaron se detallan en la tabla a continuación:

Línea celular	Tipo	Tensión del ratón	Origen
EMT-6	Carcinoma de mama	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	Carcinoma de pulmón	C57BL/6	ATCC CRL1642
Hepa1-6	Carcinoma hepatocelular	C57BL/6	INNOVACIÓN DE IPSEN

[0148] La línea celular EMT-6 se estableció a partir de un carcinoma mamario murino trasplantable que surgió en un Ratón BALB/cCRGL después de la implantación de un nódulo alveolar mamario hiperplásico [47].

[0149] La línea celular (LLC1) LL/2 se estableció a partir del pulmón de un ratón C57BL que lleva un tumor resultante de una implantación de carcinoma de pulmón de Lewis primario [48].

[0150] La línea celular Hepa 1-6 es un derivado del hepatoma de ratón BW7756 que surgió en un ratón C57/L [49].

[0151] **Condiciones de cultivo celular** - Todas las líneas celulares se cultivaron en monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire). El medio de cultivo y el suplemento se indican en la tabla a continuación:

Línea celular	Medio cultural	Suplemento
EMT6	RPMI 1640 que contiene L-glutamina de 2 mM (ref: BE12-702F, Lonza)	10% de suero bovino fetal (ref: # 3302, Lonza)
LL/2 (LLC1)	RPMI 1640 que contiene L-glutamina de 2 mM (ref: BE12-702F, Lonza)	10% de suero bovino fetal (ref: # 3302, Lonza)
Hepa1-6	DMEM (ref: 11960-044, Gibco)	10% suero bovino fetal (ref: # 3302, Lonza) 2mM L-Glutamina penicilina-estreptomina (Sigma G-6784)

[0152] Para uso experimental, las células tumorales adherentes se separaron del matraz de cultivo mediante un tratamiento de 5 minutos con tripsina-verseno (ref: BE17-161E, Lonza), en medio de Hanks sin calcio ni magnesio (ref: BE10-543F, Lonza) y neutralizado mediante la adición de medio de cultivo completo. Las células se contaron en un hemocitómetro y su viabilidad se evaluará mediante ensayo de exclusión de azul tripán al 0,25%.

Uso de animales -

[0153] Los ratones hembra sanos Balb/C (BALB/cByJ), de peso y la edad coincidentes, se obtuvieron de Charles River (L'Arbresles) para los experimentos de modelo EMT6.

[0154] Se obtuvieron ratones C57BL/6 (C57BL16J) hembra sanos, de peso y edad coincidentes, de CHARLES RIVER (L'Arbresles) para los experimentos del modelo LL/2 (LLC1) y Hepa1-6.

[0155] Los animales se mantuvieron en estado de salud SPF según las directrices de FELASA, y se siguieron los procedimientos experimentales y de alojamiento de animales de acuerdo con los Reglamentos francés y europeo y la Guía NRC para el cuidado y uso de animales de laboratorio [50,51]. Los animales se mantuvieron en habitaciones de viviendas en condiciones ambientales controladas: Temperatura: 22 ± 2°C, humedad 55 ± 10%, Fotoperiodo (12 horas de luz/12 h oscuridad), aire filtrado por HEPA, 15 cambios de aire por hora sin recirculación. Los recintos para animales contaron con espacio estéril y adecuado con material de cama, alimentos y agua, enriquecimiento ambiental y social (alojamiento grupal) como se describe: jaulas de 900 cm² (ref: verde, Tecniplast) en rejillas ventiladas, ropa de cama Epicea (SAFE), 10 kGy dieta irradiada (A04-10, SAFE), alimento completo para roedores inmunocompetentes - R/MH Extrudate, agua de botellas de agua.

Diseño experimental y tratamientos

Actividad antitumoral, modelo EMT6

[0156] Programa de tratamiento: el inicio de la primera dosificación se consideró como D0. En D0, ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en grupos de 9/8 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibieron vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales EMT-6 como se describe a continuación. En D24, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos de anticuerpos anti-CTLA-4.

[0157] El programa de tratamiento se resume en la tabla a continuación:

Grupo	Nº animales	Tratamiento	Dosis	Ruta	Programa de tratamiento
1	8	Sin tratamiento	-	-	-
2	8	Vehículo (medios)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Cepa bacteriana # 1 (MRX518)	2x10 ⁸ bacterias	PO	Q1Dx42
4	8	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

El control de los animales se realizó como se describe a continuación.

[0158] La inducción de tumores EMT6 en animales - En D14, los tumores fueron inducidos por inyección subcutánea de 1x10⁶ EMT- 6 células en 200 µL de RPMI 1640 en el flanco derecho de los ratones.

[0159] Eutanasia - cada ratón se sacrificó cuando alcanzó un punto final humano tal como se describe a continuación, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

Actividad antitumoral, modelo LL/2 (LLC1)

[0160] Programa de tratamiento: el inicio de la primera dosificación se consideró como D0. En D0, ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en 7 grupos de 9/8 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibirán vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales LL/2 como se describe a continuación. En D27, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos contra CTLA-4.

[0161] El programa de tratamiento se resume en la tabla a continuación:

Grupo	Nº animales	Tratamiento	Dosis	Ruta	Programa de tratamiento
1	8	Sin tratamiento	-	-	-
2	8	Vehículo (medios)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Cepa bacteriana # 1 (MRX518)	2x10 ⁸ bacterias	PO	Q1Dx42
4	8	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

El control de los animales se realizó como se describe a continuación.

[0162] Inducción de tumores LL/2 (LLC1) en animales - En D14, los tumores se indujeron mediante inyección subcutánea de 1x10⁶ células LL/2 (LLC1) en 200 µL de RPMI 1640 en el flanco derecho de ratones.

[0163] Eutanasia - Cada ratón fue sometido a eutanasia cuando alcanzó un punto final humano como se describe más adelante, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

Actividad antitumoral, modelo Hepa1-6

[0164] Programa de tratamiento: el inicio de la primera dosificación se consideró como D0. En D0, ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en 7 grupos de 9 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibieron vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones se injertaron con células tumorales Hepa 1-6 como se describe a continuación. En D16, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos contra CTLA-4.

[0165] El programa de tratamiento se resume en la tabla a continuación:

Grupo	No animales	Tratamiento	Dosis	Ruta	Programa de tratamiento
1	9	Sin tratamiento	-	-	-
2	9	Vehículo (medios)	-	PO	Q1Dx42
6	9	Cepa bacteriana # 4 (MRX518)	2x10 ⁸ bacterias	PO	Q1Dx42
7	9	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

El control de los animales se realizó como se describe a continuación.

[0166] Inducción ortotópica de las células tumorales Hepa 1-6 en animales mediante la inyección intraesplénica - En D14, un millón (1×10^6) de células tumorales Hepa 1-6 en 50 μ L de RPMI 1640 se trasplantaron a través de inyección intraesplénica en los ratones. Brevemente, se realizó una pequeña incisión en el flanco subcostal izquierdo y el bazo se exteriorizó. El bazo se expuso sobre una almohadilla de gasa estéril, y se inyectó bajo control visual con la suspensión de células con una aguja de calibre 27. Después de la inoculación de la célula, se extirpó el bazo.

[0167] Eutanasia: cada ratón se sacrificó cuando alcanzó un punto final humano tal como se describe en la sección siguiente, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

[0168] La evaluación de la carga tumoral en la eutanasia - En el momento de la terminación, se recogieron y pesaron los hígados.

Monitoreo Animal

[0169] Monitorización clínica - La longitud y anchura del tumor se midió dos veces a la semana con calibradores y el volumen del tumor se estimó mediante esta fórmula [52]:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{\text{anchura}^2 \times \text{longitud}}{2}$$

[0170] Puntos finales humanos [53]: signos de dolor, sufrimiento o angustia: postura de dolor, máscara de dolor, comportamiento; Tumor que excede el 10% del peso corporal normal, pero que no excede de los 2000 mm^3 ; Tumores que interfieren con la ambulación o la nutrición; Tumor ulcerado o erosión tisular; 20% de pérdida de peso corporal restante durante 3 días consecutivos; Pobre condición corporal, emaciación, caquexia, deshidratación; Ausencia prolongada de respuestas voluntarias a estímulos externos; Respiración rápida y trabajosa, anemia, hemorragia significativa; Signos neurológicos: círculos, convulsiones, parálisis; Disminución sostenida de la temperatura corporal; Distensión abdominal.

[0171] Anestesia: Se usó anestesia con gas de isoflurano para todos los procedimientos: cirugía o inoculación de tumores, inyecciones intravenosas, extracción de sangre. La anestesia con ketamina y xilazina se usó para el procedimiento quirúrgico de estereotaxia.

[0172] Analgesia - Carprofeno o protocolo de analgesia de carprofeno/buprenorfina multimodal se adaptaron a la gravedad del procedimiento quirúrgico. Se proporcionó atención no farmacológica para todos los procedimientos dolorosos. Además, se proporcionaron cuidados farmacológicos que no interferían con los estudios (tema de tratamiento) a recomendación del veterinario a cargo.

[0173] Eutanasia - Eutanasia de los animales se realizó mediante sobre-dosificación de anestesia de gas (isoflurano), seguido por dislocación cervical o exanguinación.

Resultados

Actividad antitumoral, modelo EMT6

[0174] Los resultados se muestran en la Figura 1. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invención llevó a una clara reducción en el volumen tumoral con respecto tanto a los controles negativos. El control positivo también condujo a una reducción en el volumen del tumor, como era de esperar.

Actividad antitumoral, modelo LL/2 (LLC1)

[0175] Los resultados se muestran en la Figura 2. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invención condujo a una clara reducción en el volumen del tumor con respecto a ambos controles negativos.

Actividad antitumoral, modelo Hepa1-6

[0176] Los resultados se muestran en la Figura 3. El control negativo no tratado no aparece como sería de esperar, ya que el peso del hígado fue menor en este grupo que en los otros grupos. Sin embargo, tanto el control negativo del vehículo como los grupos de control positivo aparecen como se esperaría, porque los ratones tratados con vehículo solo tenían hígados mayores que los ratones tratados con anticuerpos anti CTLA4, lo que refleja una mayor carga tumoral en el grupo de control negativo del vehículo. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invención condujo a una clara reducción en el peso del hígado (y por lo tanto, la carga tumoral) en relación con los ratones en el grupo de control negativo del vehículo.

[0177] Estos datos indican que la cepa MRX518 puede ser útil para tratar o prevenir el cáncer, y en particular para reducir el volumen tumoral en cánceres de mama, pulmón e hígado.

Ejemplo 2 - Análisis de genes de PCR

5 [0178] Un cultivo puro de bacterias MRX518 se estudió en un análisis de genes PCR. Hubo dos brazos para el experimento: 1) se cocultivó MRX518 con células colónicas humanas (CaCo2) para investigar los efectos de las bacterias en el huésped, y 2) se cocultivó MRX518 en células CaCo2 que se estimularon con IL1 para imitar el efecto de las bacterias en un entorno inflamatorio. Los efectos en ambos escenarios se evaluaron a través del análisis de expresión génica. Los resultados se muestran a continuación:

Gene	Cambio de veces	Función
CXCL3	28412,73	Ligando CXCR2,
CXCL2	135,42	Ligando CXCR2, 90% de homología con CXCL1.
CXCL9	34,76	Ligando CXCR3, principalmente pensado como quimioatrayente de células Th1 (inducible por IFN-g)
IL8	31,81	Citoquina, quimioatrayente (especialmente neutrófilos), muchos receptores, incluidos CXCR1 y CXCR2 /
CXCL1	16,48	Ligando CXCR2, estimula la proliferación celular, así como la migración, la sobreexpresión es neuroprotectora en EAE.
CD40	14,33	Molécula coestimulante, ruta de activación de DC dependiente de células T.
TNF	13,50	Citoquina proinflamatoria importante
IL17C	12,18	Promueve la respuesta antibacteriana de epitelio, sinérgica con IL-22,
CXCL10	10,66	Cerrar la homología con CXCL9, ¿piensa también en el ligando CXCR3?
HSPA1B	10,19	Proteína de choque térmico
NFKBIA	8,87	Señalización NFkB; PI3K
JUN	7,61	Respuesta antibacteriana; Señalización GPCR
TNFAIP3	6,63	Señalización TNF
DUSP1	6,36	Fosfatasa antiinflamatoria, inactiva las MAPK
JUNB	5,36	Factor de transcripción, señalización JAK-STAT
BIRC3	4,86	Uniones adherentes, uniones estrechas
DUSP2	4,59	Antiinflamatorio, inactiva MAPK.
IL32	4,29	Citoquina proinflamatoria, inducida por IFN-g, IL-18
DUSP5	3,12	Antiinflamatorio, inactiva MAPK
FOS	3,03	Factores de transcripción, señalización de TLR, forma parte de AP-1
GADD45B	2,89	Crecimiento y proliferación celular
CLDN4	2,61	Juntas apretadas
ADM	2,57	Señalización NFkB
KLF10	2,49	Célula de detención, señalización de TGF-b.
DEFB4A	-2,34	Péptido antimicrobiano
APBA1	-2,53	Señalización
IGFBP1	-2,72	Vía de señalización
IL28B	-2,73	IFN-lambda, defensa inmune antiviral,
IL10	-3,38	Citoquina antiinflamatoria
NR4A1	-5,57	Receptor nuclear, antiinflamatorio, regulador de la proliferación de células T. Diferenciación de células T auxiliares
NOD2	-14,98	PRR, activador de inflammasoma, promueve la autofagia
INOS	-26,88	Proinflamatorio, generador de óxido nítrico

[0179] Estos datos parecen mostrar dos firmas de expresión génica: ligandos CXCR1/2 (CXCL3, CXCL2, CXCL1, IL-8), que se asocian con la migración celular proinflamatoria, y ligandos CXCR3 (CXCL9, CXCL10), que es más específicamente indicativo de respuestas de tipo IFN-γ, también respaldado por IL-32, que es inducible por IPN-γ.

Ejemplo 3 - Prueba de estabilidad

[0180] Una composición descrita en el presente documento que contiene al menos una cepa bacteriana descrita en el presente documento se almacena en un recipiente sellado a 25°C o 4°C y el recipiente se coloca en una atmósfera con 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la cepa bacteriana deberá permanecer medido en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

Ejemplo 4: producción de citocinas en células dendríticas inmaduras inducidas por MRX518 en comparación con MRX518 + LPS

Resumen

[0181] Este estudio sometió a prueba el efecto de la cepa bacteriana MRX518 sola y en combinación con lipopolisacárido (LPS) en la producción de citocinas en células dendríticas inmaduras.

[0182] Una población de monocitos se aisló a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Las células monocíticas se diferenciaron posteriormente en células dendríticas inmaduras. Las células dendríticas inmaduras se sembraron a 200,000 células/pocillo y se incubaron con MRX518 a una concentración final de 10^7 /ml, con la adición opcional de LPS a una concentración final de 100 ng/ml. El control negativo implicó incubar las células con medio RPMI solo y los controles positivos incubaron las células con LPS a una concentración final de 100 ng/ml. El contenido de citocinas de las células se analizó a continuación.

Resultados

[0183] Los resultados de estos experimentos pueden verse en las Figuras 4a-d. La adición de MRX518 solo conduce a un aumento sustancial en el nivel de citocinas IL-6 y TNF- α en comparación con el control negativo (Figura 4a y c). La adición de LPS (control positivo) conduce a un aumento en el nivel de IL-6 y TNF- α en comparación con el control negativo, pero no IL-1 β (Figura 4b). Una combinación de MRX518 y LPS condujo a un aumento sinérgico en el nivel de IL-1 β producido (Figura 4d).

Conclusión

[0184] MRX518 tiene la capacidad de inducir una mayor producción de IL-6 y citocina TNF- α en células dendríticas inmaduras. La combinación de LPS y MRX518 puede aumentar los niveles de citoquinas IL-1 β en células dendríticas inmaduras. Estos datos indican que MRX518 solo o en combinación con LPS puede aumentar las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que promueve la inflamación que puede suprimir el cáncer. El tratamiento con MRX518 solo o en combinación con c inducen citocinas que pueden limitar el crecimiento tumoral.

Ejemplo 5: producción de citocinas en células THP-1 inducidas por MRX518 en comparación con MRX518 + LPS

Resumen

[0185] Este estudio sometió a prueba el efecto de la cepa bacteriana MRX518 sola y en combinación con LPS en la producción de citocinas en células THP-1, una línea celular modelo para monocitos y macrófagos6

[0186] Las células THF-1 se diferenciaron en medio M0 durante 48 h con 5 ng/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Estas células se incubaron posteriormente con MRX518 a una concentración final de 10^9 /ml, con o sin la adición de LPS a una concentración final de 100 ng/ml. Las bacterias se lavaron y las células se dejaron incubar en condiciones de crecimiento normales durante 24 h. Las células se centrifugaron y el sobrenadante resultante se analizó para determinar el contenido de citoquinas.

Resultados

[0187] Los resultados de estos experimentos se pueden ver en las Figuras 5a-c. La adición de MRX518 sin LPS conduce a un aumento en los niveles de citoquinas de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en comparación con los controles de sedimentos bacterianos y no bacterianos. La adición de LPS y MRX518 conduce a un aumento sinérgico en la producción de citoquinas.

Conclusión

[0188] MRX518 tiene la capacidad de inducir la producción de citocinas en células THP-1, que pueden aumentar sinérgicamente con la adición de LPS. Estos datos indican que MRX518 solo o en combinación con LPS puede aumentar las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que promueve la inflamación que puede suprimir el cáncer. El tratamiento con MRX518 solo o en combinación puede inducir citoquinas que pueden limitar el crecimiento tumoral.

ES 2 662 617 T3

Secuencias

[0189]

5 SEQ ID NO: 1 (gen de ARNr 16S de *Enterococcus gallinarum* - AF039900)

```
1 taatacatgc aagtcgaacg ctttttcttt caccggagct tgctccaccg aaagaaaaag
61 agtggcgaac gggtgagtaa cacgtgggta acctgcccat cagaagggga taacacttgg
121 aaacaggtgc taataccgta taacactatt ttccgcatgg aagaaagtgg aaagggcgtt
181 ttgcgtcact gatggatgga cccgcggtgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc
241 aaggccacga tgcataccg acctgagagg gtgatcggcc acactgggac tgagacacgg
301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc aatggacgaa agtctgaccg
361 agcaacgccg cgtgagtgaa gaaggtttc ggatcgtaaa actctgttgt tagagaagaa
421 caaggatgag agtagaacgt tcatcccttg acggtatcta accagaaagc cacggctaac
481 tacgtgccag cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt
541 aaagcgagcg caggcggttt ottaagctcg atgtgaaagc ccccggtca accggggagg
601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggagag tgggaattcca tgtgtagcgg
661 tgaaatgcgt agatatatgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg gtctgtaact
721 gacgctgagg ctcgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc
781 gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgctgca gcaaacgcat
841 taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc
901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc
961 ttgacatcct ttgaccactc tagagataga gottcccctt cgggggcaaa gtgacaggtg
1021 gtgcatggtt gtgctcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca
1081 acccttattg ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta gcgagactgc cggtgacaaa
1141 ccggaggaag gtgggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg
1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttgcga agtcgcgagg ctaagctaata ctcttaaagc
1261 ttctctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagccggaat cgctagtaat

1321 ccgggatcag cacgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac
1381 cagcagagtt tgtaacaccc gaagtccgtg aggtaacctt tttggagcca gccgcctaag
1441 gtgggataga tgattgggt gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcccgtgg
1501 atcacc
```

SEQ ID NO: 2 (secuencia de ARNr de consenso 16S para la cepa MRX518 de *Enterococcus gallinarum*)

10

TGCTATACATGCAGTCGAACGCTTTTTCTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGAAAAGAAAAGAGTGGCGAACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTTTTC
 CGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTTCGCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
 ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGAAAG
 GTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAGAACGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
 GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG
 GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATATATGGAGGAACACCAGT
 GGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAACGATCAGTGCTAAGTGTTCGAGGCTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACCCATTAAGCA
 CTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
 GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTT
 CGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCTTATTTAGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACCTAGCGAGACTGCCGGTACAAAACCGGAGGAAGGTGG
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAA
 GTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
 GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTG

REFERENCIAS

[0190]

[1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
 [2] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
 5 [3] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
 [4] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
 [5] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
 [6] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
 [7] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
 10 [8] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
 [9] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
 [10] WO 2013/050792
 [11] WO 03/046580
 [12] WO 2013/008039
 15 [13] WO 2014/167338
 [14] Goldin y Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100. [15] Azad et al. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
 [16] Strickertsson et al. (2014) *Genes.* 5(3): 726-738.
 [17] Collins et al. (1984) *Int J Syst Evol Microbiol.* 34: 220-223.
 [18] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
 20 [19] Srutková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods,* 87(1):10-6. [20] Haabeth et al. (2012) *OncolImmunology*
 1(1):1146-1152. [21] Lejeune et al. (2006) *Cancer Immun.* 6:6
 [22] Pace et al. (1983) *PNAS.* 80:8782-6.
 [23] Sgadari et al. (1996) *PNAS.* 93:13791-6.
 [24] Arenberg et al. (1996) *J. Exp. Med.* 184:981-92.
 25 [25] Sgadari et al. (1997) *Blood.* 89:2635-43.
 [26] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9-24.
 [27] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,* ed. by Day and McLellan, Humana Press. [28] Leslie et al.
 (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
 [29] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
 30 [30] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
 [31] *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* 2ª Edición, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
 [32] *Remington's Pharmaceutical Sciences,* Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [33] US 2016/0067188
 [34] *Handbook of Microbiological Media,* 4ª Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 35 [35] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
 [36] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.

- [37] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 [38] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
 [39] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 5 [40] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 [41] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 [42] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [43] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª Edición (Current Protocols).
 10 [44] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [45] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
 [46] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
 [47] Rockwell et al., (1972) J Natl Cancer Inst. 49:735-49.
 [48] Bertram y Janik (1980) Cancer Lett. 11:63-73.
 15 [49] Darlington (1987) Meth Enzymol. 151:19-38.
 [50] Principe d'ethique de l'experimentation animale, Directiva n°2010/63 CEE 22 septiembre 2010, Décret n°2013-118 1 febrero 2013.
 [51] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8ª Edición. The National Academies Press; 2011
 20 [52] Simpson-Herren and Lloyd (1970) Cancer Chemother Rep. 54:143-74.
 [53] Workman et al. (2010) Br. J. Cancer. 102:1555-77.

LISTADO DE SECUENCIAS

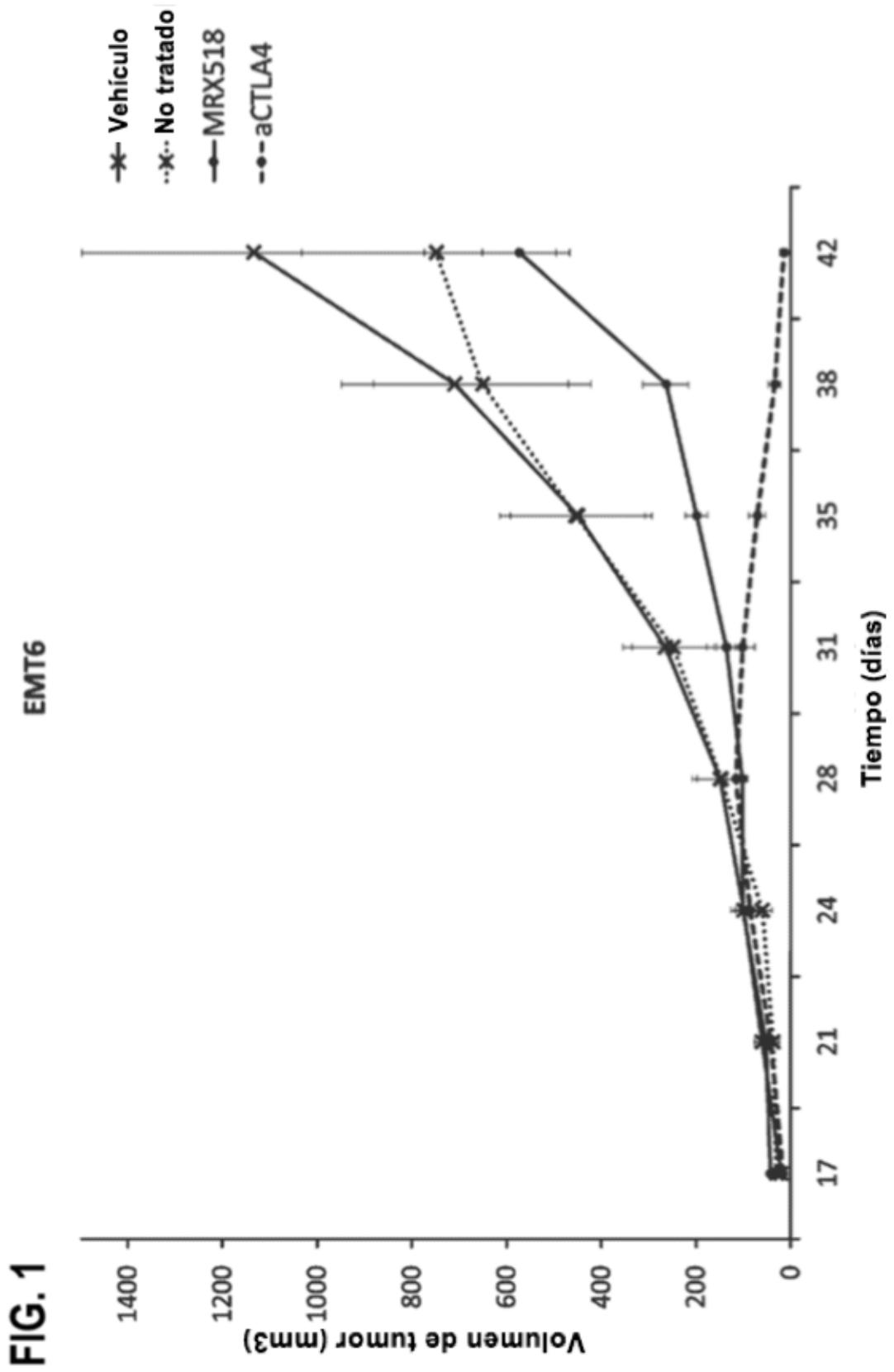
- 25 **[0191]**
 <110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED
 <120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS
 30 <130> P067592
 <150> GB 1520502.4
 <150> 2016-11-20
 35 <150> GB 1604924.9
 <150> 2016-03-23
 <160> 2
 40 <170> SeqWin2010, versión 1.0
 <210> 1
 <211> 1506
 <212> ADN
 45 <213> Enterococcus gallinarum
 <400> 1

ES 2 662 617 T3

	taatacatgc	aagtcgaacg	ctttttcttt	caccggagct	tgctccaccg	aaagaaaaag	60
	agtggcgaac	gggtgagtaa	cacgtgggta	acctgcccat	cagaagggga	taacacttgg	120
	aaacaggtgc	taataccgta	taacactatt	ttccgcatgg	aagaaagttg	aaagggcgtt	180
5	ttgcgtcact	gatggatgga	cccgcggtgc	attagctagt	tggtgaggta	acggctcacc	240
	aaggccacga	tgcatagccg	acctgagagg	gtgatcggcc	acactgggac	tgagacacgg	300
	cccagactcc	tacgggaggg	agcagtaggg	aatcttcggc	aatggacgaa	agtctgaccg	360
	agcaacgccg	cgtgagtga	gaaggttttc	ggatcgtaaa	actctgttgt	tagagaagaa	420
	caaggatgag	agtagaacgt	tcatcccttg	acggtatcta	accagaaagc	cacggctaac	480
10	tacgtgccag	cagcccggtt	aatacgtagg	tggcaagcgt	tgtccggatt	tattgggctg	540
	aaagcgagcg	caggcggttt	cttaagtctg	atgtgaaagc	ccccggctca	accggggagg	600
	gtcattggaa	actgggagac	ttgagtgcag	aagaggagag	tggaattcca	tgtgtagcgg	660
	tgaaatgcgt	agatataatg	aggaacacca	gtggcgaagg	cggctctctg	gtctgtaact	720
	gacgctgagg	ctcgaagcgg	tggggagcga	acaggattag	ataccctggt	agtccacgcc	780
15	gtaaacgatg	agtgctaagt	gttggagggt	ttccgccctt	cagtgtctga	gcaaacgcat	840
	taagcactcc	gcctggggag	tacgaccgca	aggttgaaac	tcaaaggaat	tgacgggggg	900
	ccgcacaagc	ggtggagcat	gtggtttaat	togaagcaac	gcgaagaacc	ttaccaggtc	960
	ttgacatcct	ttgaccactc	tagagataga	gcttcccctt	cgggggcaaa	gtgacaggtg	1020
	gtgcatggtt	gtcgtcagct	cgtgtcgtga	gatggtgggt	taagtcccgc	aacgagcgca	1080
20	acccttattg	ttagttgcca	tcatattagtt	gggcaactta	gagagactgc	cggtgacaaa	1140
	ccggaggaag	gtggggatga	cgtcaaatca	tcatgccctt	tatgacctgg	gctacacacg	1200
	tgctacaatg	ggaagtacaa	cgagttgcga	agtcgcgagg	ctaagctaata	ctcttaaagc	1260
	ttctctcagt	tcggattgta	ggctgcaact	cgctacatg	aagccggaat	cgctagtaata	1320
	cgcggatcag	cacgcccggg	tgaatacgtt	cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacac	1380
25	cacgagagtt	tgtaacaccc	gaagtcggtg	aggtaacctt	tttgagcca	gccgctaag	1440
	gtgggataga	tgattggggg	gaagtcgtaa	caaggtagcc	gtatcggaag	gtgcggtctg	1500
	atcacc						1506
	<210>	2					
30	<211>	1444					
	<212>	ADN					
	<213>	Enterococcus gallinarum strain MRX518					
	<400>	2					
35							
	tgctatacat	gcagtcgaac	gctttttctt	tcaccggagc	ttgctccacc	gaaagaaaaa	60
40	gagtggcgaa	cgggtgagta	acacgtgggt	aacctgccca	tcagaagggg	ataacacttg	120
	gaaacaggtg	ctaataccgt	ataacactat	tttccgcatg	gaagaaagtt	gaaagggcgt	180
	tttgctcac	tgatggatgg	acccgcggtg	cattagctag	ttggtgagg	aacggctcac	240
	caaggccacg	atgcatagcc	gacctgagag	ggatgatcgg	cacactggga	ctgagacacg	300
	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtagg	gaatcttcgg	caatggacga	aagtctgacc	360
45							
	gagcaacgcc	gcgtgagtga	agaaggtttt	cggatcgtaa	aaactctgtt	ttagagaaga	420
	acaaggatga	gagtagaacg	ttcatccctt	gacggtatct	aaccagaaag	ccacggctaa	480
	ctacgtgcc	gcagccgcgg	taatacgtag	gtggcaagcg	ttgtccggat	ttattgggcg	540
	taaagcgagc	gcaggcggtt	tcttaagtct	gatgtgaaag	cccccggtc	aaccggggag	600
50	ggtcattgga	aactgggaga	cttgagtgc	gaagaggaga	gtggaattcc	atgtgtagcg	660
	gtgaaatgcg	tagatataatg	gaggaacacc	agtggcgaag	goggctctct	ggtctgtaac	720
	tgacgctgag	gctcgaagc	gtggggagcg	aacagatta	gataccctgg	tagtccacgc	780
	cgtaaacgat	gagtgcctaag	tggtggaggg	tttccgccct	tcagtgtctg	agcaaacgca	840
	ttaagcactc	cgctgggga	gtacgaccgc	aaggttgaaa	ctcaaaggaa	ttgacggggg	900
55	ccgcacaag	cggtgagca	tgtggtttaa	ttcgaagcaa	cgcgaagaac	cttaccaggt	960
	cttgacatcc	tttgaccact	ctagagatag	agcttcccct	togggggcaa	agtacaggt	1020
	ggtgcatggt	tgtcgtcagc	tcgtgtcgtg	agatggtggg	ttaagtcccg	caacgagcgc	1080
	aacccttatt	gttagttgcc	atcatttagt	ttggcactct	agcagactg	ccggtgacaa	1140
	accggaggaa	ggtgggatg	acgtcaaatc	atcatgccc	ttatgacctg	gggtacacac	1200
60	gtgctacaat	gggaagtaca	acgagttgcg	aagtcgag	gctaagctaa	tctcttaaag	1260
	cttctctcag	ttcggattgt	aggctgcaac	tcgcctacat	gaagccggaa	tcgctagtaa	1320
	tcgcgatca	gcacgcccgg	gtgaatacgt	tcccggcctt	tgtacacacc	gcccgtaaca	1380
	ccacgagagt	ttgtaacacc	cgaagtcggt	gaggtaacct	ttttggagcc	agccgcctaa	1440
	ggtg						1444
65							

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Enterococcus gallinarum* para uso en terapia.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que no contiene bacterias de ninguna otra especie, o que comprende solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de bacterias de otra especie.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es para uso en un método para tratar o prevenir cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado o cáncer de colon.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición se usa en un método para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento tumoral, prevenir la metástasis o prevenir la angiogénesis.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la cepa bacteriana tiene la secuencia del ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 2.
- 20 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es para administración oral, en donde la composición comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y/o en donde la cepa bacteriana está liofilizada.
- 25 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la cepa bacteriana es capaz de colonizar parcial o totalmente el intestino.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende una única cepa de *Enterococcus gallinarum*.
- 30 10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la cepa bacteriana de *Enterococcus gallinarum* como parte de un consorcio microbiano.
11. Un producto alimenticio o una composición de vacuna que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 35 12. Una célula o cultivo biológicamente puro de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488.
- 40 13. Una composición que comprende la célula de la reivindicación 12, que comprende opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 14. Una célula de la cepa de *Enterococcus gallinarum* depositada con el número de acceso NCIMB 42488 para uso en terapia, opcionalmente en la que la célula se usa en un método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.



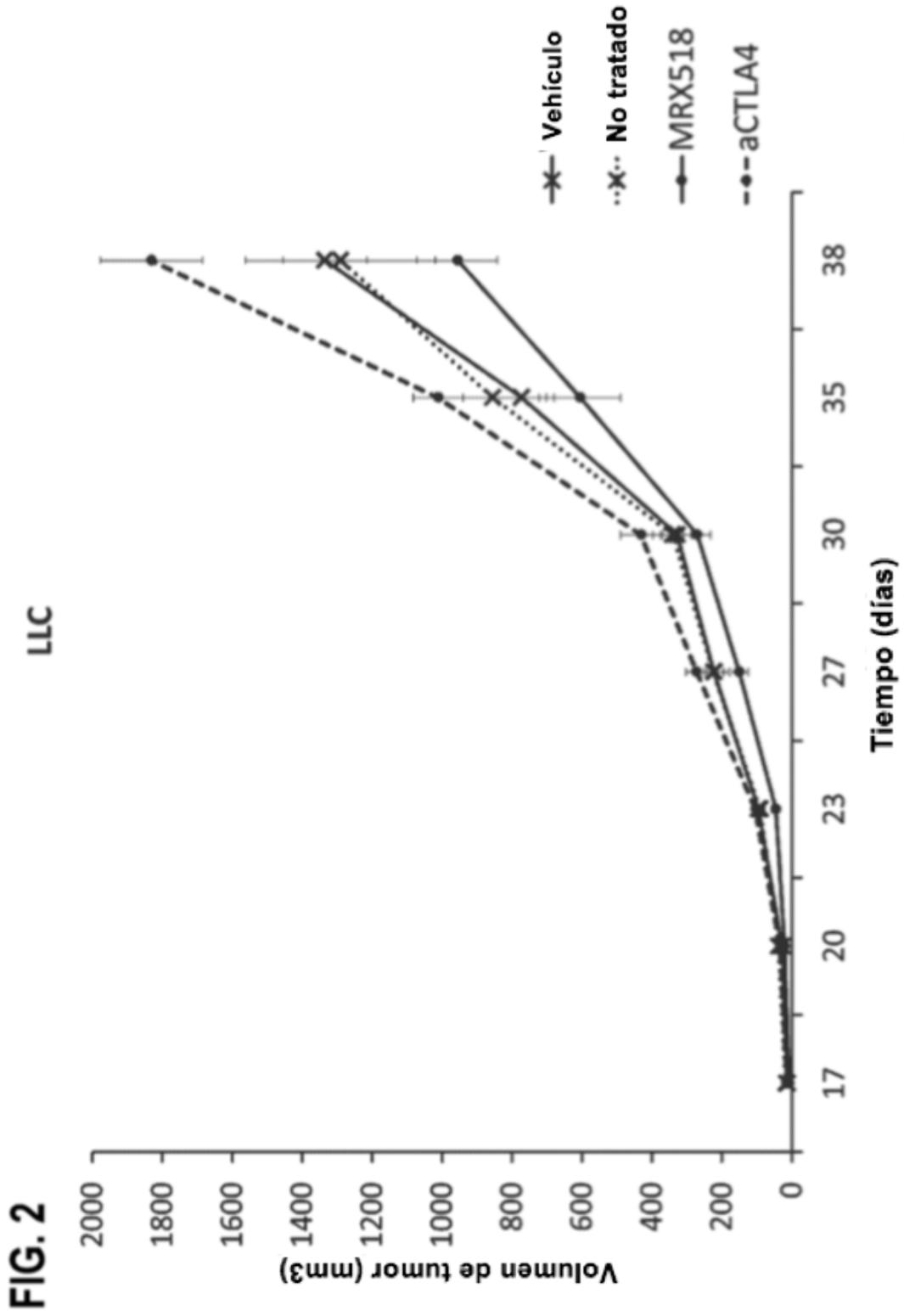


FIG. 3

Pesos de hígado en eutanasia (g)

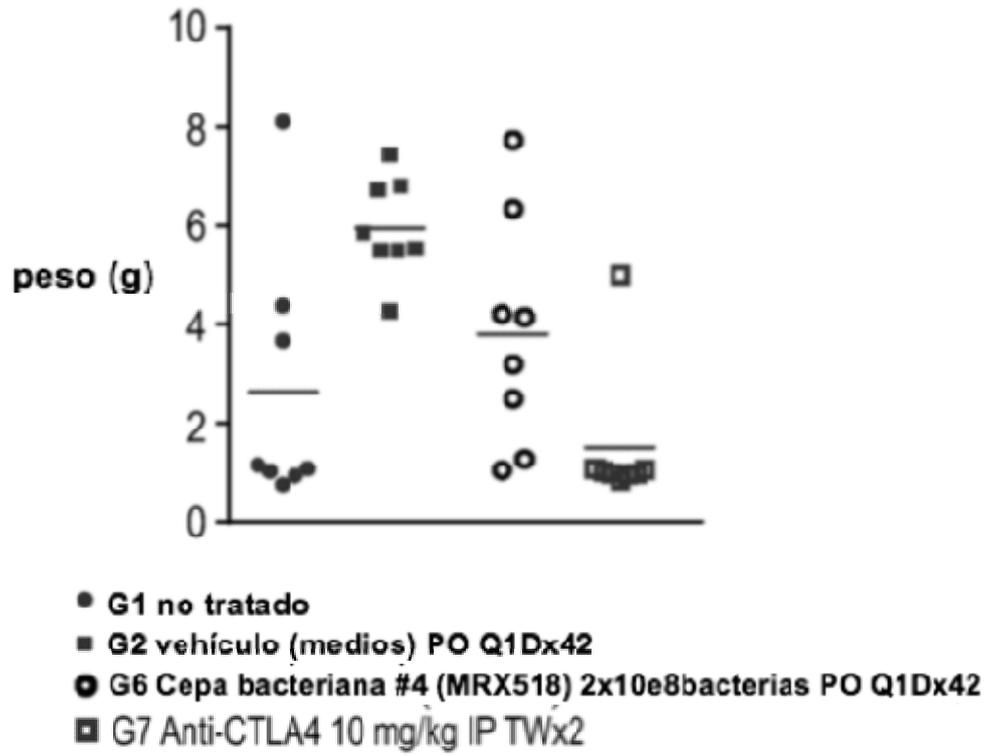


FIG. 4A

Control negativo

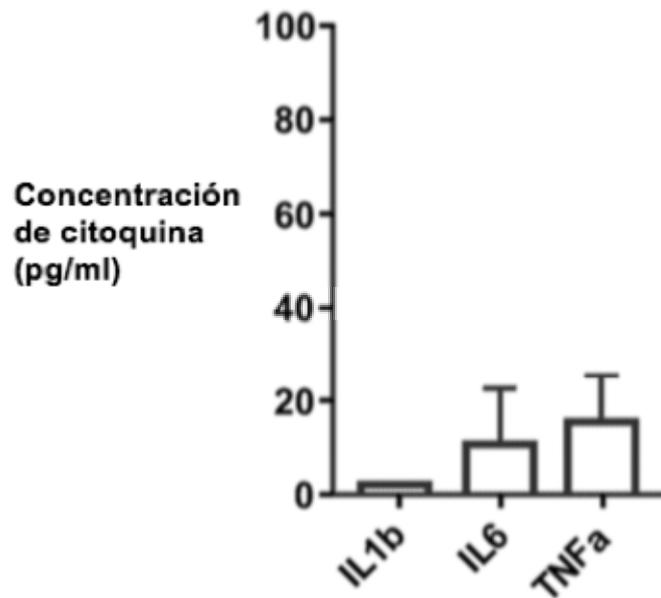


FIG. 4B

Control positivo

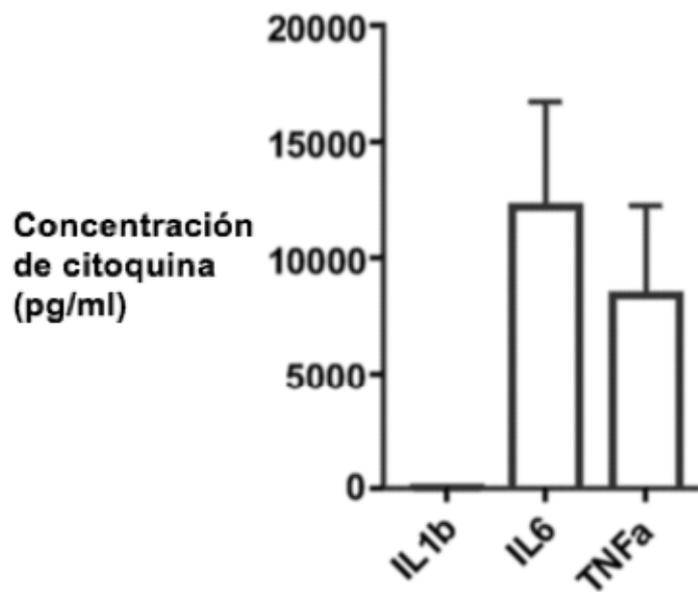


FIG. 4C

Adición de MRX518

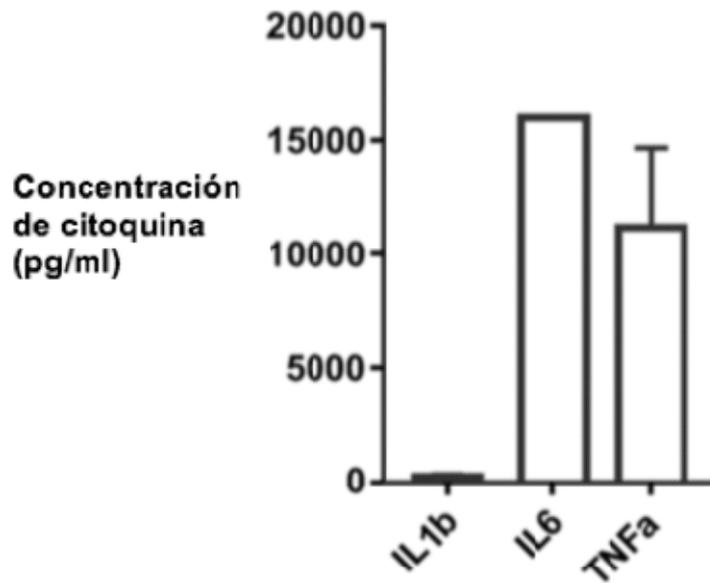
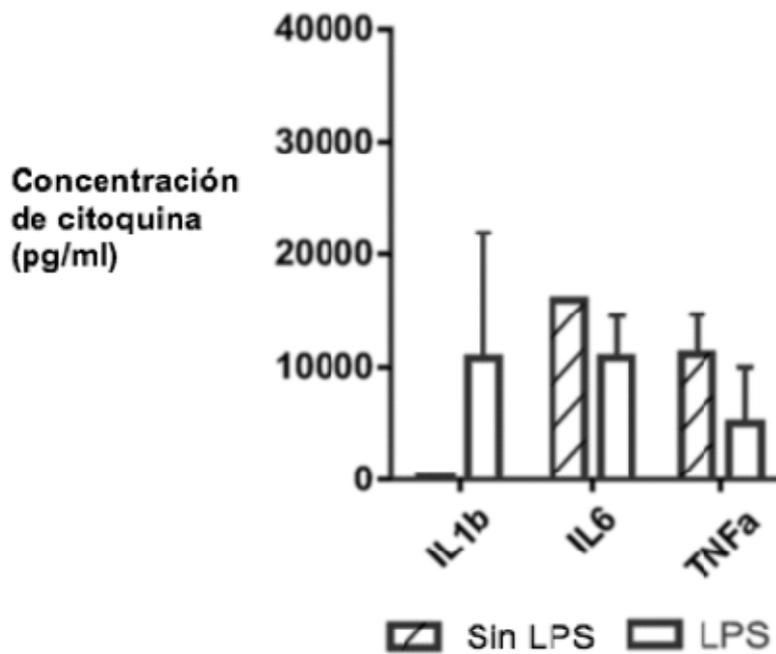


FIG. 4D

Adición de MRX518 y LPS



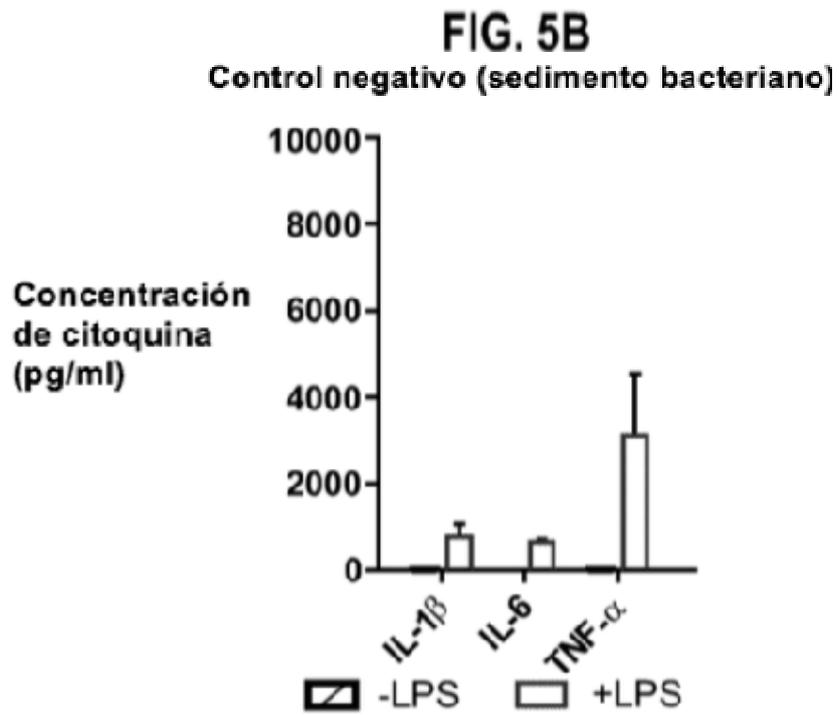
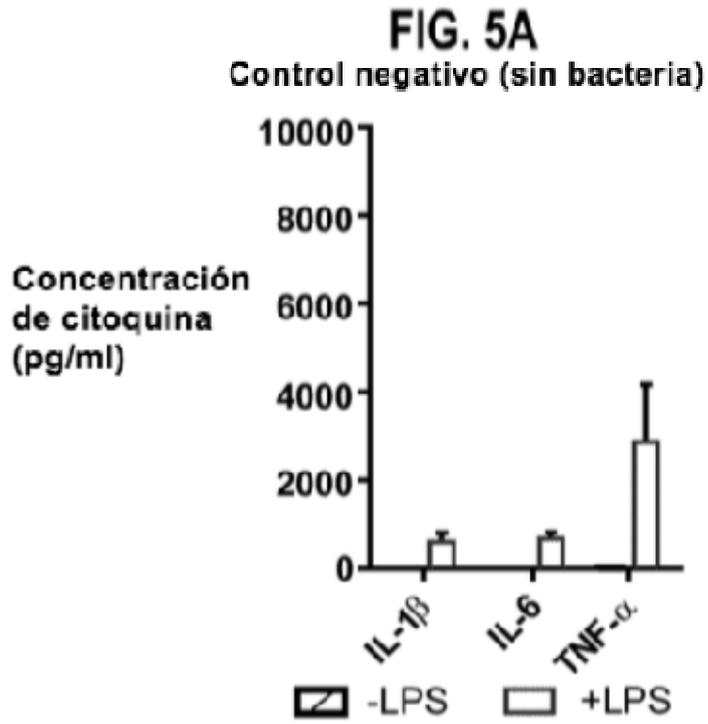


FIG. 5C
Adición de MRX518

