

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 270**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2011 E 19174499 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3552613**

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

30 Prioridad:

04.06.2010 JP 2010129134

03.12.2010 WO PCT/JP2010/071746

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

22.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 807 270 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras

5 **Campo técnico**

En el presente documento se describe una composición que tiene un efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras, y que comprende, como principio activo, bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias, esporas bacterianas, o similares.

También se describe un método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras, así como un método para inhibir tal proliferación o acumulación. También se describe una composición de vacuna que contiene al menos una cepa de bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una espora de bacterias, así como un método para tratar o prevenir al menos una enfermedad o un estado seleccionados de enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias mediante la administración de la composición de vacuna a un individuo que lo necesita.

También se describe un método para seleccionar un compuesto que fomente la proliferación o acumulación de células T reguladoras, así como un mamífero no humano que se use en este método, y en el que un gen indicador se expresa bajo el control de la expresión del gen de IL-10.

Antecedentes de la técnica

Cientos de especies de microorganismos comensales se encuentran en los tractos gastrointestinales de mamíferos, e interactúan de manera íntima con los sistemas inmunitarios del huésped. Algunos resultados de investigaciones que usan animales asépticos (GF, *germ-free*) han demostrado que los microorganismos comensales ejercen una gran influencia sobre el desarrollo de sistemas inmunitarios de la mucosa tales como histogénesis de placas de Peyer (PP) y folículos linfáticos aislados (ILF), secreción de péptidos antimicrobianos del epitelio y acumulación de linfocitos únicos en tejidos mucosos, incluyendo los linfocitos únicos plasmocitos que producen inmunoglobulina A, linfocitos intraepiteliales, células T positivas para CD4 que producen IL-17 (Th 17) y células similares a linfocitos citolíticos naturales que producen IL-22 (documentos no de patente 1 a 7). En consecuencia, la presencia de bacterias intestinales potencia las funciones protectoras de las membranas mucosas, dotando a los huéspedes con respuestas inmunitarias robustas frente a microbios patógenos que invaden los organismos. Por otro lado, los sistemas inmunitarios de la mucosa mantienen la falta de respuesta a antígenos alimentarios y microbios inofensivos (documento no de patente 3). Por este motivo, una anomalía en la regulación de la interferencia entre bacterias comensales y un sistema inmunitario (disbiosis intestinal) puede conducir a una respuesta inmunitaria demasiado robusta a antígenos medioambientales, de modo que se provoca enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (documentos no de patente 8 a 10).

Algunos resultados de estudios recientes han demostrado que bacterias comensales individuales controlan la diferenciación de sus células inmunitarias específicas en el sistema inmunitario de la mucosa. Por ejemplo, *Bacteroides fragilis*, que es una bacteria comensal en humanos, induce específicamente una respuesta de células Th1 sistémica y una respuesta de células T que producen IL-10 en la mucosa en ratones, y desempeña un papel en la protección del huésped contra la colitis, que de otro modo se provocaría por un patógeno (documento no de patente 3). Se ha demostrado que las bacterias filamentosas segmentadas, que son bacterias comensales intestinales en ratones, inducen una respuesta de células Th17 en la mucosa y, por tanto, potencian la resistencia frente a la infección de los tractos gastrointestinales del huésped con un patógeno (documentos no de patente 11 a 13). Además, se sabe que los ácidos grasos de cadena corta derivados de varias bacterias comensales suprimen la inflamación intestinal (documento no de patente 14). Además, se presume que la presencia de algunas especies de microbiota intestinal ejerce una gran influencia sobre la diferenciación de células T reguladoras (denominadas a continuación en el presente documento "células Treg") que mantienen la homeostasis del sistema inmunitario.

Mientras tanto, las células T reguladoras que se han identificado como un subconjunto que suprime la inmunidad son células T CD4⁺ en las que se expresa un factor de transcripción Foxp3, y se sabe que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica (documentos no de patente 8, 9, 15 y 16). Además, se sabe que las células que expresan Foxp3 están presentes en un gran número, especialmente en el colon, y sólo las células Treg presentes de manera local en el colon expresan de manera constante IL-10, que es una citocina inmunosupresora, a un nivel alto (documento no de patente 17). También se sabe que los animales que tienen células CD4⁺ Foxp3⁺, a partir de las cuales se elimina específicamente IL-10, desarrollan enfermedad inflamatoria del intestino (documento no de patente 18).

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

Sin embargo, los mecanismos de cómo un gran número de células Treg llegan a estar presentes en el colon y cómo

las células Treg producen IL-10 en el colon a un nivel alto aún permanecen poco claros. Además, todavía permanece poco claro qué especies de bacterias que constituyen la flora bacteriana comensal intestinal ejercen la influencia sobre la inducción de células T reguladoras.

5 Lista de referencias

Bibliografía no de patentes

[NPL 1] J. J. Cebra, "Am J Clin Nutr", mayo de 1999, 69, 1046S

[NPL 2] A. J. Macpherson, N. L. Harris, "Nat Rev Immunol", junio de 2004, 4, 478

[NPL 3] J. L. Round, S. K. Mazmanian, "Nat Rev Immunol", mayo de 2009, 9, 313

[NPL 4] D. Bouskra *et al.*, "Nature", 27 de noviembre de 2008, 456, 507

[NPL 5] K. Atarashi *et al.*, "Nature", 9 de octubre de 2008, 455, 808

[NPL 6] Ivanov, Il *et al.*, "Cell Host Microbe", 16 de octubre de 2008, 4, 337

[NPL 7] S. L. Sanos *et al.*, "Nat Immunol", enero de 2009, 10, 83

[NPL 8] M. A. Curotto de Lafaille, J. J. Lafaille, "Immunity", mayo de 2009, 30, 626

[NPL 9] M. J. Barnes, F. Powrie, "Immunity", 18 de septiembre de 2009, 31, 401

[NPL 10] W. S. Garrett *et al.*, "Cell", 5 de octubre de 2007, 131, 33

[NPL 11] Ivanov, Il *et al.*, "Cell", 30 de octubre de 2009, 139, 485.

[NPL 12] V. Gaboriau-Routhiau *et al.*, "Immunity", 16 de octubre de 2009, 31, 677

[NPL 13] N. H. Salzman *et al.*, "Nat Immunol", 11, 76.

[NPL 14] K. M. Maslowski *et al.*, "Nature", 29 de octubre de 2009, 461, 1282

[NPL 15] L. F. Lu, A. Rudensky, "Genes Dev", 1 de enero de 2009, 23, 1270

[NPL 16] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, "Cell", 30 de mayo de 2008, 133, 775

[NPL 17] C. L. Maynard *et al.*, "Nat Immunol", septiembre de 2007, 8, 931

[NPL 18] Y. P. Rubtsov *et al.*, "Immunity", abril de 2008, 28, 546

GABORIAU-ROUTHIAU *et al.* (2009), Immunity 31:677 describen bacterias filamentosas segmentadas (SFB) que no pertenecen al género *Clostridium*, y que de hecho son filogenéticamente lejanas de las mismas.

SOKOL *et al.* (2008-10-28) "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients", Proc Natl Acad Sci USA 105 (43): 16731-16736, proponen a *Faecalibacterium prausnitzii* (perteneciente al grupo IV de *Clostridium*) como agente probiótico candidato en el tratamiento de enfermedad de Crohn (EC).

KARIMI *et al.* (2009), "Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against and allergic airway response in mice" American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 17(3):186-193, describen que *Lactobacillus reuteri* induce células T reguladoras Foxp3⁺ que tienen potencial de proteger frente a y respuesta de las vías respiratorias alérgicas en ratones.

El documento EP 1 955 706 A1 se refiere a una composición que contiene interferón alfa y pigmento biliar natural C-ficocianina para tratar enfermedades autoinmunitarias, alergia y cáncer mediante la inducción de células T reguladoras.

ITOH K *et al.* "Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice." LABORATORY ANIMALS APR 1985 vol. 19, n.º 2, abril de 1985 (1985-04), páginas 111-118, divulgan la caracterización de 115 cepas de *Clostridium* acumuladas de 3 aislamientos separados de las heces de 1 ratón con flora limitada (LF) producidos mediante la inoculación de ratones asépticos con heces tratadas con cloroformo de ratones convencionales, y se estudió el efecto sobre el tamaño del ciego cuando se asocian

con ratones asépticos.

BAKKEN (2009) Anaerobe 15:285-289 se refiere a bacterioterapia fecal como tratamiento para infección recurrente por *Clostridium difficile*.

5

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones, y proporciona una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica mediante la inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3, comprendiendo la composición, como principio activo, bacterias pertenecientes al género *Clostridium* de los grupos XIVa y/o IV, en la que las bacterias inducen dicha proliferación o acumulación de células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3. Otros aspectos de la invención también se definen en las reivindicaciones.

10

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

20

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

25

Efectos ventajosos

Las composiciones descritas en el presente documento, que contienen como principio activo bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias, sirven como una excelente composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras (células Treg). La inmunidad en un organismo vivo puede suprimirse, según las reivindicaciones, a través de la administración de la composición de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones como producto farmacéutico o de la ingesta de la composición como un alimento o una bebida. Por consiguiente, la composición de la presente invención puede usarse, por ejemplo, para prevenir o tratar enfermedades alérgicas.

35

Además, si un alimento o una bebida, tal como un alimento saludable, comprende la composición de la presente invención, los individuos sanos pueden ingerir la composición de manera fácil y rutinaria. Como resultado, es posible inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras y, por tanto, mejorar las funciones inmunitarias, tal como se define en las reivindicaciones.

40

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un método de producción de un ratón IL10^{venus}.

45

[Figura 2] La figura 2 es un diagrama que muestra los resultados de transferencia de tipo Southern realizada para el análisis en cuanto a si los ratones IL10^{venus} tienen o no un alelo IL10^{venus}.

[Figura 3] La figura 3 es un diagrama de gráfico de puntos de FACS que muestra los resultados obtenidos cuando se clasificaron células positivas para Venus y células negativas para Venus de los ratones IL10^{venus}.

50

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se analizaron las cantidades de ARNm de IL-10 expresado en células positivas para Venus y células negativas para Venus de los ratones IL10^{venus} mediante RT-PCR en tiempo real.

55

[Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra el cambio en la razón de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ de ratones SPF.

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

60

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

65

[Figura 8] La figura 8 muestra gráficos que muestran los resultados del análisis de los números de células CD4⁺ Foxp3⁺ aisladas del intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos periféricos de ratones GF y ratones SPF.

[Figura 9] La figura 9 es un diagrama de gráfico que muestra los resultados del análisis de las razones de células Venus⁺ en células CD4⁺ en diversos tejidos de ratones SPF tratados con antibióticos.

[Figura 10] La figura 10 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de la razón de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lámina propia del colon de ratones GF a los que se les administró una suspensión fecal de ratones SPF.

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

[Figura 12] La figura 12 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la razón de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lámina propia de ratones deficientes en ILF, PP y placas del colon.

[Figura 13] La figura 13 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de las razones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lámina propia del colon de ratones GF a los que se les administraron bacterias comensales específicas.

[Figura 14] La figura 14 muestra gráficos que muestran los resultados del análisis de las razones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados de la lámina propia del colon de ratones GF a los que se les administraron bacterias comensales específicas.

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

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

[Figura 17] La figura 17 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de las razones de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ aislados del colon de tipos de ratones SPF siendo cada uno deficiente en un factor asociado al receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociado a patógenos.

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

[Figura 19] La figura 19 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de las razones de células Venus⁺ en linfocitos aislados de diversos tejidos de ratones II10^{venus}.

[Figura 20] La figura 20 es un diagrama de gráfico de puntos de FACS que muestra los resultados del análisis de la expresión de una cadena β del receptor de células T en superficies celulares de linfocitos aislados de la lámina propia del colon de ratones II10^{venus}.

[Figura 21] La figura 21 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de la expresión de IL-17, IL-4 e IFN- γ en linfocitos aislados de la lámina propia del colon de ratones II10^{venus}.

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

[Figura 23] La figura 23 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de la expresión de CD4, Foxp3 y Venus en la lámina propia del intestino delgado y la lámina propia del colon de ratones II10^{venus} GF y ratones II10^{venus} SPF.

[Figura 24] La figura 24 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de la expresión de Venus y Foxp3 de células CD4 en diversos tejidos de ratones SPF II10^{venus}.

[Figura 25] La figura 25 muestra diagramas de gráfico de puntos de FACS que muestran los resultados del análisis de la expresión de Foxp3 y Venus en ratones II10^{venus} en los que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Figura 26] La figura 26 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la expresión de Foxp3 y/o Venus de células CD4⁺ en el intestino delgado de ratones II10^{venus} en los que se colonizaron bacterias comensales específicas.

[Figura 27] La figura 27 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la expresión de Foxp3 y/o Venus de células CD4⁺ en el colon de ratones II10^{venus} en los que se colonizaron bacterias comensales específicas.

5 [Figura 28] La figura 28 es un diagrama de gráfico que muestra los resultados del análisis de las razones de células Venus⁺ en células CD4⁺ aisladas de diversos tejidos de ratones II10^{venus} tratados con antibióticos.

[Figura 29] La figura 29 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de funciones inmunorreguladoras de células CD4⁺ Venus⁺ de la lámina propia del colon de ratones II10^{venus} GF en los que se colonizó el género *Clostridium*,
10 células CD4⁺ Venus⁺ de la lámina propia del colon de ratones II10^{venus} SPF y células CD4⁺ GFP⁺ del bazo de ratones indicadores de Foxp3^{eGFP}.

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

[Figura 31] La figura 31 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se administraron por vía oral heces tratadas con cloroformo derivadas de ratones SPF a ratones GF, y luego se analizaron para determinar la razón de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺.
20

[Figura 32] La figura 32 es un gráfico que muestra los resultados generales del análisis por citometría de flujo de la expresión de Helios en linfocitos LP en el timo o el colon de ratones SPF, ratones GF, ratones colonizados con *Lactobacillus* o ratones colonizados con *Clostridium*.

25 [Figura 33] La figura 33 muestra diagramas de gráficos que muestran resultados representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD4, la expresión de Foxp3 y la expresión de Helios en los linfocitos LP en el timo o el colon de los ratones SPF, los ratones GF, los ratones colonizados con *Lactobacillus* o los ratones colonizados con *Clostridium*.

30 [Figura 34] La figura 34 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se cultivaron los cólores completos derivados de ratones GF, ratones colonizados con *Lactobacillus* o ratones colonizados con *Clostridium*, y se analizaron los sobrenadantes de cultivo de los mismos para determinar la concentración de TGF-β1 mediante ELISA.

35 [Figura 35] La figura 35 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se cultivaron células epiteliales intestinales (IEC) derivadas de ratones GF o ratones colonizados con *Clostridium*, y se analizaron los sobrenadantes de cultivo de las mismas para determinar la concentración de TGF-β1 mediante ELISA.

[Figura 36] La figura 36 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se cultivaron células T CD4⁺ del bazo junto con un anticuerpo anti-CD3 y con un sobrenadante de cultivo de IEC aisladas de ratones GF o ratones colonizados con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TGF-β, y se recogieron las células T en el día 5 del cultivo y se analizaron para determinar la expresión de Foxp3 mediante RT-PCR en tiempo real.
40

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

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

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

60 [Figura 40] La figura 40 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando se inoculaban por vía oral ratones C57BL/6 GF con 46 cepas bacterianas del género *Clostridium* (Clost.) o tres cepas bacterianas del género *Lactobacillus* (Lacto.), y se recogieron las IEC tres semanas después de la inoculación y se analizaron para determinar el nivel de expresión relativo de ARNm del gen deIDO mediante RT-PCR en tiempo real.

65 [Figura 41] La figura 41 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando ratones de control (SPF) y ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se trataron con DSS al 2%, se observaron y se midieron para determinar la pérdida de peso corporal, la dureza de las deposiciones y sangrado durante seis días, y luego se evaluaron de

forma numérica.

[Figura 42] La figura 42 es una fotografía que muestra el estado de los colonos recogidos en el día 6 después de que los ratones de control (SPF) y los ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se trataron con DSS al 2%.

[Figura 43] La figura 43 muestra fotomicrografías que muestran los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se trataron con DSS al 2%, y se recogieron los colonos de los mismos en el día 6 y se analizaron de manera histológica mediante tinción con HE.

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

[Figura 45] La figura 45 muestra fotomicrografías que muestran los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se sensibilizaron con oxazolona, y posteriormente se trató el interior de cada recto con una disolución de oxazolona al 1%/etanol al 50%, y se analizaron de manera histológica los colonos obtenidos por el tratamiento mediante tinción con HE.

[Figura 46] La figura 46 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando ratones de control (SPF) y ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se inmunizaron mediante la administración de ovoalbúmina (OVA) absorbida con alumbre dos veces en un intervalo de 2 semanas, y se recogieron los sueros de los mismos y se analizaron para determinar la concentración de IgE específica de OVA en estos sueros mediante ELISA.

[Figura 47] La figura 47 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se inmunizaron mediante la administración de OVA absorbida con alumbre dos veces en un intervalo de 2 semanas, y se recogieron las células del bazo y se analizaron para determinar la producción de IL-4 de estas células del bazo mediante reestimulación con OVA *in vitro*.

[Figura 48] La figura 48 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando los ratones de control (SPF) y los ratones administrados con *Clostridium* (SPF+Clost.) se inmunizaron mediante la administración de OVA absorbida con alumbre dos veces en un intervalo de 2 semanas, y se recogieron las células del bazo y se analizaron para determinar la producción de IL-10 de estas células del bazo mediante reestimulación con OVA *in vitro*.

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

[Figura 50] La figura 50 son histogramas que muestran la expresión de Foxp3 por células CD4 seleccionadas de ratones GF (ratón aséptico n.º 1 y n.º 2) o ratones GF colonizados con tres cepas de *Clostridium* pertenecientes al grupo IV (ratón con 3 cepas de Clost. n.º 1 y n.º 2).

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

[Figura 52] La figura 52 es un gráfico que muestra la expresión de Foxp3 por linfocitos positivos para CD4 de ratones GF (GF) o ratones GF alimentados por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo (GF+cloro.)

[Figura 53] La figura 53 es un gráfico que muestra las cantidades de *Clostridium* y *Bacteroides* en heces de ratones alimentados por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo.

Descripción

<Composición que tiene efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras>

En el presente documento se describe una composición que induce la proliferación o acumulación de células T reguladoras, comprendiendo la composición, como principio activo, al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

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

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

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

En el presente documento, “células T reguladoras” significa células T que tienen una función de supresión de una respuesta inmunitaria anómala o excesiva, y que desempeñan un papel en la tolerancia inmunitaria. Las células T reguladoras de la invención son células T positivas para CD4 positivas para el factor de transcripción Foxp3. Sin embargo, otras células T reguladoras también incluyen células T reguladoras negativas para el factor de transcripción Foxp3 que son células T positivas para CD4 que producen IL-10.

El significado de “induce la proliferación o acumulación de células T reguladoras” en la presente invención incluye un efecto de inducción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras, cuya diferenciación conduce a la proliferación o la acumulación de células T reguladoras. Además, el significado de “induce la proliferación o acumulación de células T reguladoras” en la presente invención incluye efectos *in vivo*, efectos *in vitro* y efectos *ex vivo*. Por consiguiente, se incluyen la totalidad de los siguientes efectos: un efecto de inducción de proliferación o acumulación *in vivo* de células T reguladoras a través de la administración o ingesta de las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias; un efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras cultivadas provocando que las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias actúen en las células T reguladoras cultivadas; y un efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras que se recogen de un organismo vivo y que posteriormente pretenden introducirse en un organismo vivo, tal como el organismo a partir del cual se obtuvieron u otro organismo, provocando que las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias actúen en las células T reguladoras. El efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras puede evaluarse, por ejemplo, de la siguiente manera. Específicamente, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias se administra por vía oral a un animal de experimentación tal como un ratón aséptico, luego se aíslan las células positivas para CD4 en el colon y se mide la razón de células T reguladoras contenidas en las células positivas para CD4 mediante citometría de flujo (véase el ejemplo 7).

Las células T reguladoras cuya proliferación o acumulación se induce mediante la composición de la presente invención son células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3.

Las “bacterias pertenecientes al género *Clostridium*”, que son el principio activo en la composición de la presente invención, se definen en las reivindicaciones, y tienen el efecto de inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras.

Puede usarse una cepa de las bacterias sola para la composición de la presente invención, pero pueden usarse dos o más cepas de las bacterias juntas para la composición de la presente invención. El uso de múltiples cepas de bacterias pertenecientes al grupo XIVa o el grupo IV en combinación puede lograr un excelente efecto sobre las células T reguladoras. Además de las bacterias pertenecientes a estos grupos, también pueden usarse bacterias pertenecientes a otros grupos (por ejemplo, bacterias pertenecientes al grupo III) en combinación. Si se usa más de una cepa de bacterias (por ejemplo, una o más cepas pertenecientes al grupo XIVa, una o más cepas pertenecientes al grupo IV, una o más cepas pertenecientes a un grupo distinto del grupo XIVa o el grupo IV, tal como una o más cepas pertenecientes al grupo III), el tipo y número de cepas usadas puede variar ampliamente. El tipo y número que va a usarse puede determinarse basándose en una variedad de factores (por ejemplo, el efecto deseado, tal como la inducción o inhibición de proliferación o acumulación de células T reguladoras; la enfermedad o el estado que va a tratarse, prevenirse o reducirse en gravedad; la edad o el género del receptor). Las cepas pueden estar presentes en una sola composición, en cuyo caso se consumirán o ingerirán juntas, o pueden estar presentes en más de una composición (por ejemplo, cada una puede estar en una composición separada), en cuyo caso pueden consumirse de manera individual o las composiciones pueden combinarse y la combinación resultante (composiciones combinadas) consumirse o ingerirse. Puede administrarse cualquier número o combinación de cepas que sea eficaz (por ejemplo, cualquier número desde uno hasta 200, tal como de 1 a 100, de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5 y cualquier número entre los mismos). En determinadas realizaciones de la presente invención, se usa una combinación de algunas o la totalidad de las 46 cepas descritas en el documento (Itoh, K., y Mitsuoka, T. Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. Lab. Animals 19: 111-118 (1985)). Por ejemplo, puede usarse al menos una, dos o más, tres, tres o más, cuatro, cuatro o más, cinco, cinco o más, seis, seis o más, o cualquier otro número de las 46 cepas descritas, incluyendo las 46 cepas. Pueden usarse en combinación entre sí y en combinación con cepas no descritas en la referencia citada (por ejemplo, en combinación con una o más cepas pertenecientes al grupo III). Obsérvese que el grupo de “bacterias pertenecientes al género *Clostridium*” puede identificarse, por ejemplo, de la siguiente manera. Específicamente, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican mediante PCR usando un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO: 64 y 65 (para *Clostridium* spp. pertenecientes al grupo XIVa) o un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO: 66 y 67 (para *Clostridium* spp. pertenecientes al grupo IV) (véase el ejemplo 18). Además, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican mediante secuenciación del gen de ARNr 16S amplificado usando un conjunto de cebadores que consiste en las SEQ ID NO: 19 y 20 (véase el ejemplo 7).

Pueden usarse células viables de las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* para la composición de la presente invención, y también pueden usarse células inactivadas de las mismas para la composición. Además, desde el punto de vista de estabilidad frente al calor, resistencia al tratamiento con antibióticos y similares, y periodo de

almacenamiento prolongado, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* están preferiblemente en forma de espora.

El significado de la "sustancia fisiológicamente activa derivada de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*" de la presente invención incluye sustancias contenidas en las bacterias, productos de secreción de las bacterias y metabolitos de las bacterias. Una sustancia fisiológicamente activa de este tipo puede identificarse mediante purificación de un componente activo de las bacterias, un sobrenadante de cultivo de las mismas o el contenido del tracto intestinal en el tracto intestinal de un ratón en el que sólo se colonizan bacterias pertenecientes al género *Clostridium* mediante un método de purificación ya conocido.

El principio activo "fracción de formación de esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero" en la composición tal como se describe en el presente documento incluye bacterias de formación de esporas presentes en las heces de un mamífero, y tiene el efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras.

El principio activo "fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero" en la composición tal como se describe en el presente documento se obtiene mediante el tratamiento de las heces de un mamífero con cloroformo (por ejemplo, cloroformo al 3%), y tiene el efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras.

Obsérvese que el "mamífero" en el presente documento incluye humanos, ratones, ratas, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, monos, perros y gatos.

Mientras tanto, cuando la "fracción de formación de esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero" o la "fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero" se cultiva en un medio, las sustancias contenidas en las bacterias, los productos de secreción de las bacterias y los metabolitos de las bacterias se liberan de las bacterias y similares contenidas en la fracción. El significado del principio activo "sobrenadante de cultivo de la fracción" en la composición descrita en el presente documento incluye tales sustancias, productos de secreción y metabolitos. El sobrenadante de cultivo no está particularmente limitado, siempre que el sobrenadante de cultivo tenga el efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras. Los ejemplos del sobrenadante de cultivo incluyen una fracción de proteínas del sobrenadante de cultivo, una fracción de polisacáridos del sobrenadante de cultivo, una fracción de lípidos del sobrenadante de cultivo y una fracción de metabolitos de peso molecular bajo del sobrenadante de cultivo.

La composición de la presente invención puede estar en forma de una composición farmacéutica, un alimento o una bebida (que también puede ser un pienso), o un reactivo usado para un experimento de modelo animal, teniendo la composición farmacéutica, el alimento o la bebida, y el reactivo el efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras. Un ejemplo en el presente documento reveló que las células T reguladoras (células Treg) inducidas por bacterias o similares pertenecientes al género *Clostridium* suprimieron la proliferación de células T efectoras. Por consiguiente, la composición de la presente invención puede usarse de manera adecuada tal como se define en las reivindicaciones como una composición que tiene un efecto inmunosupresor. El efecto inmunosupresor puede evaluarse, por ejemplo, de la siguiente manera. Específicamente, se provoca que células T reguladoras aisladas de un animal de experimentación, tal como un ratón, al que se le administra por vía oral la composición de la presente invención actúen en las células T efectoras (células CD4⁺ CD25⁻) aisladas del bazo, y luego se mide la capacidad de proliferación de las mismas usando la cantidad de ingesta de [³H]-timidina como índice (véase el ejemplo 14).

La composición de la presente invención puede usarse, por ejemplo, tal como se reivindica, como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad alérgica, tal como polinosis o asma; un alimento o una bebida para mejorar las funciones inmunitarias; o un reactivo para suprimir la proliferación o función de las células T efectoras.

Las enfermedades autoinmunitarias, las enfermedades alérgicas y el rechazo en trasplantes de órganos, y similares, incluyen enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esprúe, artritis autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad injerto contra huésped tras un trasplante de médula ósea, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependiente de la insulina, tiroiditis, asma, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, dermatitis atópica, enfermedad injerto contra huésped, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlejn, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome del choque tóxico, síndrome séptico, caquexia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, síndrome de deficiencia poliglandular tipo I y síndrome de deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) de adultos, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, clamidia, espondiloartropatía artropatía asociada con *Yersinia* y *Salmonella*, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, alergias alimentarias, enfermedad ampollosa autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, dermatosis con depósitos lineales de IgA, anemia hemolítica autoinmunitaria,

anemia hemolítica con prueba de Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad del Royal Free, candidosis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria criptogénica, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con inmunodeficiencia adquirida, hepatitis C, inmunodeficiencia común variable (hipogammaglobulinemia común variable), miocardiopatía dilatada, fibrosis pulmonar, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial posinflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad del tejido conjuntivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hem siderosis, enfermedad pulmonar inducida por fármacos, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrativa linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial tras infección, artritis gotosa, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria tipo I (hepatitis lupoides o autoinmunitaria clásica), hepatitis autoinmunitaria tipo 2 (hepatitis por anticuerpos anti-LKM), hipoglucemia mediada autoinmunitaria, resistencia a la insulina de tipo B con acantosis pigmentaria, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, leucocitopenia idiopática, neutrocitopenia autoinmunitaria, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad del esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), diabetes mellitus dependiente de la insulina, oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmunitario por bocio (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmunitario atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, rinitis alérgica (alergias al polen), anafilaxis, alergias a mascotas, alergias al látex, alergias a fármacos, rinoconjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, gastroenteritis eosinofílica, lupus eritematoso cutáneo, esofagitis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico y gastroenteritis eosinofílica.

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

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

Mientras tanto, para formular una preparación farmacéutica de la misma, y particularmente para formular una preparación farmacéutica para administración oral, es preferible usar en combinación una composición que permita la administración eficaz de la composición de la presente invención al colon, desde el punto de vista de inducir de manera más eficaz la proliferación o acumulación de células T reguladoras en el colon.

Una composición o un método de este tipo que permite la administración al colon no está particularmente limitado, y pueden emplearse composiciones o métodos conocidos según sea apropiado. Los ejemplos de los mismos incluyen composiciones sensibles al pH, más específicamente, polímeros entéricos que liberan su contenido cuando el pH se vuelve alcalino después de que los polímeros entéricos pasen a través del estómago. Cuando se usa una composición sensible al pH para formular la preparación farmacéutica, la composición sensible al pH es preferiblemente un polímero cuyo umbral de pH de la descomposición es de 6,8 a 7,5. Un intervalo de valores numéricos de este tipo se encuentra en el intervalo en el que el pH se desplaza hacia el lado alcalino en la parte distal del estómago y, por tanto, es un intervalo adecuado para su uso en la administración al colon.

Además, otro ejemplo de la composición que permite la administración al colon es una composición que garantiza la administración al colon retrasando la liberación del contenido en aproximadamente de 3 a 5 horas, que corresponde al tiempo de tránsito del intestino delgado. En un ejemplo de formulación de una preparación farmacéutica usando la composición para retrasar la liberación, se usa un hidrogel como cubierta. El hidrogel se hidrata y se hincha tras el contacto con el fluido gastrointestinal, de modo que se libera eficazmente el contenido. Además, las unidades de dosificación de liberación retardada incluyen composiciones que contienen fármaco que tienen un material que recubre

o recubre de manera selectiva un fármaco. Los ejemplos de un material de recubrimiento selectivo de este tipo incluyen polímeros degradables *in vivo*, polímeros hidrolizables de manera gradual, polímeros solubles en agua de manera gradual y/o polímeros degradables por enzimas. El material de recubrimiento preferido para retrasar de manera eficaz la liberación no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen polímeros a base de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, polímeros y copolímeros de ácido acrílico, tales como polímeros y copolímeros de ácido metacrílico, y polímeros y copolímeros de vinilo, tales como polivinilpirrolidona.

Los ejemplos de la composición que permite la administración al colon incluyen además composiciones bioadhesivas que se adhieren específicamente a la membrana mucosa del colon (por ejemplo, un polímero descrito en la memoria descriptiva de la patente estadounidense n.º 6.368.586), y composiciones en las que se incorpora un inhibidor de proteasas para proteger particularmente una preparación biofarmacéutica en los tractos gastrointestinales frente a la descomposición debida a la actividad de una proteasa.

Un ejemplo de un sistema que permite la administración al colon es un sistema de administración de una composición al colon mediante un cambio de presión de tal manera que se libera el contenido utilizando el cambio de presión provocado por la generación de gas en la fermentación bacteriana en la parte distal del estómago. Un sistema de este tipo no está particularmente limitado, y un ejemplo más específico del mismo es una cápsula que tiene el contenido disperso en una base de supositorio y que está recubierta con un polímero hidrófobo (por ejemplo, etilcelulosa).

Otro ejemplo del sistema que permite la administración al colon es un sistema de administración de una composición al colon, descomponiéndose específicamente el sistema por una enzima (por ejemplo, una hidrolasa de hidratos de carbono o una reductasa de hidratos de carbono) presente en el colon. Un sistema de este tipo no está particularmente limitado, y los ejemplos más específicos del mismo incluyen sistemas que usan componentes alimenticios tales como polisacáridos no amiláceos, amilosa, goma xantana y polímeros azoicos.

Cuando se usa como composición farmacéutica, la composición de la presente invención puede usarse en combinación con una composición farmacéutica ya conocida para su uso en inmunosupresión. Una composición farmacéutica conocida de este tipo no está particularmente limitada, y puede ser al menos una composición terapéutica seleccionada del grupo que consiste en corticosteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolina sódica, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos anti-IgE monoclonales, vacunas (preferiblemente vacunas usadas para la vacunación en las que la cantidad de alérgeno se aumenta de manera gradual), y combinaciones de los mismos. Es preferible usar estas composiciones terapéuticas en combinación con la composición de la presente invención.

Cuando la composición de la presente invención se usa como un alimento o una bebida, el alimento o la bebida puede ser, por ejemplo, un alimento saludable, un alimento funcional, un alimento para uso saludable especificado, un suplemento alimenticio, un alimento para pacientes o un pienso. El alimento o la bebida de la presente invención puede ingerirse en las formas de las composiciones tal como se describió anteriormente, y también puede ingerirse en las formas de diversos alimentos y bebidas. Los ejemplos específicos de los alimentos y las bebidas incluyen diversas bebidas tales como zumos, bebidas refrescantes, bebidas de té, preparaciones de bebidas, bebidas de gelatina y bebidas funcionales; bebidas alcohólicas tales como cervezas; alimentos que contienen hidratos de carbono tales como productos alimenticios de arroz, fideos, panes y pastas; productos de pasta tales como jamones de pescado, salchichas, productos de pasta de marisco; productos en bolsa esterilizados tales como curry, alimentos aderezados con salsas amiláceas espesas y sopas chinas; sopas; productos lácteos tales como leche, bebidas lácteas, helados, quesos y yogures; productos fermentados tales como pastas de soja fermentada, yogures, bebidas fermentadas y pepinillos; productos de judías; diversos productos de confitería tales como productos de confitería occidentales incluyendo panecillos, galletas, y similares, productos de confitería japoneses incluyendo bollos de mermelada de judías al vapor, gelatinas blandas de soja roja, y similares, caramelos, chicles, gominolas, postres fríos incluyendo gelatinas, flanes y postres congelados; alimentos instantáneos tales como sopas instantáneas y sopas de soja instantáneas; alimentos para cocinarse en microondas; y similares. Además, los ejemplos también incluyen alimentos y bebidas saludables preparados en las formas de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, líquidos, pastas y gelatinas. La composición de la presente invención puede usarse para animales incluyendo humanos. Los animales, distintos de humanos, no están particularmente limitados, y la composición puede usarse para diversos ganados, aves de corral, mascotas, animales de experimentación, y similares. Los ejemplos específicos de los animales incluyen cerdos, ganado bovino, caballos, ovejas, cabras, gallinas, patos silvestres, avestruces, patos domésticos, perros, gatos, conejos, hámsteres, ratones, ratas, monos, y similares, pero los animales no se limitan a los mismos.

Sin desear limitarse a la teoría, los individuos en los que la abundancia relativa de bacterias pertenecientes al grupo *Firmicutes* (el grupo al que pertenecen los grupos IV y XIVa de *Clostridium*) es mayor, ganan más peso corporal que los individuos en los que la abundancia relativa de bacterias pertenecientes al grupo *Bacteroidetes* es mayor. Por consiguiente, la composición de la presente divulgación es capaz de condicionar la absorción de nutrientes y mejorar la eficacia de alimentación. Desde tal punto de vista, la composición de la presente divulgación puede usarse para fomentar la ganancia de peso corporal, o para un pienso con buena eficacia de alimentación.

Además, la adición de la composición de la presente divulgación a un pienso libre de antibióticos permite aumentar el peso corporal de un sujeto que ingiere el pienso hasta un nivel igual a o mayor que los logrados por piensos que contienen antibióticos, y también permite reducir las bacterias patógenas en el estómago hasta un nivel igual a los logrados por piensos que contienen antibióticos típicos. Por consiguiente, la composición de la presente divulgación puede usarse para un pienso que no necesita la adición de antibióticos.

Además, a diferencia de las bacterias convencionales (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) en uso comercial que no son fáciles de incorporar en la producción de ganado, la composición de la presente invención en forma de esporas puede microgranularse, pulverizarse o mezclarse fácilmente con un pienso, y también puede añadirse a agua potable.

La alimentación de un pienso de este tipo que usa la composición descrita en el presente documento no está particularmente limitada, y el pienso puede alimentarse a un sujeto a intervalos regulares de manera selectiva, o puede alimentarse durante un determinado periodo (por ejemplo, en su nacimiento, durante el destete o cuando el sujeto que va a alimentarse se reubica o envía).

Además, desde el punto de vista descrito anteriormente, la composición de la presente divulgación puede usarse preferiblemente para humanos desnutridos. Dicho de otro modo, también cuando el sujeto que ingiere la composición es un humano, la composición puede usarse para fomentar la ganancia de peso corporal y potenciar la absorción de energía de los alimentos.

El alimento o la bebida puede fabricarse mediante una técnica de fabricación que se conoce bien en el campo técnico. Al alimento o a la bebida pueden añadirse uno o más componentes (por ejemplo, un nutriente) que sean eficaces para la mejora de una función inmunitaria mediante un efecto inmunosupresor. Además, el alimento o la bebida puede combinarse con otro componente u otro alimento funcional que presente una función distinta de la función de la mejora de una función inmunitaria para servir de ese modo como alimento o bebida multifuncional.

Además, la composición descrita en el presente documento puede incorporarse en alimentos que requieren una etapa de procesamiento que puede destruir las cepas probióticas ordinarias. Específicamente, la mayoría de cepas probióticas que pueden usarse comercialmente no pueden incorporarse en alimentos que necesiten procesarse mediante uno cualquiera de tratamiento térmico, almacenamiento a largo plazo, tratamiento de congelación, tratamiento de esfuerzo mecánico y tratamiento de alta presión (por ejemplo, extrusión o perfilado). Por otro lado, debido a una naturaleza ventajosa de formación de esporas, la composición de la presente invención puede incorporarse fácilmente en tales alimentos procesados.

Por ejemplo, las composiciones en forma de esporas pueden sobrevivir incluso en un alimento seco, y pueden permanecer vivas incluso después de ingerirse. Del mismo modo, la composición descrita en el presente documento puede soportar procedimientos de esterilización a baja temperatura, normalmente procedimientos a una temperatura en un intervalo de desde 70°C hasta el punto de ebullición, ambos inclusivos. Por tanto, la composición descrita en el presente documento puede incorporarse en todas las clases de productos lácteos. Además, la composición descrita en el presente documento puede soportar almacenamiento a largo plazo de muchos años; procesamiento a alta temperatura tal como horneado y ebullición; procesamiento a baja temperatura tal como congelación y almacenamiento en frío; y tratamientos de alta presión tales como extrusión y perfilado.

Los alimentos que necesitan procesarse en tales condiciones rigurosas no están particularmente limitados, y los ejemplos de los mismos incluyen alimentos que necesitan procesarse en un horno microondas para ser comestibles (por ejemplo, avena), alimentos que necesitan hornearse para ser comestibles (por ejemplo, magdalenas), alimentos que necesitan someterse a un tratamiento de esterilización a alta temperatura durante un corto periodo de tiempo para ser comestibles (por ejemplo, leche) y alimentos que necesitan calentarse para ser bebibles (por ejemplo, té caliente).

Cuando la composición se administra o ingiere, la cantidad de la misma para la administración o ingestión se selecciona según sea apropiado dependiendo de la edad, el peso corporal, los síntomas, los problemas de salud del sujeto, la clase de composición (un producto farmacéutico, un alimento o una bebida, o similares), y similares. Por ejemplo, la cantidad por administración o ingestión es generalmente de 0,01 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal. La presente divulgación también incluye un método para suprimir la inmunidad de un sujeto, caracterizándose el método porque las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o la sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias se administra en o ingiere por el sujeto tal como se describió anteriormente.

Puede proporcionarse un producto de la composición de la presente invención (un producto farmacéutico, un alimento o una bebida o un reactivo) o un manual del mismo con una nota que indique que el producto puede usarse para suprimir la inmunidad (incluyendo una nota que indique que el producto tiene un efecto inmunosupresor y una nota que indique que el producto tiene un efecto de supresión de la proliferación o función de células T efectoras). En este caso, la "provisión al producto o al manual del mismo con la nota" significa que la nota se proporciona a un cuerpo principal, un recipiente, un envase, o similares del producto, o la nota se proporciona a un manual, un prospecto del envase, un folleto u otros materiales impresos, que divulgan información sobre el producto.

<Método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras>

Tal como se describió anteriormente, y tal como se mostrará en los ejemplos, la administración de la composición descrita en el presente documento a un individuo permite inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en el individuo. Por tanto, la presente divulgación incluye un método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método una etapa de administrar, al individuo, al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

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

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

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

Obsérvese que, el "individuo" en la presente divulgación no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen humanos, diversas clases de ganado, aves de corral, mascotas, animales de experimentación, y similares. El "individuo" puede estar en un estado sano o un estado enfermo.

Además, tal como se mostrará en el ejemplo 5 que se describirá más adelante, las bacterias comensales Gram positivas desempeñan papeles principales en la proliferación o acumulación de células T reguladoras. Por consiguiente, la presente divulgación incluye un método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método una etapa de administrar un antibiótico contra bacterias Gram negativas al individuo.

Tal como se usa en el presente documento, el "antibiótico contra bacterias Gram negativas" no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen antibióticos de aminoglucósido (amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina y paromomicina), antibióticos de cefalosporina (cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona y cefoxotina), sulfonamidas, ampicilina y estreptomycin. Sin desear estar unido a una teoría, el "antibiótico contra bacterias Gram negativas" según la presente invención es preferiblemente uno que reduce las bacterias Gram negativas y contribuye a la colonización de bacterias Gram positivas.

Además, una composición prebiótica tal como piel de almendra, inulina, oligofructosa, rafinosa, lactulosa, pectina, hemicelulosa (tal como xiloglucano y alfa-glucanos), amilopectina y almidón resistente que no se descomponen en la parte alta del tracto gastrointestinal y fomentan el crecimiento de microbios intestinales en el tracto intestinal, así como factores de crecimiento tales como acetil-CoA, biotina, melazas de remolacha y extractos de lavadura, contribuyen a la proliferación de bacterias pertenecientes al género *Clostridium*. Por consiguiente, la presente divulgación incluye un método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método una etapa de administrar, al individuo, al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en estas sustancias.

Mientras tanto, en un "método para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras", la composición de la presente divulgación, el "antibiótico contra bacterias Gram negativas" descrito anteriormente y la "composición prebiótica o el factor de crecimiento" descrito anteriormente pueden usarse en combinación. Tal uso combinado no está particularmente limitado, y los ejemplos del uso combinado son los siguientes: el "antibiótico contra bacterias Gram negativas" se administra a un individuo de antemano, y luego se administra la composición de la presente invención; el "antibiótico contra bacterias Gram negativas" y la composición de la presente invención se administran simultáneamente a un individuo; la "composición prebiótica o el factor de crecimiento" se administra a un individuo de antemano, y luego se administra la composición de la presente invención; la "composición prebiótica o el factor de crecimiento" y la composición de la presente invención se administran simultáneamente a un individuo; la composición de la presente invención, el "antibiótico contra bacterias Gram negativas" y la "composición prebiótica o el factor de crecimiento" se administran a un individuo simultáneamente o de manera individual en cualquier momento apropiado.

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

Una composición terapéutica de este tipo no está particularmente limitada, y puede ser al menos una composición terapéutica seleccionada del grupo que consiste en corticosteroides, mesalazina, mesalamina, sulfasalazina, derivados de sulfasalazina, fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, mercaptopurina, azatiopurina, prednisona, metotrexato, antihistaminas, glucocorticoides, epinefrina, teofilina, cromolina sódica, antileucotrienos, fármacos anticolinérgicos para la rinitis, descongestivos anticolinérgicos, estabilizadores de mastocitos, anticuerpos anti-IgE monoclonales, vacunas (preferiblemente, vacunas usadas para la vacunación en las que la cantidad de alérgeno se aumenta de manera gradual), y combinaciones de los mismos. Es preferible usar estas composiciones terapéuticas

en combinación con la sustancia descrita anteriormente.

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

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

Obsérvese que los ejemplos de un método para detectar tal expresión incluyen transferencia de tipo Northern, RT-PCR y transferencia por puntos para la detección de la expresión génica a nivel de transcripción; y ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, inmunoprecipitación y citometría de flujo para la detección de la expresión génica a nivel de traducción.

Mientras tanto, una muestra usada para medir un índice de este tipo no está particularmente limitada, y los ejemplos de la misma incluyen sangre muestreada de un individuo y partes de tejido obtenidas en una biopsia.

<Método para predecir la respuesta de un individuo a la composición de la presente invención y/o el pronóstico de un individuo>

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

También se describe un método para predecir la respuesta de un sujeto a una sustancia y/o el pronóstico de un sujeto.

El método comprende medir el porcentaje o las cantidades absolutas de los grupos IV y XIV de *Clostridium* en la microbiota del sujeto y compararlos con un valor de referencia de las mismas mediciones en un sujeto sano prototipo, en el que una cantidad absoluta o un nivel de porcentaje disminuido de los grupos IV y/o XIV de *Clostridium* indica que el sujeto puede responder de manera favorable a las composiciones descritas en el presente documento.

El método puede comprender además medir la composición de la microbiota del sujeto después de la administración de la sustancia, en el que un aumento del porcentaje o número absoluto de *Clostridium* spp. pertenecientes a los grupos IV, XIV después de la administración de las composiciones de la presente invención con respecto a antes de la administración es un indicador positivo de inmunosupresión (o inmunorregulación) potenciada. La medición de la composición de la microbiota de un sujeto puede realizarse con técnicas conocidas en la técnica, tal como secuenciación de ARNr 16S.

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

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

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

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

(d) un antibiótico contra bacterias Gram negativas; y

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

<Método para inhibir la proliferación o acumulación de células T reguladoras>

Tal como se mostrará en el ejemplo 5 que se describirá más adelante, las bacterias comensales Gram positivas desempeñan papeles principales en la proliferación o acumulación de células T reguladoras. Por consiguiente, la presente divulgación también incluye un método para inhibir la proliferación o acumulación de células T reguladoras en un individuo, comprendiendo el método una etapa de administrar un antibiótico contra bacterias Gram positivas al individuo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “antibiótico contra bacterias Gram positivas” no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen antibióticos de cefalosporina (cefalexina, cefuroxima, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil y ceftobiprol); antibióticos de fluoroquinolona (Cipro, Levaquin, floxina, tequina, Avelox y Norflox); antibióticos de tetraciclina (tetraciclina, minociclina, oxitetraciclina y doxiciclina); antibióticos de penicilina (amoxicilina, ampicilina, penicilina V, dicloxacilina, carbenicilina, vancomicina y meticilina); y antibióticos de carbapenem (ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina y meropenem).

Tal como se describió anteriormente, el término “individuo” no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen humanos, diversas clases de ganado, aves de corral, mascotas, animales de experimentación, y similares. El “individuo” puede estar en un estado sano o un estado enfermo. Un estado enfermo de este tipo no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen estados de estar sometido a inmunoterapia contra el cáncer y de padecer una enfermedad infecciosa.

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

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

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

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

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

Tal como se describió anteriormente, y tal como se mostrará en el ejemplo 15 que se describirá más adelante, la inducción de células Treg en el colon por *Clostridium* tiene un papel importante en respuestas inmunitarias locales y sistémicas. Por consiguiente, la presente divulgación incluye una “composición de vacuna que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) : (a) bacterias pertenecientes al género *Clostridium*; (b) una espora de bacterias en una fracción de formación de esporas de una muestra fecal obtenida de un mamífero; y (c) bacterias en una fracción tratada con cloroformo de una muestra fecal obtenida de un mamífero”, y un “método para tratar, ayudar en el tratamiento, reducir la gravedad de o prevenir al menos una enfermedad seleccionada de enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias en un individuo, comprendiendo el método administrar la composición de vacuna al individuo”.

Obsérvese que tales “enfermedades autoinmunitarias” no están particularmente limitadas, y los ejemplos de las mismas incluyen aquellas descritas como los “ejemplos específicos de enfermedades objetivo” en <Composición que tiene efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras>. Las “enfermedades infecciosas” tampoco están particularmente limitadas, y los ejemplos de las mismas incluyen enfermedades infecciosas asociadas con los “patógenos infecciosos” descritos como los “ejemplos de patógenos infecciosos” en < Composición que tiene efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras>.

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

También se describe un método para seleccionar un compuesto que tiene una actividad para fomentar la proliferación o acumulación de células T reguladoras, comprendiendo el método:

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

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

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

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

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

10

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

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

15

(5) detectar células que expresan el gen indicador en un grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ del mamífero no humano que no ha estado en contacto con la sustancia de prueba, y determinar el número de células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que expresan el gen indicador o una razón de células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que expresan el gen indicador con respecto a células en el grupo de células CD4⁺ Foxp3⁺ que no expresan el gen indicador; y

20

(6) comparar los números absolutos o las razones determinadas en las etapas (4) con el número o la razón determinada en (5), y determinar, cuando el número o la razón determinada en (4) es mayor que la determinada en (5), que la sustancia de prueba es un compuesto que fomenta la proliferación o acumulación de células Treg.

25

El término "sustancia de prueba", tal como se usa en el presente documento, no está particularmente limitado, siempre que la sustancia de prueba sea una sustancia preparada a partir de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en las sustancias (a) a (c). Los ejemplos de la sustancia de prueba incluyen proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos que se derivan de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en las sustancias (a) a (c) descritas anteriormente.

30

El término "mamífero no humano en el que va a expresarse un gen indicador bajo el control de la expresión del gen de IL-10", tal como se usa en el presente documento, no está particularmente limitado, siempre que el mamífero no humano sea un mamífero no humano que tiene un gen indicador cuya expresión está controlada por una región de control de la expresión del gen de IL-10 (por ejemplo, un promotor o un potenciador). Los ejemplos de un gen indicador de este tipo incluyen genes que codifican para proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) y genes que codifican para luciferasa. Como "mamífero no humano en el que va a expresarse un gen indicador bajo el control de la expresión del gen de IL-10" según la presente invención, puede usarse preferiblemente un ratón Il10^{venus} que se mostrará más adelante en los ejemplos.

35

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

45

También se describe un mamífero no humano que se usa para el método, y en el que el gen indicador va a expresarse bajo el control de la expresión del gen de IL-10.

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

50

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

55

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

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

60

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

65

También se describe un método para determinar la composición de una microbiota en un individuo, en el que el aumento de la razón o el número absoluto de bacterias pertenecientes al género *Clostridium* después de la administración de la composición de la presente invención al individuo con respecto a la razón o el número absoluto antes de la administración se usa como índice de inmunosupresión aumentada. En un método de este tipo, el método para determinar la composición de la microbiota no está particularmente limitado, y pueden usarse técnicas conocidas (por ejemplo, secuenciación de ARNr 16S) según sea apropiado.

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

Además, la composición descrita en el presente documento también puede administrarse a un individuo bajo un tratamiento con antibióticos. La programación temporal de la administración no está particularmente limitada, y la composición puede administrarse, por ejemplo, antes de o simultáneamente con el tratamiento con antibióticos. Mientras tanto, la composición se administra preferiblemente en la forma de esporas desde el punto de vista de resistencia al tratamiento con antibióticos.

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

Mientras tanto, en otro modo preferido de tal administración, la composición se administra, por ejemplo, después de (o simultáneamente con) un tratamiento usando vancomicina, metronidazol, linezolid, ramoplanina o fidaxomicina.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe más específicamente basándose en los ejemplos. Sin embargo, la presente invención se define en las reivindicaciones.

Obsérvese que los ratones usados en los ejemplos se prepararon o produjeron de la siguiente manera. En la siguiente descripción, puede hacerse referencia a los ratones con "SPF" o "GF" unido detrás de los mismos. Estos "SPF" y "GF" indican que los ratones se mantuvieron en ausencia de bacterias patógenas específicas (libres de patógenos específicos, SPF) y que los ratones se mantuvieron en condiciones asépticas (GF, *germ-free*), respectivamente.

<Ratones>

Los ratones C57BL/6, Balb/c e IQI mantenidos en condiciones SPF o GF se adquirieron de Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Japón), JAPAN SLC, INC. (Japón), CLEA JAPAN, Inc. (Japón) o Jackson Laboratory (EE.UU.). Los ratones GF y los ratones gnotobióticos se criaron y mantuvieron dentro de la instalación gnotobiótica de la Universidad de Tokio, Instituto Central de Yakult para investigación microbiológica, o Sankyo Labo Service Corporation, Inc. Los ratones *Myd88*^{-/-}, *Rip2*^{-/-} y *Card9*^{-/-} se produjeron tal como se describe en los documentos no de patente 1 a 3, y se sometieron a retrocruzamiento durante 8 generaciones o más, de modo que se logró un acervo genético C57BL/6. Los ratones *Foxp3*^{egFP} se adquirieron de Jackson Laboratory.

<Ratones *Il10*^{venus}>

Para formar un locus bicistrónico que codifique tanto para *Il10* como para Venus bajo el control de un promotor de *Il10*, se creó en primer lugar un constructo de direccionamiento. Específicamente, se insertó un casete (casete de señales IRES-Venus-SV40 poliA, al que se hace referencia en el documento no de patente 4), que se elaboró a partir de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), una proteína fluorescente amarillo (Venus) y una señal SV40 poliA (SV40 poliA) y que se dispuso a continuación del resistente a la neomicina (neo), entre un codón de parada y una señal poliA (exón 5) de un gen *Il10*. A continuación, se usó el constructo de direccionamiento obtenido para provocar la recombinación homóloga con la región del gen *Il10* en el genoma de ratones. Por tanto, se produjeron ratones *Il10*^{venus} que tenían alelos *Il10*^{venus} (a los que se hace referencia en la figura 1). Obsérvese que, en la figura 1, "tk" representa un gen que codifica para timidina cinasa, "neo" representa el gen resistente a la neomicina y "BamH1" representa un sitio de escisión por la enzima de restricción BamH1.

Se extrajeron ADN genómicos de los ratones *Il10*^{venus}, se trataron con BamH1 y se sometieron a transferencia de tipo Southern mediante el uso de una sonda mostrada en la figura 1. La figura 2 muestra los resultados obtenidos. Se detectaron alelos de tipo natural e *Il10*^{venus} como bandas que tenían tamaños de 19 kb y 5,5 kb, respectivamente. Por

tanto, tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 2, se encontró que la recombinación homóloga mostrada en la figura 1 se produjo en el genoma de los ratones IL10^{venus}.

Además, se clasificaron células CD4⁺ Venus⁻ o células CD4⁺ Venus⁺ en la lámina propia del colon de los ratones IL10^{venus} mediante el uso de un dispositivo FACSaria. Después se llevó a cabo RT-PCR en tiempo real en un sistema ABI 7300 mediante un método que se describirá más adelante, para determinar la cantidad de ARNm de IL-10 expresado. Las figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos. Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 3 y 4, se encontró que, dado que el desarrollo del ARNm de IL-10 se detectó sólo en las células CD4⁺ Venus⁺, la expresión de ARNm de IL-10 en los ratones IL10^{venus} se reflejó de manera correcta en la expresión de Venus. Obsérvese que los estados asépticos de tales ratones IL10^{venus} se establecieron en el Instituto Central para animales de experimentación (Kawasaki, Japón). Los ratones IL10^{venus} en estados asépticos se mantuvieron en aisladores de vinilo en Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Tokio, Japón), y se usaron en los siguientes ejemplos.

Mientras tanto, los experimentos y los análisis en los ejemplos se llevaron a cabo de la siguiente manera.

<Método para la colonización de ratones con bacterias y análisis de los mismos>

Según la descripción en los documentos no de patente 5 y 6, se produjeron ratones en los que se colonizaron SFB o *Clostridium*. Se disolvió el contenido del ciego o las heces de los ratones gnotobióticos obtenidos en agua estéril o una disolución de dilución anaerobia. Se administraron por vía oral el contenido del ciego o las heces disueltas tal como eran o después de un tratamiento con cloroformo a ratones GF. Se cultivaron por separado entre sí tres cepas de *Lactobacillus* y 16 cepas de *Bacteroides* en un medio de agar EG o BL de manera anaerobia. Se recogieron las bacterias cultivadas, se suspendieron en un caldo TS anaerobio y se administraron por vía oral de manera forzada a ratones GF. Se evaluó el estado de la colonización de las bacterias en los ratones mediante observación por microscopio realizada en una preparación de frotis de microgránulos fecales.

<Separación de células y citometría de flujo>

Con el fin de aislar linfocitos de la lámina propia del colon y de la lámina propia del intestino delgado, se recogieron el intestino delgado y el colon y se abrieron longitudinalmente. Después se lavaron para retirar el contenido fecal y similares del interior de los mismos. Posteriormente, se agitaron el intestino delgado y el colon en HBSS que contenía 5 mM de EDTA a 37°C durante 20 minutos. Después de la retirada del epitelio y del tejido adiposo, se cortaron los tejidos intestinales en trozos pequeños. A los trozos pequeños se les añadió RPMI 1640 (suero bovino fetal (FBS) al 4%, 1 mg/ml de colagenasa D, 0,5 mg/ml de dispasa y 40 µg/ml de DNasa I (todos ellos se fabricaron por Roche Diagnostics K.K.)), y se agitó la mezcla en un baño de agua mantenido a 37°C durante 1 hora. Se lavaron los tejidos diferidos con HBSS que contenía 5 mM de EDTA, y se resuspendieron en 5 ml de Percoll al 40% (GE Healthcare). Se superpuso la suspensión en 2,5 ml de Percoll al 80% en un tubo Falcon de 15 ml. Después se llevó a cabo la centrifugación a temperatura ambiente y a 2000 rpm durante 20 minutos para llevar a cabo la separación de células mediante centrifugación por gradiente de densidad Percoll. Se recogieron las células en la superficie de contacto y se usaron como linfocitos de la lámina propia. Se suspendieron las células recogidas en un tampón de tinción (PBS, FBS al 2%, EDTA 2 mM y Na₃N al 0,09%) y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo anti-CD4 (RM4-5, BD Biosciences) marcado con PE o PE-Cy7. Después de la tinción de CD4, se tiñeron Foxp3 en las células mediante el uso del kit Cytofix/Cytoperm Plus con GolgiStop (BD Biosciences) o el conjunto de tampón de tinción de Foxp3 (eBioscience), así como un anticuerpo anti-Foxp3 (FJK-16s, eBioscience) marcado con Alexa647. Se realizó citometría de flujo mediante el uso de un dispositivo FACSCanto II, y los datos se analizaron mediante el software FlowJo (TreeStar Inc.). La clasificación de las células se realizó mediante el uso de un dispositivo FACSaria.

<RT-PCR en tiempo real>

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

Foxp3

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

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

CTLA4

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

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

GITR

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

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

IL-10

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

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

GAPDH

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

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

Mmp2

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

5'-CTTGTCACGTGGTGTCACTG-3' (SEQ ID NO: 12)

Mmp9

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

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

Mmp13

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

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

Idol

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

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

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

En primer lugar, se recogió el colon, se abrió longitudinalmente y se enjuagó con PBS. Posteriormente, se trató el colon con ditioneitol (DTT) 1 mM a 37°C durante 30 minutos en un agitador, y luego se agitó con vórtex durante un minuto para alterar la integridad epitelial. Se recogieron las IEC liberadas y se suspendieron en 5 ml de Percoll al 20%. Se superpuso la suspensión en 2,5 ml de Percoll al 80% en un tubo Falcon de 15 ml. Después se centrifugó el tubo a 25°C y 780 g durante 20 minutos para llevar a cabo la separación de células mediante centrifugación por gradiente de densidad Percoll. Se recogieron las células en la superficie de contacto y se usaron como IEC del colon (pureza: 90% o mayor, viabilidad: 95%). Se suspendieron las IEC obtenidas recogidas de ese modo en RPMI que contenía FBS al 10%, y se cultivaron 1x10⁵ células de las IEC en una placa de 24 pocillos durante 24 horas. Después de eso, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió para determinar el nivel de TGF-β1 activo mediante ELISA (Promega).

Mientras tanto, para cultivar las células T *in vitro*, se cultivaron 1,5x10⁵ células T CD4⁺ del bazo purificadas mediante MACS en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, junto con un medio acondicionado al 50% en el que se cultivaron IEC aisladas de ratones GF o ratones colonizados con *Clostridium*, y con 25 ng/ml de hIL-2 (Peprotech), en presencia o ausencia de 25 µg/ml de un anticuerpo anti-TGF-β (R&D). Obsérvese que se unieron 10 µg/ml de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 (BD Bioscience) a la placa de fondo redondo. Después de un cultivo de 5 días, se recogieron las células T CD4⁺ y se sometieron a PCR en tiempo real.

<Modelo experimental de colitis>

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

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

Mientras tanto, para preparar un modelo de colitis inducida por oxazolona, se sensibilizaron previamente los ratones mediante la aplicación transdérmica sobre los ratones de 150 µl de una disolución de oxazolona al 3% (4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona, Sigma-Aldrich)/etanol al 100%. Cinco días después de eso, se inyectó por vía intrarrectal 150 µl de una disolución de oxazolona al 1%/etanol al 50% de nuevo a los ratones sensibilizados previamente con una ligera anestesia. Obsérvese que la administración intrarrectal se llevó a cabo usando un catéter de 3,5 F.

Se analizó cada ratón diariamente para determinar el peso corporal, la sangre oculta, el sangrado visible con a simple vista (sangre macroscópica) y la dureza de las deposiciones. Además, se evaluaron numéricamente el porcentaje de pérdida de peso corporal, el sangrado intestinal (no sangrado, sangre oculta (hemocult+) o sangrado visible a simple vista) y la dureza de las deposiciones (deposición normal, deposición semilíquidas o diarrea) y se calculó el índice de actividad de la enfermedad (DAI, por sus siglas en inglés) según la descripción en "S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M. F. Neurath, Nat Protoc 2, 541 (2007)".

<Reacción de IgE específica de OVA>

Se inocularon ratones BALB/c SPF con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium* (2 semanas de edad) y se hicieron crecer en un entorno convencional. Después se inyectó por vía intraperitoneal 1 mg de OVA (grado V, Sigma) y 2 mg de alumbre (Thermo Scientific), 0,2 ml en total, a los ratones (a sus edades de 4 semanas y 6 semanas). Se recogieron sueros cada semana de los ratones de la raíz de su cola y se midió la IgE específica de OVA mediante ELISA (Chondrex). Después, a sus edades de 8 semanas, se recogieron células del bazo, se inocularon en una placa de 96 pocillos a 1x10⁶ células por pocillo y se estimularon con OVA (100 µg/ml) durante tres días. Después de eso, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió para determinar los niveles de IL-4 e IL-10 mediante ELISA (R&D).

<Análisis estadístico>

La diferencia entre los grupos de control y experimental se evaluó mediante la prueba de la t de Student.

(Ejemplo 1)

En primer lugar, se investigó si la acumulación de células T reguladoras (células Treg) en la lámina propia del colon era dependiente o no de las bacterias comensales. Específicamente, se aislaron linfocitos de los ganglios linfáticos periféricos (pLN) de ratones Balb/c criados en ausencia de bacterias patógenas específicas (SPF) o de la lámina propia del colon o del intestino delgado (SI) de los ratones. Se tiñeron CD4 y Foxp3 mediante anticuerpos. Después se analizó la razón de células Foxp3⁺ en linfocitos CD4⁺ mediante citometría de flujo. La figura 5 muestra los resultados obtenidos. Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 5, se encontró que las células Treg Foxp3⁺ estaban presentes a una alta frecuencia en la lámina propia de los tractos gastrointestinales, especialmente en la lámina propia del colon, de ratones mantenidos en un entorno libre de microorganismos patógenos específicos (SPF). Además, también se encontró que el número de células Treg Foxp3⁺ en la lámina propia del colon aumentó de manera gradual hasta tres meses después de su nacimiento, mientras que el número de células Treg Foxp3⁺ en los ganglios linfáticos periféricos fue básicamente constante desde el momento de dos semanas después de su nacimiento.

(Ejemplo 2)

A continuación, se investigó si la acumulación temporal de células Treg en el colon tal como se encontró en el ejemplo 1 tenía o no una relación con la colonización de la microbiota comensal intestinal. Específicamente, se analizaron la expresión de CD4 y la expresión de Foxp3 en linfocitos aislados del intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos periféricos de ratones criados en un entorno aséptico (GF) o SPF (8 semanas de edad: ratones Balb/c, ratones IQ1 y ratones C57BL/6). Se obtuvieron resultados similares en tres o más experimentos independientes. Las figuras 6 y 7 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la figura 7, cada círculo blanco representa el número absoluto de células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, y las barras de error representan las desviaciones estándar (DE).

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

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

ampicilina (A; 500 mg/l, Sigma)

vancomicina (V; 500 mg/l, NACALAI TESQUE, INC.)

metronidazol (M; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

neomicina (N; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, Cell 118, 229 (23 de julio de 2004)

Fagarasan *et al.*, Science 298, 1424 (15 de noviembre de 2002).

En la figura 9, cada círculo blanco representa el número absoluto de Células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, cada barra horizontal representa el valor promedio de los números absolutos, * indica que "P < 0,01" y "AVMN" representa las clases de antibióticos administrados usando las primeras letras de los antibióticos.

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 6 a 9, las frecuencias y los números absolutos de células CD4⁺ Foxp3⁺ en el intestino delgado y los ganglios linfáticos periféricos de ratones GF fueron iguales a o mayores que los de ratones SPF (véanse las figuras 6 a 8). Además, los números de células Treg en la del lámina propia del intestino delgado, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones SPF a los que se les administraron por vía oral los antibióticos durante ocho semanas fueron iguales a o mayores que los de ratones SPF (véase la figura 9). Mientras tanto, el número de células CD4⁺ Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de ratones GF disminuyó significativamente en comparación con el de ratones SPF (véanse las figuras 6 y 7). Esta disminución se observó comúnmente entre ratones de diferentes acervos genéticos (Balb/c, IQI y C57BL/6), así como entre ratones criados en diferentes instalaciones para animales (véase la figura 7 para los datos en cuanto a los diferentes acervos genéticos, los datos en cuanto a los ratones criados en las diferentes instalaciones para animales no se muestran en los dibujos). Además, también se mostró que el número de células Treg en la lámina propia del colon de los ratones C57BL/6 SPF a los que se les administraron los antibióticos disminuyó significativamente (véase la figura 9).

(Ejemplo 3)

A continuación, se comprobó directamente si la disminución en el número de células Treg en la lámina propia del colon de los ratones GF mostrada en el ejemplo 2 se atribuía o no a la ausencia de microbiota. Específicamente, se administró por vía oral una suspensión fecal de ratones B6 SPF adquiridos de Jackson Laboratory a ratones IQI GF (convencionalización). Tres semanas después de la administración, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon y se analizó la expresión de Foxp3 en linfocitos CD4⁺. Las figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que cada círculo blanco en la figura 11 representa el número absoluto de células CD4⁺ Foxp3⁺ en un ratón individual, las barras de error representan las desviaciones estándar (DE), * indica que "P < 0,01" en la prueba de la t de Student y ** indica que "P < 0,001". Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 10 y 11, el número de células Treg en la lámina propia del intestino delgado no cambió. Sin embargo, el número de células Treg en la lámina propia del colon aumentó significativamente. Por tanto, se mostró que la interacción entre el huésped y los microbios desempeñaba un papel importante en la acumulación de células Treg Foxp3⁺ en la lámina propia del colon, mientras que la acumulación de células Treg en la lámina propia del intestino delgado tenía un mecanismo diferente.

(Ejemplo 4)

A continuación, se investigó la relación entre los tejidos linfáticos asociados al intestino de ratones y el número de células Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de los ratones según el método descrito en M. N. Kweon *et al.*, J Immunol 174, 4365 (1 de abril de 2005). Específicamente, se inyectaron por vía intraperitoneal 100 µg de una proteína recombinante del dominio extracelular (una proteína de fusión (LTβR-Ig) entre un receptor de linfotóxina β (LTβR) y una región Fc de IgG1 humana, véase Honda *et al.*, J Exp Med 193, 621 (5 de marzo de 2001)) en ratones C57BL/6 gestantes 14 días después de la concepción. Se inyectó de nuevo por vía intraperitoneal LTβR-Ig en los fetos obtenidos de tales ratones, de modo que se produjeron ratones de los que se retiraron por completo folículos linfáticos aislados (ILF), placas de Peyer (PP) y placas del colon (CP). Después se analizaron las razones de células Foxp3⁺ en células CD4⁺ en la lámina propia del colon de ratones tratados con LTβR-Ig y de ratones tratados con IgG de rata (control)

mediante FACS. La figura 12 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la figura 12, cada círculo blanco representa la razón de células Foxp3⁺ en un ratón individual y las barras de error representan las desviaciones estándar. Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 12, se encontró que la razón de células Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de ratones deficientes en folículos linfáticos aislados, placas de Peyer y placas del colon (ratones tratados con LT β R-Ig) aumentó bastante. Por consiguiente, se sugirió que la disminución en el número de células Treg en la lámina propia del colon de ratones GF y ratones tratados con los antibióticos era debida a la transmisión de señales específicas que fomenta la acumulación de células Treg en la lámina propia del colon y la que está provocada por los microbios intestinales no se produjo, en lugar de simplemente debido a un efecto secundario de tejidos linfáticos asociados al intestino desordenados.

(Ejemplo 5)

Para investigar si la flora intestinal específica inducía o no la acumulación de células Treg del colon, se administró vancomicina como antibiótico contra bacterias Gram positivas o polimixina B como antibiótico contra bacterias Gram negativas a ratones SPF (de 4 semanas de edad) durante cuatro semanas y se analizó para determinar la razón de células Foxp3⁺ en el grupo de células CD4⁺ ([%] de Foxp3⁺ en CD4). La figura 30 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la figura 30, "SPF" indica el resultado de ratones SPF (control), "poli B" indica el resultado de ratones SPF a los que se les administró polimixina B y "Vanco." indica el resultado de ratones SPF a los que se les administró vancomicina. Mientras tanto, * indica que "P < 0,01".

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 30, el número de células Treg en el colon de ratones a los que se les administró vancomicina disminuyó de manera notable en comparación con el del control. Por el contrario, no se observó ninguna influencia en el número de células Treg de ratones a los que se les administró polimixina B. Esos hechos sugirieron que las bacterias comensales Gram positivas desempeñaban un papel principal en la acumulación de células Treg.

(Ejemplo 6)

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

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 31, tres semanas después de la administración de las heces tratadas con cloroformo, el número de células Treg en los ratones administrados aumentó de manera notable hasta el mismo nivel que el de ratones SPF y ratones GF a los que se les administró de manera forzada heces sin tratar (véanse las figuras 7 y 11).

Por consiguiente, teniendo en cuenta los resultados mostrados en el ejemplo 5 en combinación, se reveló que los componentes específicos de la microbiota endógena tenían una alta probabilidad de pertenecer al grupo de Gram positivas y que la fracción de formación de esporas desempeñaba un papel importante en la inducción de células Treg.

(Ejemplo 7)

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

La figura 13 muestra gráficos de puntos de FACS obtenidos cuando se estableció una ventana de adquisición en células CD4⁺ de ratones Balb/c. La figura 14 muestra la razón de células Foxp3⁺ en células CD4⁺ de cada ratón.

Obsérvese que, las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* se clasifican mediante secuenciación del gen de ARNr 16S de la siguiente manera. Específicamente, se amplificaron los genes de ARNr 16S de las bacterias mediante PCR usando pares de cebadores específicos de genes de ARNr 16S: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 19) y 5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEQ ID NO: 20) (véase T. Aebischer *et al.*, Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46,221-229(2006)).

Después se introdujo el producto de PCR de 1,5 kb en el vector pCR-Blunt. Se secuenciaron los insertos y se alinearon usando el programa de software ClustalW. Las secuencias resultantes de los genes de ARNr 16S derivados de la cepa 1-41 de 46 cepas de *Clostridium* spp. se mostraron en SEQ ID NO: 21-61. El árbol filogenético que se construyó mediante el método de unión de vecinos con las secuencias resultantes de las 41 cepas de *Clostridium* y las de bacterias conocidas obtenidas de la base de datos Genbank usando el software Mega se mostró en la figura 49.

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 13 y 14, no se observó ningún efecto sobre el número de las células Treg en el colon en ratones GF en los que se colonizaron bacterias filamentosas segmentadas (SFB) (véase la figura 14). Además, ratones en los que se colonizó el cóctel de tres cepas de *Lactobacillus* dieron resultados similares (véase la figura 14). Por otro lado, se mostró que la acumulación de células Foxp3⁺ en la lámina propia del colon se indujo fuertemente en ratones en los que se colonizaron 46 cepas de *Clostridium* spp. De manera importante, tal acumulación se fomentó independientemente de los acervos génicos de los ratones, y condujo a un aumento en número similar al de ratones SPF a pesar de que sólo se colonizó microbiota intestinal de un solo género. También se mostró que la colonización de *Clostridium* no cambió el número de células Treg en la lámina propia del intestino delgado (véase la figura 14). Obsérvese que, cuando se colonizaron las 16 cepas de *Bacteroides* spp., el número de células Treg en el colon aumentó significativamente. Sin embargo, el grado del aumento varió en función del acervo génico de los ratones en los que se colonizaron las bacterias (véanse las figuras 13 y 14).

(Ejemplo 8)

A continuación, se analizaron la expresión de CD4, la expresión de Foxp3 y la expresión de Helios en linfocitos LP del timo y del colon de ratones SPF, ratones GF, ratones colonizados con *Lactobacillus* y ratones colonizados con *Clostridium* mediante citometría de flujo.

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

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 32 y 33, la mayoría de células Foxp3⁺ encontradas en ratones SPF o ratones colonizados con *Clostridium* no expresaron Helios. Obsérvese que Helios es un factor de transcripción que se sabe que se expresa en células Treg naturales derivadas del timo (véase A. M. Thornton *et al.*, J Immunol 184, 3433 (1 de abril de 2010)). Por consiguiente, se sugirió que la mayoría de células Treg en ratones SPF y ratones colonizados con *Clostridium* eran células Treg inducidas en porciones periféricas, es decir, las denominadas células iTreg.

(Ejemplo 9)

A continuación, se investigó si la colonización de *Clostridium* o similar influía o no en otras células T. Específicamente, se colonizaron SFB, 16 cepas de *Bacteroides* spp. (Bactero.), 46 cepas de *Clostridium* spp. (Clost.) o microbiota recogida de ratones criados en un entorno convencional (SPF) en ratones IQI GF. Tres semanas después, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon de estos ratones, y se estimularon con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1 µg/ml) durante cuatro horas en presencia de Golgistop (BD Bioscience). Después de proporcionar estimulación, se tiñeron las citocinas intracelulares usando un anticuerpo anti-IL-17 de PE (TC11-18H10) y un anticuerpo anti-IFN-γ de FITC (BD Bioscience) según el manual de un kit Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience). Después se analizó la razón de células IFN-γ⁺ o células IL-17⁺ en leucocitos CD4⁺ mediante citometría de flujo. Las figuras 15 y 16 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las figuras 15 y 16, cada círculo blanco representa el número absoluto de células CD4⁺ IFN-γ⁺ o el número absoluto de células CD4⁺ IL-17⁺ en cada ratón individual y las barras de error representan las desviaciones estándar (DE). Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 15 y 16, la colonización de *Clostridium* no influyó en células Th1 (células CD4⁺ IFN-γ⁺) en el colon y sólo provocó un ligero aumento de células Th17 (células CD4⁺ IL-17⁺). Por consiguiente, se sugirió que el género *Clostridium* era un género de bacterias que inducía específicamente células Treg.

(Ejemplo 10)

Se ha informado que 46 cepas de *Clostridium* spp. influyen en la acumulación de linfocitos intraepiteliales (IEL) CD8⁺ del tracto intestinal en el colon. Por consiguiente, es concebible que *Clostridium* regule el sistema inmunitario en diversos aspectos, y que *Clostridium* presente una capacidad notable para inducir y mantener células Treg especialmente en el colon, tal como se describió anteriormente. Además, se sabe que una clase de citocinas, el factor de crecimiento transformante β (TGF-β), desempeña un papel importante en la regulación de la generación de células Treg.

A este respecto, se examinó si la colonización de *Clostridium* proporcionaba o no un entorno en el colon rico en TGF-

β. Específicamente, en primer lugar, se cultivó el colon completo de ratones GF, ratones colonizados con *Clostridium* y ratones colonizados con *Lactobacillus* durante 24 horas, y se midieron los sobrenadantes de cultivo de los mismos para determinar la concentración de TGF-β activo (TGF-β1) mediante ELISA (el número de ratones analizados fue de cuatro por grupo). La figura 34 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la figura 34, "GF" indica el resultado de ratones GF, "Clost." indica el resultado de ratones colonizados con *Clostridium* y "Lacto." indica el resultado de ratones colonizados con *Lactobacillus*. Mientras tanto, * indica que "P < 0,02", y ** indica que "P < 0,001".

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 34, la cantidad de TGF-β producido en el colon de ratones colonizados con *Clostridium* era significativamente mayor que las de ratones GF y ratones colonizados con *Lactobacillus*.

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

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

A continuación, tal como se describió anteriormente, se cultivaron células T CD4⁺ del bazo durante cinco días junto con un medio acondicionado al 50% en el que se cultivaron IEC aisladas de ratones GF o ratones colonizados con *Clostridium*, y con el anticuerpo anti-CD3, en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TGF-β. Después se recogieron las células T y se analizaron para determinar la expresión de Foxp3 mediante RT-PCR en tiempo real. La figura 36 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la figura 36, "Medio" indica el resultado de un medio en el que no se cultivaron células, "GF" indica el resultado del medio acondicionado en el que se cultivaron IEC de ratones GF, "Clost." indica el resultado del medio acondicionado en el que se cultivaron IEC de ratones colonizados con *Clostridium* y "Clost. + αTGFβ" indica el resultado del medio acondicionado al que se le añadió el anticuerpo anti-TGF-β y en el que se cultivaron IEC de ratones colonizados con *Clostridium*. Mientras tanto, ** indica que "P < 0,001".

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 36, cuando se añadió el sobrenadante de cultivo de las IEC derivadas de ratones colonizados con *Clostridium* a células T CD4⁺ del bazo, se aceleró la diferenciación en células que expresan Foxp3. Mientras tanto, la diferenciación en las células Treg se inhibió mediante el anticuerpo anti-TGF-β.

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

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

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 37 a 39, de acuerdo con la producción de TGF-β descrita anteriormente, se expresaron los productos de transcripción de los genes que codifican para MMP2, MMP9 y MMP13 a niveles más altos en las IEC derivadas de ratones colonizados con *Clostridium* que los de ratones GF y ratones colonizados con *Lactobacillus*.

Además, tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 40, IDO se expresó sólo en ratones colonizados con *Clostridium*.

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

(Ejemplo 11)

A continuación, se investigó si la acumulación de células Treg inducidas por la colonización de *Clostridium* era dependiente o no de la transmisión de señales mediante receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Específicamente, se examinaron los números de células Treg en la lámina propia del colon de cada uno de ratones SPF de *Myd88*^{-/-} (deficiente en Myd88 (adaptador de señalización para el receptor tipo Toll)), *Rip2*^{-/-} (deficiente en Rip2 (adaptador del receptor NOD)) y *Card9*^{-/-} (deficiente en Card9 (factor de transmisión de señales esencial para la transmisión de señales Dectina-1)). Además, se provocó que la colonización de *Clostridium* spp. en ratones *Myd88*^{-/-} GF, y se investigó el cambio en el número de células Treg. Las figuras 17 y 18 muestran los resultados obtenidos. Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 17 y 18, el número de células Treg de cada clase de ratones SPF deficientes en los factores asociados de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos no cambió con respecto al de ratones de tipo natural de la misma camada, que sirvió como control. Además, también se encontró que cuando se colonizaron *Clostridium* spp. en ratones GF deficientes en Myd88, se inducía la acumulación de células Treg en la lámina propia del colon. Por consiguiente, se ha sugerido que el mecanismo de inducción de la acumulación de células Treg en la lámina propia del colon no se basa en la activación de la ruta de reconocimiento para patrones moleculares asociados a patógenos principales, tal como se provoca por la mayoría de bacterias, sino en especies de bacterias comensales específicas.

(Ejemplo 12)

Se sabe que las células Treg Foxp3⁺ del tracto intestinal ejercen algunas funciones inmunosupresoras a través de la producción de IL-10 (véase el documento no de patente 9). Mientras tanto, se sabe que animales que tienen células CD4⁺ Foxp3⁺ de las que se elimina específicamente IL-10 desarrollan enfermedad inflamatoria del intestino (véase el documento no de patente 18). A este respecto, en primer lugar, se examinó la expresión de IL-10 en linfocitos de diversos tejidos. Específicamente, se aislaron linfocitos de diversos tejidos de ratones SPF *Il10*^{venus}, y se analizaron la expresión de CD4 y la expresión de Venus mediante citometría de flujo. La figura 19 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que cada valor numérico en la figura 19 representa la razón de células dentro de una de las regiones correspondientes divididas en cuatro.

Además, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon de ratones *Il10*^{venus}, y se detectó la expresión de cadena β del receptor de células T (TCR β) en las superficies de las células mediante FACS. La figura 20 muestra los resultados obtenidos (gráficos de puntos de FACS obtenidos cuando se estableció una ventana de adquisición en las células CD4⁺). Obsérvese que cada valor numérico en la figura 20 representa la razón de células dentro de una de las regiones correspondientes divididas en cuatro.

Además, se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon de ratones *Il10*^{venus}. Se estimularon los linfocitos con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1 μ g/ml) durante cuatro horas en presencia de Golgistop (BD Bioscience). Luego, después de proporcionar estimulación, se tiñeron las citocinas intracelulares usando un anticuerpo anti-IL-17 de PE, un anticuerpo anti-IL-4 de APC (11B11) y un anticuerpo anti-IFN- γ de FITC (BD Bioscience) según el manual de un kit Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience). La figura 21 muestra los resultados obtenidos (gráficos de puntos de FACS obtenidos cuando se estableció una ventana de adquisición en las células CD4⁺).

Obsérvese que cada valor numérico en la figura 21 representa la razón de células dentro de una de las regiones correspondientes divididas en cuatro.

Además, se aislaron células CD4⁺ Foxp3⁺ y células CD4⁺ Foxp3⁻ del bazo (Spl) de ratones indicadores de Foxp3^{eGFP}, y se aislaron células Venus⁺ de la lámina propia del colon y de la lámina propia del intestino delgado (SI) de ratones *Il10*^{venus}. Después se analizaron las células obtenidas en cuanto a la expresión de genes predeterminados. La expresión génica se analizó mediante RT-PCR en tiempo real usando una mezcla madre para PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems) y un sistema de PCR en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems). En este caso, se normalizó el valor para cada célula con respecto a la cantidad de GAPDH. La figura 22 muestra los resultados obtenidos. Obsérvese que, en la figura 22, las barras de error representan las desviaciones estándar.

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 19 a 22, apenas se detectaron células Venus⁺ (células productoras de IL-10) en los ganglios linfáticos del cuello uterino (ganglios linfáticos periféricos), el timo, la sangre periférica, el pulmón y el hígado de ratones mantenidos en condiciones SPF. Mientras tanto, en el bazo, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de los mismos, se detectaron ligeramente células Venus⁺ (véase la figura 19). Por otro lado, se encontraron muchas células Venus⁺ en los linfocitos de la lámina propia del intestino delgado y la lámina propia del colon. Además, la mayoría de las células Venus⁺ en los intestinos eran positivas para CD4, y también positivas para la cadena β del receptor de células T (TCR β) (véanse las figuras 19 y 20). Además, se encontró que las células T CD4⁺ Venus⁺ expresaron Foxp3 y otros factores asociados a células Treg, tales como un antígeno de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y una proteína asociada a TNFR inducida por glucocorticoides (GITR), aunque las células T CD4⁺ Venus⁺ no mostraron ninguno de los fenotipos de Th2 (productores de IL-4) y Th17 (productores de IL-17) (véanse las figuras 21 y 22). Además, se mostró que el nivel de expresión de CTLA-4 en células Venus⁺ del intestino fue mayor que el de células Treg GFP⁺ del bazo aisladas de ratones indicadores de Foxp3^{eGFP} (véase la figura 22).

(Ejemplo 13)

Las células Venus⁺ pueden clasificarse en al menos dos subconjuntos, concretamente, células Treg doblemente positivas (DP) Venus⁺ Foxp3⁺ y células Treg Venus⁺ Foxp3⁻ basándose en la expresión de Foxp3 intracelular. Las células del último subconjunto corresponden a células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) (véanse los documentos no de patente 8 y 9). A este respecto, se investigaron las células Venus⁺ (células productoras de IL-10) observadas en el ejemplo 8 en cuanto a la expresión de Foxp3. Específicamente, se analizó la expresión de CD4, Foxp3 y Venus en la lámina propia del colon y la lámina propia del intestino delgado de ratones Il10^{venus} mantenidos en condiciones GF o SPF mediante FACS, y se compararon los números de células Venus⁺ en la lámina propia del tracto intestinal entre ratones Il10^{venus} SPF y GF. La figura 23 muestra los resultados obtenidos (gráficos de puntos obtenidos cuando se estableció una ventana de adquisición en las células CD4⁺).

Además, se analizó la expresión intracelular de Venus y Foxp3 en células CD4 en diversos tejidos de ratones Il10^{venus} SPF mediante citometría de flujo. La figura 24 muestra los resultados obtenidos (gráficos de puntos obtenidos cuando se estableció una ventana de adquisición en las células CD4⁺). Obsérvese que cada valor numérico en la figura 24 representa la razón de células dentro de una de las regiones correspondientes divididas en cuatro.

Además, con el fin de investigar si la presencia de bacterias comensales influía o no en la expresión de IL-10 en células reguladoras en los tractos gastrointestinales, se prepararon ratones Il10^{venus} asépticos (GF). Después se provocó la colonización de especies predeterminadas de bacterias en los ratones Il10^{venus} GF obtenidos. Tres semanas después de que se colonizaran las especies de bacterias, se analizó un grupo de células CD4⁺ (V⁺F⁻, células Venus⁺ Foxp3⁻; V⁺F⁺, células Venus⁺ Foxp3⁺; y V⁻F⁺, células Venus⁻ Foxp3⁺) en el que se expresaron Foxp3 y/o Venus en el colon y el intestino delgado mediante citometría de flujo. La figura 25 muestra gráficos de puntos obtenidos cuando se estableció una ventana de adquisición en las células CD4⁺ de colon, y las figuras 26 y 27 muestran las razones en el grupo de células CD4⁺ de cada ratón. Obsérvese que cada valor numérico en la figura 25 representa la razón de células dentro de una de las regiones correspondientes divididas en cuatro. Mientras tanto, las barras de error en las figuras 26 y 27 representan las desviaciones estándar, * indica que "P < 0,02" y ** indica que "P < 0,001".

Además, con el fin de comprobar si la presencia de bacterias comensales influía o no en la expresión de IL-10 en células reguladoras en los tractos gastrointestinales, se proporcionaron por vía oral antibióticos con agua a cinco o seis ratones Il10^{venus} por grupo durante 10 semanas. Se usaron los siguientes antibióticos en combinación:

ampicilina (A; 500 mg/l, Sigma)

vancomicina (V; 500 mg/l, NACALAI TESQUE, INC.)

metronidazol (M; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

neomicina (N; 1 g/l, NACALAI TESQUE, INC.)

Después se tiñeron CD4 y Foxp3 de linfocitos de la lámina propia del colon, la lámina propia del intestino delgado (SI), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y las placas de Peyer (PP) con anticuerpos, y se analizaron mediante FACS. Los resultados se obtuvieron a partir de dos o más experimentos independientes que proporcionaron resultados similares. La figura 28 muestra los resultados obtenidos (la razón de células Venus⁺ en células CD4⁺ en cada muestra). Obsérvese que cada círculo blanco en la figura 28 representa una muestra individual, cada barra horizontal representa un valor promedio, * indica que "P < 0,02" y "AVMN" representa las clases de los antibióticos administrados usando la primera letra de los antibióticos.

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 23 y 24, se mostró que la lámina propia del intestino delgado era rica en células Venus⁺ Foxp3⁻, concretamente, células de tipo Tr1, y que las células Treg DP Venus⁺ Foxp3⁺ estaban presentes a una alta frecuencia en el colon de ratones SPF (véanse las figuras 23 y 24). Por el contrario, aunque también se observaron números suficientes de células Foxp3⁺ en otros tejidos, no se observó la expresión de Venus en casi ninguna de las células (véase la figura 24).

Además, tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 23 y 25 a 28, se mostró que todas las fracciones de células T reguladoras de Venus⁺ Foxp3⁻, Venus⁺ Foxp3⁺ y Venus⁻ Foxp3⁺ en el colon disminuyeron significativamente en condiciones GF (figuras 23 y 26 a 27). Además, también se observó una disminución similar en células Venus⁺ en ratones Il10^{venus} SPF tratados con los antibióticos (véase la figura 28).

Además, tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 25 a 27, la colonización de *Clostridium* spp. indujo fuertemente todas las fracciones de células T reguladoras de Venus⁺ Foxp3⁻, Venus⁺ Foxp3⁺ y Venus⁻ Foxp3⁺ en el colon, y los grados de la inducción de los mismos eran iguales a los de ratones SPF (véanse las figuras 25 y 27). Además, se encontró que la colonización de las tres cepas de *Lactobacillus* o la colonización de SFB influía extremadamente poco en el número de células Venus⁺ y/o Foxp3⁺ en el colon (véanse las figuras 25 y 27). Además, la colonización de 16 cepas de *Bacteroides* spp. también indujo células Venus⁺, pero la influencia de la colonización era específica de células similares a Tr1 Venus⁺ Foxp3⁻ (véanse las figuras 25 y 27). Por otro lado, se encontró que ninguna de las especies bacterianas sometidas aprueba influyó significativamente en el número de

células productoras de IL-10 en la lámina propia del intestino delgado (véase la figura 26).

Por tanto, se mostró que el género *Clostridium* colonizado en el colon o una sustancia fisiológicamente activa derivada de las bacterias proporcionó una señal para inducir la acumulación de células T reguladoras IL-10⁺ en la lámina propia del colon o la expresión de IL-10 en células T. Mientras tanto, se mostró que el número de células Venus⁺ en el intestino delgado no se veía influido significativamente por la situación en la que no estaban presentes bacterias comensales o se redujeron las bacterias comensales (véanse las figuras 23 y 26 a 28) y que se acumularon células reguladoras IL-10⁺ (células de tipo Tr1) en la lámina propia del intestino delgado independientemente de las bacterias comensales.

(Ejemplo 14)

Se investigó si las células Venus⁺ inducidas por el género *Clostridium* tenían o no una función inmunosupresora similar a la de las células Venus⁺ en el colon de ratones SPF. Específicamente, se sembraron células CD4⁺ CD25⁻ (células T efectoras, células Teff) aisladas del bazo en una placa de 96 pocillos de fondo plano a 2×10^4 /pocillo, y se cultivaron durante tres días junto con 2×10^4 células CD11c⁺ del bazo (células representadoras de antígeno) sometidas a tratamiento de irradiación con una radiación de 30 Gy, 0,5 µg/ml de un anticuerpo anti-CD3 y muchas células Treg. Además, durante las últimas seis horas, se cultivaron las células CD4⁺ CD25⁻, a las que se le añadió [³H]-timidina (1 µCi/pocillo). Obsérvese que, las células Treg usadas en el ejemplo 14 fueron células T CD4⁺ GFP⁺ aisladas del bazo de ratones indicadores de Foxp3^{egFP}, o células T CD4⁺ Venus⁺ de la lámina propia del colon de ratones IL10^{venus} GF en los que se colonizaron *Clostridium* spp. o ratones IL10^{venus} SPF. Después se determinó la proliferación de las células basándose en la cantidad de [³H]-timidina captada, y representada mediante un valor de cuentas por minuto (cpm).

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 29, las células Venus⁺ CD4⁺ de los ratones en los que se colonizó el género *Clostridium* suprimieron la proliferación *in vitro* de células T activadas CD25⁻ CD4⁺. La actividad de supresión era ligeramente inferior a la de células GFP⁺ aisladas de ratones indicadores de Foxp3^{egFP}, pero igual a la de células Venus⁺ aisladas de ratones IL10^{venus} SPF. Por consiguiente, se ha mostrado que el género *Clostridium* induce células T que expresan IL-10 que tienen actividades inmunosupresoras suficientes y, por tanto, desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria en el colon.

(Ejemplo 15)

A continuación, se investigó la influencia, en la respuesta inmunitaria local, de la colonización de un gran número de *Clostridium* y la proliferación resultante de células Treg.

<Modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)>

En primer lugar, se preparó el modelo de colitis inducida por DSS tal como se describió anteriormente, y se investigó la influencia, en los ratones del modelo, de la inoculación de *Clostridium* y la proliferación de células Treg. Específicamente, se trataron ratones de control y ratones inoculados con *Clostridium* con DSS al 2%, luego se observaron y se midieron durante seis días para determinar la pérdida de peso corporal, la dureza de las deposiciones y el sangrado, y luego se evaluaron numéricamente. Además, en el día 6, se recogió, diseccionó y analizó de manera histológica el colon mediante tinción con HE. Las figuras 41 a 43 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las figuras 41 a 43, "SPF+Clost." o "SPF+Clost. n.º 1 a 3" indican los resultados de ratones C57BL/6 inoculados con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium* y hechos crecer en un entorno convencional durante seis semanas, y "SPF" o "SPF n.º 1 a 3" indican los resultados de ratones C57BL/6 (ratones de control) hechos crecer en un entorno convencional durante seis semanas sin inocularse con la suspensión fecal. Además, en la figura 41, el eje vertical "Puntuación de la enfermedad" representa el índice de actividad de la enfermedad (DAI) descrito anteriormente, y el eje horizontal "después de DSS al 2% (d)" representa los días transcurridos después de la administración inicial de DSS al 2% a los ratones. Además, en la figura 41, * indica que "P < 0,02" y ** indica que "P < 0,001". Mientras tanto, se sabe que las células Treg inducidas por células dendríticas reguladoras desempeñan un papel preventivo en un modelo de colitis inducida por DSS (véase S. Manicassamy *et al.*, Science 329, 849 (13 de agosto de 2010)).

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 41 a 43, se suprimieron significativamente los síntomas de la colitis tales como pérdida de peso corporal y sangrado rectal en los ratones que tenían un gran número de *Clostridium* (también denominados a continuación en el presente documento "ratones con *Clostridium* en abundancia") en comparación con los ratones de control (véase la figura 41). Se observaron de manera notable todas las características típicas de inflamación del colon, tales como acortamiento del colon, edema y hemorragia, en los ratones de control en comparación con los ratones con *Clostridium* en abundancia (véase la figura 42). Además, las características histológicas, tales como erosión de la mucosa, edema, infiltración celular y pérdida de la cripta, fueron menos graves en los ratones con *Clostridium* en abundancia tratados con DSS que en los ratones de control (véase la figura 43).

<Modelo de colitis inducida por oxazolona>

A continuación, se preparó el modelo de colitis inducida por oxazolona tal como se describió anteriormente, y se investigó la influencia, en los ratones del modelo, de la inoculación de *Clostridium* y la proliferación de células Treg. Específicamente, se sensibilizaron ratones de control y ratones inoculados con *Clostridium* con oxazolona, y posteriormente se trató el interior del recto de los mismos con una disolución de oxazolona al 1%/etanol al 50%. Después se observó y midió la pérdida de peso corporal. Además, se diseccionó y analizó de manera histológica el colon mediante tinción con HE. Las figuras 44 y 45 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las figuras 44 y 45, "SPF+Clost." indica los resultados de ratones C57BL/6 (ratones con *Clostridium* en abundancia) inoculados con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium* y hechos crecer en un entorno convencional durante seis semanas, y "SPF" indica los resultados de ratones C57BL/6 (ratones de control) hechos crecer en un entorno convencional durante seis semanas sin inocularse con la suspensión fecal. Además, en la figura 44, el eje vertical "Peso (% del inicial)" representa el peso corporal después de la administración de oxazolona al 1% cuando el peso corporal antes de la administración se tomó como el 100%, y el eje horizontal "después de oxazolona al 1% (d)" representa los días transcurridos después de la administración de oxazolona al 1% a los ratones. Mientras tanto, se sabe que las células T de tipo Th2 están implicadas en colitis inducida por oxazolona (véase M. Boirivant, I. J. Fuss, A. Chu, W. Strober, J Exp Med 188, 1929 (16 de noviembre de 1998)).

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 44 y 45, la colitis continuó junto con la persistente pérdida de peso corporal en los ratones de control. Mientras tanto, se redujo la pérdida de peso corporal de los ratones con *Clostridium* en abundancia (véase la figura 44). Además, también se reveló que se redujeron porciones que tenían enfermedades histológicas, tales como erosión de la mucosa, edema infiltración celular y hemorragia, en el colon de los ratones con *Clostridium* en abundancia (véase la figura 45).

(Ejemplo 16)

A continuación, se investigó la influencia, en la respuesta inmunitaria sistémica (producción sistémica de IgE), de la colonización de un gran número de *Clostridium* y la proliferación resultante de células Treg. Específicamente, tal como se describió anteriormente, se inmunizaron ratones de control y ratones inoculados con *Clostridium* mediante la administración de ovoalbúmina absorbida con alumbre (OVA) dos veces en un intervalo de 2 semanas. Después se recogieron sueros de estos ratones y se investigó el nivel de IgE específica de OVA de los mismos mediante ELISA. Además, se recogieron células del bazo de los ratones de cada grupo, y se investigó la producción de IL-4 e IL-10 mediante reestimulación con OVA *in vitro*. Las figuras 46 a 48 muestran los resultados obtenidos. Obsérvese que, en las figuras 46 a 48, "SPF+Clost." indica los resultados de ratones BALB/c SPF (ratones con *Clostridium* en abundancia) inoculados con una suspensión fecal de ratones colonizados con *Clostridium* y hechos crecer en un entorno convencional, "SPF" indica los resultados de ratones BALB/c SPF (ratones de control) hechos crecer en un entorno convencional sin inocularse con la suspensión fecal, y ** indica que "P < 0,001". Mientras tanto, en la figura 46, el eje vertical "IgE específica de OVA (ng/ml)" representa la concentración de IgE específica de OVA en los sueros. Además, en la figura 46, el eje horizontal representa los días transcurridos después de la administración inicial de la ovoalbúmina absorbida con alumbre a los ratones con *Clostridium* en abundancia o los ratones de control (4 semanas de edad), y "OVA+Alum" indica la programación temporal de la administración de la ovoalbúmina absorbida con alumbre. Además, en las figuras 47 y 48, "OVA" en el eje horizontal indica los resultados en el caso en el que se realizó reestimulación con OVA *in vitro*, y "-" indica los resultados en el caso en el que no se realizó reestimulación con OVA *in vitro*. Además, en las figuras 47 y 48, los ejes verticales "IL-4 (pg/ml)" e "IL-10 (pg/ml)" muestran la concentración de IL-4 y la concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de células del bazo, respectivamente.

Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 46 a 48, el nivel de IgE era significativamente menor en los ratones con *Clostridium* en abundancia que en los ratones de control (véase la figura 46). Además, se redujo la producción de IL-4 por la reestimulación con OVA (véase la figura 47) y, por tanto, aumentó la producción de IL-10 (véase la figura 48) en las células del bazo de los ratones con *Clostridium* en abundancia sensibilizados con OVA y alumbre, en comparación con las de los ratones de control.

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

(Ejemplo 17)

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

(Ejemplo 18)

A continuación, se investigó si una fracción de formación de esporas (por ejemplo, una resistente al tratamiento con

cloroformo) de una muestra fecal obtenida de humanos tenía o no un efecto de inducción de la proliferación o acumulación de células T reguladoras similar a la fracción de formación de esporas de la muestra fecal obtenida de ratones.

5 Específicamente, se suspendieron las deposiciones humanas de un voluntario sano (japonés, hombre, 29 años de edad) con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se mezclaron con cloroformo (concentración final del 3%) y luego se incubaron en un baño de agua con agitación durante 60 min. Después de la evaporación del cloroformo mediante burbujeo con gas de N₂, se inocularon por vía oral alícuotas que contenían fracción (por ejemplo, de formación de esporas) resistente al tratamiento con cloroformo de bacterias intestinales humanas en ratones asépticos (GF) (IQI, 8 semanas de edad). Se mantuvieron los ratones tratados en un aislador de vinilo durante 3 semanas. Se recogió el colon y se abrió longitudinalmente, se lavó para retirar el contenido fecal y se agitó en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía EDTA 5 mM durante 20 min a 37°C. Después de retirar las células epiteliales y el tejido adiposo, se cortó el colon en trozos pequeños y se incubaron con RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 4%, collagenasa D 1 mg/ml, dispasa 0,5 mg/ml y DNasa I 40 µg/ml (todos fabricados por Roche Diagnostics) durante 1 hora a 37°C en un baño de agua con agitación. Se lavó el tejido digerido con HBSS que contenía EDTA 5 mM, se resuspendió en 5 ml de Percoll al 40% (fabricado por GE Healthcare) y se superpuso en 2,5 ml de Percoll al 80% en un tubo Falcon de 15 ml. Se realizó separación por gradiente Percoll mediante centrifugación a 780 g durante 20 min a 25°C. Se recogieron las células de la superficie de contacto y se suspendieron en tampón de tinción que contenía PBS, FBS al 2%, EDTA 2 mM y NaN₃ al 0,09% y teñido para CD4 de superficie con Ac anti-CD4 marcado con ficoeritrina (RM4-5, fabricado por BD Biosciences). Se realizó tinción intracelular de Foxp3 usando el Ac anti-Foxp3 marcado con Alexa647 (FJK-16s, fabricado por eBioscience) y conjunto de tampón de tinción de Foxp3 (fabricado por eBioscience). Se analizó el porcentaje de células positivas para Foxp3 dentro de la población de linfocitos positivos para CD4 mediante citometría de flujo. Las figuras 51 y 52 muestran los resultados obtenidos.

25 En las figuras, se muestran histogramas representativos (figura 51) y datos combinados (figura 52) para la expresión de Foxp3 mediante linfocitos positivos para CD4 de ratones asépticos (GF) o ratones GF alimentados por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo (GF+cloro.). Además, los números en la figura 51 indican los porcentajes de células en la ventana de adquisición. Cada círculo en la figura 52 representa un animal independiente, las barras de error indican la DE y ** indica que "P < 0,001".

30 Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 51 y 52, también se encontró que cuando se colonizó la fracción de formación de esporas (por ejemplo, la resistente al tratamiento con cloroformo) de bacterias intestinales humanas en ratones GF, se indujo la acumulación de células reguladoras (Treg) Foxp3⁺ en la lámina propia del colon de los ratones.

35 A continuación, se investigó qué especies de bacterias crecían mediante alimentación por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo.

40 Específicamente, usando un mini-kit QIAamp DNA Stool (fabricado por QIAGEN), se aisló ADN genómico bacteriano de las deposiciones humanas de un voluntario sano tal como se describió anteriormente (deposiciones humanas) o microgránulos fecales de ratones GF alimentados por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo (GF+cloro.). Se llevó a cabo análisis mediante PCR cuantitativa usando un dispositivo Light-Cycler 480 (fabricado por Roche). Se calculó la cantidad relativa mediante el método ΔC_t y se normalizó con respecto a la cantidad de bacterias totales, la dilución y el peso de la muestra. Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores:

45 Bacterias totales

5'-GGTGAATACGTTCCCGG-3' (SEQ ID NO: 62) y 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO: 63)

50 Grupo XIVa de *Clostridium* (subgrupo *Clostridium coccoides*)

5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3' (SEQ ID NO: 64) y 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3' (SEQ ID NO: 65)

Grupo IV de *Clostridium* (*Clostridium leptum*)

55 5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3' (SEQ ID NO: 66) y 5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA-3' (SEQ ID NO: 24)

Bacteroides

60 5'-GAGAGGAAGTCCCCCAC-3' (SEQ ID NO: 67) y 5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3' (SEQ ID NO: 68).

La figura 53 muestra los resultados obtenidos.

65 Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 53, los ratones alimentados por sonda con deposiciones humanas tratadas con cloroformo presentaron altas cantidades de bacterias formadoras de esporas, tales como los grupos XIVa y IV de *Clostridium*, y una gran disminución de bacterias no formadoras de esporas, tales

como *Bacteroides*, en comparación con las deposiciones humanas antes del tratamiento con cloroformo.

Aplicabilidad industrial

5 Tal como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación permite proporcionar una excelente composición para inducir la proliferación o acumulación de células T reguladoras (células Treg) utilizando bacterias pertenecientes al género *Clostridium* o una sustancia fisiológicamente activa o similar derivada de las bacterias. Dado que la composición de la presente invención tiene efectos inmunosupresores, la composición puede usarse tal como se define en las reivindicaciones.

10 Los individuos sanos pueden ingerir de manera fácil y rutinaria la composición como un alimento o una bebida, tal como un alimento saludable, para mejorar sus funciones inmunitarias.

Lista de secuencias

15 SEQ ID NO: 1 a 20, 62 a 69

<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente

20 SEQ ID NO: 21 a 61

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de cada cepa de *Clostridium*

Lista de secuencias

25 <110> Universidad de Tokio

<120> COMPOSICIÓN PARA INDUCIR LA PROLIFERACIÓN O ACUMULACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS

30 <130> 215208

<150> Documento JP2010/129134

<151> 04-06-2010

35 <150> Documento PCT/JP2010/071746

<151> 03-12-2010

<160> 69

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

45 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente

50 <400> 1

ggcaatagtt ccttcccaga gtt

23

<210> 2

55 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

60 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente

<400> 2

gggtcgcata ttgtgtact tg

22

65 <210> 3

	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 3	
10	cctttgtag ccctgctcac tct	23
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
20	<400> 4	
	gggtcacctg tatggcttca g	21
	<210> 5	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 5	
	tcagtgcaag atctgcaagc a	21
35	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 6	
45	acaccggaag ccaaacaca	19
	<210> 7	
	<211> 27	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
55	<400> 7	
	gattttaata agctccaaga ccaaggt	27
60	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	

	<400> 8	
5	cttctatgca gttgatgaag atgtcaa	27
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 9	
15	cctcgtcccg tagacaaaat g	21
	<210> 10	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
25	<400> 10	
	tctccacttt gccactgcaa	20
30	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 11	
40	ggacattgtc ttgatggca	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
50	<400> 12	
	cttgtcacgt ggtgtcactg	20
	<210> 13	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 13	
	tctctggacg tcaaattgtg	20
65	<210> 14	

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 14	
10	gctgaacagc agagccttc	19
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
20	<400> 15	
	aggtctggat cactccaagg	20
	<210> 16	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 16	
	tcgcctggac cataaagaa	19
35	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 17	
45	agaggatgcg tgactttgtg	20
	<210> 18	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
55	<400> 18	
	atacagcaga ccttctggca	20
60	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	

<400> 19

5 agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 20
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente

15 <400> 20

attaccgcgg ckgctg 16

<210> 21
 <211> 1460
 <212> ADN
 <213> *Clostridium leptum*

20 <220>
 <221> ARNr

25 <222> (1)..(1460)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 1 de *Clostridium*

<400> 21

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtogaac 60
gagaaccatt ggatcgagga ttctgtccaag tgaagggtggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgataca gctgggaggc atctccctgg ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttgtc agggacgaag caagtgacgg tacctgacac 480
ggctactacg gtcagcagcg cgtatacgta ggtgccagcg tatccggaat tacctggggt 540
aaggcgtggt agccggactg cagtcagatg tgaatcacgg gctcaacttg tgctgcattg 600
gaactgtagt tctgagtact gagagcagac ggaattctag gtagcgggtga atgcgtagat 660
ataggaggac acagtgcgag gcgtctgctg acagcaactg acgctgaggc ggggaagcgtg 720
ggggagccaa caggattaga tacctggtag ttacgcctg gtaaaacgat ggatactagg 780
tgtgggggga ctgacccccct cgtggccgcc agttaacacc aataaagtat cccacctggg 840
agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg cccgcacaag cgggtggagta 900
tgtgggttaa ttccaagcaa cgcgaagaac cttaccaggg cttgacatcc cgaggaccgg 960
actagagata gtcttttctc ttccggagacc tcggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca 1020
gctcgtgtcg taagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta ttgttagttg 1080
ctacgcaaga gcaactctagc gagactgccg ttgacaaaac ggaggaaggt ggggacgacg 1140
tcaaatacatc atgcccctta tgcctggggc cacacacgta ctacaatggt ggtcaacaga 1200
gggaagcaat accgcgaggt ggagcaaata cctaaaagcc atcccagttc ggatcgagc 1260
ctgcaacccg cctgcgtgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg 1320
aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtcgg gaacacccga 1380
agtcgtagc ctaaccgcaa gggggggcgc ggccgaaggt gggttcgata attggggtga 1440
agtcgtaaca aggtagccgt 1460

5 <210> 22
<211> 1485
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1485)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 2 de *Clostridium*

15 <400> 22

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcaccctc tgaaggagtt ttcggacaac ggaagggact gcttagtggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttggagtgg ggaataacag ctggaaacag ctgctaatac 180
cgcataatat atctgggccg catggctctg gatatacaag atttatcgct ctgagatgga 240
ctcgcgtctg attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcgacga tcagtagccg 300
gactgagagg ttggccggcc acattgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggagggc 360
agcagtgggg aatattgggc aatgggcgca agcctgacct agcaacgccg cgtgaaggaa 420
gaaggctttc gggttgtaaa cttcttttgt cagggacgaa gcaagtgacg gtacctgacg 480
aataagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttat 540
ccggattttac tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggactgc aagtcagatg tgaaaaccac 600
gggctcaacc tgtgggcctg catttgaaac tgtagtctct gagtactgga gaggcagacg 660
gaattctagt tgtagcgtga aatgcgtaga tatagaagaa cacagttgcg gagccggtct 720
gcaactgacg ctgagcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc 780
acgctgtaaa cgatggatta ctaggtgtgg ggggactgac cccctccgtg ccgcagttaa 840
cacaataagt atcccacctg gggagtacga tcgcaagggt gaaactcaaa aggaattgac 900
ggggggcccg acaagcgggt gagtatgtgg tttaaattcg aagcaacgcg aagaacctta 960
ccagggcctt acatcccgtg gaccgtccta gagataggat tttcccttcg gggacactgg 1020
agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcgccga 1080
acgagcgcga cccttattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga ctgccgttga 1140
caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ctgggccaca 1200
cacgtactac aatggtgggt aacagagga agcaaagccg cgaggtggag caaatcccta 1260
aaagccatcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg gaatcgctag 1320
taatcgcgga tcagaatgcc gcggtgaata cgttcccggt ccttgtagac accgcccgtc 1380
acaccatgag agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaagggg ggcgcggccg 1440
aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1485

5 <210> 23
<211> 1491
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1491)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 3 de *Clostridium*

15 <400> 23

```

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

```

<210> 24

5 <211> 1491

<212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

10 <221> ARNr

<222> (1)..(1491)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 4 de *Clostridium*

<400> 24

15

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttccggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cggtggtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga 420
agtatttcgg tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaaa tgacgggtacc tgactaagaa 480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg gggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggag cgtagacggc agcgcaagtc tgagtgaaat cccatggctt 600
aaccatggaa ctgctttgga aactgtgcag ctggagtgcg ggagagtaag cggaattcct 660
agtgtagcgt gaaatgcgta gattatagga ggaacaccag tggcgaaggc ggctaactga 720
actgtaactg acgttgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta 780
gtccacgccg taaacgatga ttactaggtg ttgggggacc aaggtcttcg gtgccggcgc 840
aaacgcatta agtaatccac ctggggagta cgttcgcaag aatgaaactc aaaggaattg 900
acgggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt 960
acctggtctt gacatcccga tgacgagtga gcaaagtcac tttcccttcg gggcattgga 1020
gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa 1080
cgagcgcaac ccctatttcc agtagccagc aggtagagct gggcactctg gagagactgc 1140
ccgggataac cgggaggaag gcggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgatcagg 1200
gctacacacg tgctacaatg gcgtaaacaa agggaagcga gacggtgacg ttgagcaaat 1260
cccaaaaata acgtcccagt tcggattgta gtctgcaact cgactacatg aagctggaat 1320
cgctagtaat cgcgaatcag aatgtcgcgg tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgggagtc ggaaatgcc gaagtcagtg acctaaccga aaggaaggag 1440
ctgccgaagg tggagccggt aactggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

5 <210> 25
<211> 1467
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1467)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 5 de *Clostridium*

15 <400> 25

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagtgaaga tgctcgcac tgaacttagt ggcggacggg tgagtaacac gtgagcaacc 120
tgcctttcag agggggatta cgtttggaaa cgaacgctaa taccgcataa aatatacggag 180
tcgcatggca ctgatatcaa aggagcaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
cagttggcgg ggtatcggcc caccaaaccg acaatcggta gccggactga gaggttgaac 300
ggccacattg ggactgagac gcggcccaga ctctacggg aggcagcagt gggggatatt 360
gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc cttcgggttg 420
taaagttctg tcgcagggga cgaaaatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta 480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa 540
agggagcgtg ggcgggagga taagttgaat gtgaaatcta tgggctcaac ccatagctgc 600
gttcaaactg ttcttcttga gtgaagtaga ggcaggcggg attcctagtg tagcggtgaa 660
atgcgtagat attaggagga caccagtggc gaaggcgggc tgctgggctt tactgacgct 720
gaggctcgaa agcgtgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgcggtaaac 780
gatgattact aggtgtgggt ggactgacct catccgtgcc ggagttaaca caataagtaa 840
tccacctggg gagtacggcc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgca 900
agcagtggag tatgtggttt aattcgacgc aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat 960
cgagtgacgg acatagagat atgtctttcc ttcgggacac gaagacaggt ggtgcatggt 1020
tgctgctcagc tcgtgctgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttacc 1080
attagttgct acgcaagagc actctaattg gactgccgtt gacaaaacgg aggaaggtgg 1140
ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg acctgggcga cacacgtact acaatggcgg 1200
tcaacagagg gaggcaaagc cgcgaggcag agcaaacc ctaaagccgt ctcatgtcgg 1260
attgcaggct gcaactcgcc tgcatgaagt cggaattgct agtaatcgcg gatcagcatg 1320
ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacaccatg agagccggta 1380
acaccgaag tcaatagtct aaccgcaagg aggacattgc cgaaggtggg attggttaatt 1440
ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgt 1467

5 <210> 26
<211> 1474
<212> ADN
<213> *Clostridium coccooides*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1474)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 6 de *Clostridium*

15 <400> 26

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg gaaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cggtggtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgcgt ggggtgaagaa 420
gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaat gacggtacct gaagaagaag 480
ccccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggggg cgcagacggc gatgcaagcc aggagtgaag gcccgggggc 600
caaccccggg actgctcttg ggaactgcgt ggctggagtg cagagggcag cggaattcct 660
ggtgaaatgc gtagatatca gaagacacgg tgcgaggcgg cctgctgact gcactgacgt 720
tgagccgaag cgtggggagc aaacaggatt agataccgtg gtagtcacgc cgtaaacgat 780
gattactagg tgctggggag cagagactgc ccggtgccgc agccaacgca ttaagtaatc 840
cacctgggga gtacgttcgc aagaatgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga ccgcacaaag 900
cgggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac cttacctggt cttgacatcc 960
cgatgacgag tgagcaaagt cactttccct tcggggcatt ggagacaggt ggtgcatggt 1020
tgctgctcagc tcgtgctcgt agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacctctatt 1080
tccagtagcc agcaggtaga gctgggcact ctggagagac tgcccgggat aaccgggagg 1140
aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgata agggctacac acgtgctaca 1200
atggcgtaaa caaagggaag cgagacgggt acgttaagca aatccccaaa ataacgtccc 1260
agttcggatt gtagtctgca actcgactac atgaagctgg aatcgctagt aatcgcgaaat 1320
cagaatgtcg cggatgaatac gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga 1380
gtcggaaatg cccgaagtca gtgacctaac cgaaaggaag gagctgccga aggtggagcc 1440
ggtaactggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgt 1474

<210> 27
5 <211> 1484
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

<220>
10 <221> ARNr
<222> (1)..(1484)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 7 de *Clostridium*

<400> 27

15

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttccggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa agggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggattttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca ttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtgtg tagcggtgaa atgcgtagat atacggagga caccagtggc gagcggattg 720
ctggacagta ctgacgctga agcgcgaaag cgtgggagca aacagataga tacctggtag 780
tcacgcgtaa acgatggata ctaggtgtgg ggggactgac cccctccgtg ccgcagctaa 840
cgcaataagt atcccacctg gggagtacga tcgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg 900
ggggcccgca caagcgggtg agtatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960
agggcttgac atcctgctaa cgaaccagag atggattagg tgcccttcgg ggaaagcaga 1020
gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa 1080
cgagcgcaac ccttattggt agttgctacg caagagcact ctagcgagac tgccgttgac 1140
aaaacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcatcatgcc ccttacgtcc tgggccacac 1200
acgtactaca atggcggcca acaaagagag gcaagaccgc gaggtggagc aaatctcaaa 1260
aagccgtccc agttcggatc gcaggctgca accgcctgc gtgaagttgg aatcgctagt 1320
aatcgcggat cagcatgccg cgggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgccgtca 1380
caccatgaga gtcgggaaca cccgaagtcc gtagcctaac cgcaaggggg gcgcggccga 1440
aggtgggttc gataattggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgt 1484

5 <210> 28
<211> 1483
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1483)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 8 de *Clostridium*

15 <400> 28

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagcaccctc tgaaggagtt ttccgacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga      120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac      180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc      240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag      420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa      480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat gtaggtggca agcgttgtcc      540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg      600
gctcaaccctg tgaactgcat ttgaaactgt ttcctttgag tgcggagag gtaatcgga      660
ttccttgtgt agcgggtgaat gcgtagatat agagaccaca gtgccgacgc cgaatactga      720
cgatactgac ggtgagcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc      780
cacgctgtaa acgatcgata ctaggtgtgc ggggactgac ccctgcgtgc cggagttaac      840
acaataagta tcgcacctgg ggagtacgat cgcaagggtt aaactcaaag gaattgacgg      900
gggcccgcac aagcgtgga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca      960
gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg gaaagcagag     1020
acagggtggtg catggtgtgc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac     1080
gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact gccgttgaca     1140
aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct gggctacaca     1200
cgtaatacaa tggcgggtta caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg aacccccaaa     1260
agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga atcgctagta     1320
atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac     1380
accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctaacc gcaaggaggg cgcgccgaa     1440
ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt                                1483

```

5 <210> 29
 <211> 1480
 <212> ADN
 <213> *Clostridium coccooides*

10 <220>
 <221> ARNr
 <222> (1)..(1480)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 9 de *Clostridium*

15 <400> 29

```

ggagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg      120
agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc      180
acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtgggat acgatggatc cgcgtctgat      240
tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgatc agtagccggc ctgagagggg      300
gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa      360
tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg      420
tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg      480
actaagaagc cccgggctaa ctacgtgcc a gcagccgcg taatacgtag gggcaagcgt      540
tatccggatt tactgggtgt aaagggggcg cagacggcga tgcaagccag gagtgaaagc      600
cggggcccaa ccccgggact gctcttgac tgcgtggctg gagtgcagag ggcagcgaat      660
tcctgtgtag cgtgaatgcg tagattcaga ggacacgtgc gagcgctgc tgactgcact      720
gacgtgagcc cgaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata cctggtagtc cacgccgtaa      780
acgatgatta ctaggtgtcg gggagcagag actgcccggt gccgcagcca acgcattaag      840
taatccacct ggggagtagc ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc      900
acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggccttga      960
catccccctg gatggcccggt aacgggggtca gcctttcggg gcaggggaga cagggtggtgc     1020
atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc     1080
ctgcccgcag tagccagcat tttagatggg gactctgcgg ggactgccgg ggacaacccg     1140
gaggaaggcg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat ggcctgggct acacacgtgc     1200
tacaatggcg ccgacagagg gaggcgaagc ggcgacgcgg agcgaacccc aaaaacggcg     1260
tcccagttcg gattgtagtc tgcaaccgca ctacatgaag ccggaatcgc tagtaatcgc     1320
ggatcagaat gccgcgtga atacgttccc gggctcttga cacaccgccc gtcacaccat     1380
gggagccggg aatgcccga gttctgtgacc gaaccgtaa ggggaggggc agccgaaggc     1440
aggcccgggtg actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt                                1480

```

5 <210> 30
 <211> 1489
 <212> ADN
 <213> *Clostridium leptum*

10 <220>
 <221> ARNr
 <222> (1)..(1489)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 10 de *Clostridium*

15 <400> 30

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc 60
gaagcacttt tttagaactc ttcggagggga agagaggggtg acttagcggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg ggcaacctgc cttacacagg gggataacaa ttagaaatga ttgctaatac 180
cgcataagac cacggtactg catggtacag tggtaaaaaac tgaggtggtg taagatgggc 240
ccgcgtctga ttaggtagtt ggtggggtag aagcctacca agccgacgat cagtagccga 300
cctgagaggg cgaccggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgacgccgc gtgagtgagg 420
aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc agggaagaaa atgacggtac ctgactaaga 480
agcccccgcc taactacgtg ccagcagccg cggtaatagc tagggggcaa gcgttatccg 540
gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gacttgcaag tctgatgtga aaatccgggg 600
cccaacccgg gactgcattg aaactgtatt ttttgagggg gtccgaggag gcaagtggaa 660
tcctgggtag cggtgaaatg gcgtagaatt cagggaggaa caccagtggc ggaaggcgaa 720
ttactggacg ataactgacg gtgaggcgcg aagcgtggga gcaaacaaga attagatacc 780
ctggtagtca cgctgtaacg atcgatacta ggtgtgcggg gactgacccc tgcgtgccgg 840
agttaacaca ataagtatcg cactggggag tacgatcgca aggttgaaac tcaaaggaat 900
tgacggggggc ccgcacaagc ggtggattat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
ttaccagggc ttgacatcct gctaacgaag tagagataca ttaggtgccc ttcggggaaa 1020
gcagagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc 1080
cgcaacgagc gcaaccccta ttgttagttg ctacgcaaga gcaacttagc gagactgccg 1140
ttgacaaaaac ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgcctgggc 1200
tacacacgta atacaatggc ggttaacaaa gggatgcaaa gccgcgaggc agagcgaacc 1260
ccaaaaagcc gtcccagttc ggatcgagc ctgcaacccg cctgcgtgaa gtcggaatcg 1320
ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc 1380
cgtcacacca tgagagtcgg gaacacccga agtccgtagc ctaaccgcaa ggagggcgcg 1440
gccgaagggtg ggttcgataa ttggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1489

5 <210> 31
<211> 1490
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1490)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 11 de *Clostridium*

15 <400> 31

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttccggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa aggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggatttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca ttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtggt gtagcgtga aatgcgtaga ttataccgga ggaaccacca gtggcggaag 720
gcggattgct ggaacagtaa ctgacgctga ggcgccgaaa gcgtggggag caaacaggat 780
agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tggatactaa gtgtggggga ctgaccctt 840
cgtgcccagc taagcaataa gtttcccacc tggggagtag gatcgaggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccgc caagcgggtg gagtaggggt taattggagc aacgggaaga 960
accttaccag ggcttgacat cctgtaacga accagaagag ggattaggtg ccttcgggga 1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt gggtaaagtc 1080
ccgcaacgag cgcaaccctt attgttagtt gctacgcaag agcactctag cgagactgcc 1140
gttgacaaaa cggaggaagg tggggacgac gtcaaatcat catgcccctt acgtcctggg 1200
ccacacacgt actacaatgg cggccaacaa agagaggcaa gaccgcgagg tggagaaaat 1260
ctcaaaaagc cgtcccagtt cggatcgag gctgcaaccc gcctgcgtga agttggaatc 1320
gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc 1380
ccgtcacacc atgagagtcg ggaacacccg aagtccgtag cctaaccgca aggggggcgc 1440
ggccgaaggt gggttcgata attgggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1490

<210> 32

5 <211> 1489

<212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

<220>

10 <221> ARNr

<222> (1)..(1489)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 12 de *Clostridium*

<400> 32

15

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
 agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
 acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtgggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
 tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgatc agtagccggc ctgagagggg 300
 gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
 tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420
 tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
 actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg gggcaagcgt 540
 tatccggatt tactgggtgt aaagggagcg tagacggcag cgcaagtctg aagtgaatc 600
 ccatggctta accatggaac tgctttggaa actgtgcagc tggagtgcag gagaggtaag 660
 cggaattcct agtgtagcgg tgaatgcgta gatattagag gacaccagtg gcgatgcggc 720
 ttactggact gtactgacgt tgagctcgaa agcgtgggga gcaccagaat tagaatactg 780
 tagtcacgcc gtaaccgatg atactaggtg tgggggacca aggtctcgtg ccggcgccaa 840
 acgcattaag taatccacct ggggagtagc ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac 900
 ggggacccgc acaagcgggtg gagcatgtgg ttttaattcga agcaacgcga agaaccctac 960
 ctggtcttga catcccgatg acgagtgagc aaagtcactt tcccttcggg gcattggaga 1020
 caggtgggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacgc 1080
 agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag gtagagctgg gactctgga gagactgccc 1140
 gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg tcaaactcgc atgcccctta tgatcagggc 1200
 tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgaga cggtgacgtt aagcaaattc 1260
 caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt ctgcaactcg actacatgaa gctggaatcg 1320
 ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcgggtg aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc 1380
 cgtcacacca tgggagtcgg aaatgcccgga agtcagtgac ctaaccgaaa ggaaggagct 1440
 gccgaagggtg gagccggtaa ctgggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1489

<210> 33
 <211> 1456
 <212> ADN
 <213> *Clostridium coccooides*

<220>
 <221> ARNr
 <222> (1)..(1456)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 13 de *Clostridium*

<400> 33

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gaagcacttg agaacgattc ttcggatgag gacttttgtg actgagtggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg ggtaacctgc cctatacagg gggataacag ttagaaatga ctgctaatac 180
cgcataagcg cactaaaacc gcatggttcg gtgtgaaaaa ctgaggtggg ataggatgga 240
cccgcgtctg attagcttgt tgggtggggta acggctcacc aaggcgacga tcagtagccg 300
gcctgagagg gcgaccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggg 360
agcagtgggg gatattgcac aatgggggga accctgatgc agcgacgccg cgtgggtgaa 420
gaagcgctc ggcgcgtaaa gccctgtcag caggggaagaa aatgacggta cctgaagaag 480
aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatagc taggggcaag cgttattccg 540
ggatttactg ggtgtaaagg gggcgagac ggcgatgcaa gccaggagtg aagccccggg 600
cccacccggg actgctcttg gactgcgtgc tggagtgcag aaggggcagc gatcctgtgt 660
accgtgaatt gcgtagatat cagagacacg ttgcgagcgc tgctgactgc actgacgtga 720
gcgaagctgg agcacagata gatactgtag tcagcgtaac gatgatacta gtgtcgggag 780
cagagactgc ccgttgccggc agcccaacgc attagtattc cacttgggga gtacgtttcg 840
cagaatgaac ttcaaggaaa tgacggggac ccgcacaagg cggtggagca tgtgggttaa 900
ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggc cttgacatcc cccctggatg gcccgtaacg 960
gggtcagcct ttcggggcag gggagacagg tgggtgcatg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt 1020
gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctgc ccgcagtagc cagcatttta 1080
gatggggact ctgcggggac tgccggggac aaccggagg aaggcgggga tgacgtcaaa 1140
tcatcatgcc ccttatggcc tgggctacac acgtgctaca atggcgccga cagagggagg 1200
cgaagcggcg acgcggagcg aacccccaaa acggcgctccc agttcggatt gtagtctgca 1260
acccgactac atgaagccgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cggtgaatac 1320
gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gccgggaatg cccgaagtct 1380
gtgaccgaac ccgtaagggg aggggcagcc gaaggcaggc tcggtgactg ggggtgaagtc 1440
gtaacaaggt agccgt 1456

5 <210> 34
<211> 1475
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1475)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 14 de *Clostridium*

15 <400> 34

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtccaac 60
ggagcaccac tgaaggagtt ttccgacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
tcgctgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat gtaggtggca agcgttgtcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
gctcaaccgg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgcgggagag gtaatcgga 660
tttccttggt tagcggtgaa tgcgtagata taaggaagga cacagtggcg agcggattac 720
tggacgatac tgacgtgagc gcgaaagcgt gggggagcaa cagaaattag atactgtagt 780
gcagctgtaa cgatcgatac tagttgcggg actgaccctc tgcgtgcgag ttacacaata 840
agtatcgcac ctgggagtac gatcgcaagg ttggaactca aaggaattga cggggcccg 900
acaagcgttg gattatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac cagggttgga 960
catcctgcta acgaagtaga gatacattag gtgcccttcg gggaaagtag agacaggtgg 1020
tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa 1080
ccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga ctgccgttgga caaacggag 1140
gaaggcgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ctgggctaca cacgtaatac 1200
aatggcgggt aacaaaggga tgcaaagccg cgaggcagag cgaaccccaa aaagccgtcc 1260
cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga 1320
tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggt ccttgtagac accgcccgtc acaccatgag 1380
agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag ggcgcggccg aaggtgggtt 1440
cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1475

5 <210> 35
<211> 1480
<212> ADN
<213> *Clostridium coccooides*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1480)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 15 de *Clostridium*

15 <400> 35


```

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

```

<210> 36
 <211> 1486
 <212> ADN
 <213> *Clostridium papyrosolvens*

<220>
 <221> ARNr
 <222> (1)..(1486)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 16 de *Clostridium*

<400> 36

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

<210> 37
5 <211> 1493
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

<220>
10 <221> ARNr
<222> (1)..(1493)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 17 de *Clostridium*

<400> 37

15

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaaccaac ggattgagga ttctgccaaa tgaagttggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggcaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggacgaac aaatgacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat gtaggtggca agcgttatcc 540
ggatttattg ggtgtaaagg gcgtgtaggc gggaatgcaa gtcagatgtg aaaactatgg 600
gctcaacca tagcctgcat ttgaaactgt atttcttgag tgctggagag gcaatcggaa 660
ttccgtgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tacggaggaa caccagtggc gaagcggatt 720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacaggg attagatacc 780
ctggtagtca cgccgtaaac gatggatact aggtgtgggg ggaactgacc cctccgtgcc 840
gcagctaacg caataagtat ccacactggg gactacgac gcaaggggtg aaactcaaag 900
gaattgacgg gggccgcac aagcgggtga gtatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaaccagaga tggatcaggt gcccttcggg 1020
gaaagcagag acaggtggtg catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
gtcccgcaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact 1140
gccgttgaca aaacggagga aggtggggac gacgtcaa atcatgccc cttacgtcct 1200
gggccacaca cgtactacaa tggcggccaa caaagagagg caagaccgcg aggtggagca 1260
aatctcaaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagttgga 1320
atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttccggggcc ttgtacacac 1380
cgcccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctgacc gcaagggggg 1440
cgcgccgcaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtagta acaaggtagc cgt 1493

<210> 38
5 <211> 1493
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

<220>
10 <221> ARNr
<222> (1)..(1493)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 18 de *Clostridium*

<400> 38

15

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcg ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagcttata tttcagaagt tttcggatgg acgagagata agcttagtgg cggacgggtg 120
agtaacacgt gagcaacctg cttttcagag ggggataaca gttggaaacg actgctaata 180
ccgcataacg ctgcgatggg gcatcccgat gcagccaaag gagcaatccg ctgaaagatg 240
ggctcgcggc cgattagcta gttggtgggg caacggccca ccaaggcgac gatcggtagc 300
cggactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 360
gcagcagtgg gggatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg 420
aagacggtct tcggattgta aacctctgtc tttggggaag aaaatgacgg tacccaaaga 480
ggaagctccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtacggagc gagcgttgtc 540
cggaattact ggggtgtaaag ggagcgtacg cgggcgagaa agttgaatgt taaatctacc 600
ggcttaactg gtagctgcgt tcaaaacttc ttgtcttgag tgaagtagag gcaggcggaa 660
ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata taggaggaca ccagtgggag aagccgcctg 720
ctgggcttta actgacgctg aggctcgaaa gcgtggggag caaaccagga ttagataccc 780
tggtagtcaa cgctgtaaac gatgattact aggtgtgggg gggactgacc ccctccgtgc 840
cgcagttaac acaataagta tccacctggg gagtacggcc gcaaagtttg aaaactcaaa 900
aggaatgacg ggggcccgc caaagcagtg gagtatgtgg ttttaatttcg aagcaacgcg 960
aagaacctta ccaggtcttg acatcgtgcg catagcctag agataggtga agcccttcgg 1020
ggcgcacaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcacag agcgcaaccc ttattattag ttgctacgca agagcactct aatgagactg 1140
ccgttgacaa aacggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg 1200
ggctacacac gtactacaat ggcactgaaa cagaggggaag cgacatcgcg aggtgaagcg 1260
aatccccaaa aagtgtccca gttcggattg caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga 1320
attgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggccc ttgtacacac 1380
cgcccgtcac accatgggag tcggtaacac ccgaagccag tagcctaacc gcaaggaggg 1440
cgctgtcgaa ggtgggattg atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

<210> 39

5 <211> 1483

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (1)..(1483)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 19 de *Clostridium*

<400> 39

15

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagtgaaga tgcttgcatc tgaacttagt ggcggacggg tgagtaacac gtgagcaacc 120
tgcctttcag agggggataa cgtttgaaa cgaacgctaa taccgcataa aatatacggag 180
tcgcatggca ctgatatcaa aggagcaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
cagttggcgg ggtaacggcc caccaaaccg acaatcggta gccggactga gaggttgaac 300
ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt gggggatatt 360
gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc cttcgggttg 420
taaagttctg tcgcagggga cgaaaatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta 480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa 540
agggagcgtg ggcgggagga taaagttgaa tgtgaaatct atgggctcaa cccatagctg 600
cgttcaaaac tggtcttctt gagtgaagta gaggcaggcg gaattcctag tgtagcggtg 660
aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt ggcgaaagcg gcctgctggg cttttactga 720
cgctgaggct cgaaagcgtg ggtagcaaac agaattagat taccctgtta ttcacggcgg 780
taaacgatga ttactaggtt tgggttgacc tgaccccat tcgtgccgga agtaacacca 840
taaagtaatc cacctggggg agtacggccg ccaggttgaa acttcaaaag gaattgacgg 900
gggcccgcac aagcagtga ggtatgtggt ttaatttcga cgcaaacgcg aagaacctta 960
ccagggtctt gacatcgagt gacggacata gagatatgtc tttcctttcg ggacacgaag 1020
acagggtggtg catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac 1080
gagcgcaacc cttaccatta gttgctacgc aagagcactc tgatgggact gccgttgaca 1140
aaacggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgcc cttatgacct gggcgacaca 1200
cgtactacaa tggcgggtcaa cagagggagg caaagccgcg aggcagagca aaccctaaa 1260
agccgtctca gttcggattg caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga attgctagta 1320
atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1380
accatgagag ccggtaacac ccgaagtcaa tagtctaacc gcaaggagga cattgccgaa 1440
ggtgggattg gtaattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1483

5 <210> 40
<211> 1511
<212> ADN
<213> *Clostridium coccooides*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1511)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 20 de *Clostridium*

15 <400> 40

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
 agaacctgcc gtatactggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
 acagcttcgc atgaaacagt gtgaaaaact ccggtgggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
 tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgatc agtagccggc ctgagagggg 300
 gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
 tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420
 tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
 actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg ggcaagcgtt 540
 atccggatatt actgggtgta aaggggagcgt agacggcagc gcaagtctga gtgaaatccc 600
 atggcttaac catggaactg ctttggaac tgtgcagctg gagtgcagga gaggtaaagc 660
 ggaattccta gtgtagcggg tgaaatgcgt agatatagga ggaacaacag tggcgggaagg 720
 cggctactgg gactgtaact gacgttgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780
 ataccctggt agtcacgccg taaacgatga ttactaggtg ttgggggacc ataggtcttc 840
 ggtgccggcg caaacgcaat taagtaatcc acctggggga gtacgttcgc aagaatgaaa 900
 ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaaagc 960
 aaacgcgaag aaaccttacc tggctctgac atcccgatga cgagtgcagc aagtcacttt 1020
 cccttcgggg caattggaga cagggtgtgc atgggtgtgc gtcagctcgt gtcgtgagat 1080
 gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cctatttcca gtagccagca ggtagagctg 1140
 ggcactctgg agagactgcc cgggataacc gggaggaagg cggggatgac gtcaaatac 1200
 catgcccctt atgatcaggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa ggggaagcag 1260
 acggtgacgt taagcaaata ccaaaaataa cgtcccagtt cggattgtag tctgcaactc 1320
 gattacatga agctggaatc gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc 1380
 ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtcg gaaatgcccg aagtcagtga 1440
 cctaaccgaa aggaaggagc tgccgaaggt ggagccggtg actggggtga agtagataac 1500
 aaggtagccg t 1511

<210> 41
 <211> 1495
 <212> ADN
 <213> *Clostridium leptum*

<220>
 <221> ARNr
 <222> (1)..(1495)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 21 de *Clostridium*

<400> 41

agagtttgat cctgcgctca ggacgaacgc tggcggcgcg cctaacacat gcaagtcgaa	60
cgggactatt ttgggagaag ttttcggatg gatctcggga tagtttagtg gcggacgggt	120
gagtaacgcg tgggcaacct gccttacaca gggggataac aattagaaat gattgctaata	180
accgcataag accacggtac tgcattggtac agtggtaaaa actgaggtgg tgtaagatgg	240
gccccgcgtct gattaggtag ttggtgggggt agaagcctac caagccgacg atcagtagcc	300
gacctgagag ggcgaccggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg	360
cagcagtggg gaatatgtca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgagtga	420
ggaagtatgt cggtatgtaa agctctatca gcagggaaga aaatgacggt acctgactaa	480
gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca agcggttatcc	540
ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggacttgcaa gtctgatgtg aaaatccggg	600
ggcccaaccc cggaactgca ttggaaactg tatatctaga gtgtcggaga ggcaagtgga	660
atttcctggt gtagcgggtga aatgcgtaga tatcagagga acaccagtgg cgaaggcgct	720
tgcttgacga tgactgacgt tgaagctcga aaagcgtggg tagcaaacag aattagatac	780
cctggtaagt caaccggta aacgatgatt actaggtttt ggttggactg accccatccg	840
tgccggagta acaccaataa gttatccaac ctgggaagta cggccggcag gttgaaactc	900
aaaaggaaat gacgggggcc cgcacaagca gttgaagtat gtgggttaat tcgacgcaaa	960
cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcg agtgacggac atagagatat gtctttcctt	1020
cgggacacga agacaggtgg tgcattggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt	1080
aagtcccgca acgagcgcaa cccttaccat tagttgctac gcaagagcac tctgatggga	1140
ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac	1200
ctgggacgaca cacgtactac aatggcggtc aacagaggga ggcaaagccg cgaggcagag	1260
caaaccctta aaagccgtct cagttcggat tgcaggctgc aactcgcctg catgaagtgc	1320
gaattgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac	1380
accgcccgtc acaccatgag agccggtaac acccgaagtc aatagtctaa ccgcaaggag	1440
gacattgccg aaggtgggat tggttaattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt	1495

5

<210> 42

<211> 1491

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

10

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 22 de *Clostridium*

15

<400> 42

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac	60
gagaatccag tgaaggagtt ttcggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag	120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc	180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc	240
tcgcgtctga ttagcttgtt ggcggggtaa aggccacca aggcgacgat cagtagccgg	300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca	360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaaag	420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga	480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttatc	540
cggattttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag	600
ggctcaaccc tgagcctgca tttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga	660
attccgtgtg tagcggtgaa atgcgtagat atacggagga caccagtggc gaagcggatt	720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct	780
ggtagtccac gccgtaaacg atggatacta ggtgtggggg gactgacccc ctccgtgccg	840
cagctaacgc aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga	900
attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagt atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa	960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga accagagatg gattaggtgc ccttcgggga	1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt	1080
cccgcaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc	1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgcccct tacgtcctgg	1200
gccacacacg tactacaatg gcggccaaca aagagaggca agaccgcgag gtggagcaaa	1260
tctcaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc cgcctgcgtg aagttggaat	1320
cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg	1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aaggggggcg	1440
cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t	1491

5

<210> 43

<211> 1495

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

10

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1495)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 23 de *Clostridium*

15

<400> 43

agagtttgat cctgtgcctc aggatgaacg ctggcggcgt gcttaacaca tgcaagtcga	60
acgagaacca acggattgag gattcgtcca aatgaagttg gggaaagtgg cggacgggtg	120
agtaacgcgt gagcaatctg ccttgagtg ggggaataacg gttggaaaca gccgctaata	180
ccgcatgatg cgtctgggag gcatctctct ggacgccaaa gatttatcgc tctgagatga	240
gctcgcgtct gattagctag ttggcggggc aacggcccac caaggcgacg atcagtagcc	300
ggactgagag gttggccggc cacattggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg	360
cagcagtggg gaatattggg caatgggcgc aagcctgacc cagcaacgcc gcgtgaagga	420
agaaggcttt cgggttgtaa acttctttta agggggacga acaaagacg gtaccccttg	480
aataagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttat	540
ccggatttat tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggaatgc aagtcagatg tgaaaactat	600
gggctcaacc catagcctgc atttgaaact gtatttcttg agtgctggag aggcaatcgg	660
aattccgtgt gtacgcgtga aatgcgtaga tatacggagg aacaccagtg gcgaaggcgg	720
attgctggac agtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata	780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatggat actaagtgtg gggggactga cccctccgt	840
gccgcagcta acgcaataag tatccacct ggggagtag atcgcaaggt tgaaactcaa	900
aggaattgac gggggccgc acaagcgggtg gagtatgtgg tttaattcga agcaacgcga	960
agaaccttac cagggttgta catcctgcta acgaaccaga gatggatcag gtgcccttcg	1020
gggaaagcag agacaggtgg tgcattggtt tgcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt	1080
aagtcccgca acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga	1140
ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttacgtc	1200
ctgggccaca cacgtactac aatggcggcc acaaagaga ggcaagaccg cgaggtggag	1260
caaactctaa aaagccgtcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg	1320
gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac	1380
accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctga ccgcaagggg	1440
ggcgcggccg aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt	1495

5

<210> 44

<211> 1440

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

10

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1440)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 24 de *Clostridium*

15

<400> 44

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac	60
ggagtgaaga tgctcgcatac tgaacttagt ggcggacggg tgagtaaacac gtgagcaacc	120
tgccctttcag aggggggataa cgtttggaac cgaacgctaa taccgcataa aatatcggag	180
tcgcatggca ctgatataca aggagtaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg	240
cagttggcgg ggtaacggcc caccaaaccg acaatcggta gccggactga gaggttgaac	300
ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt gggggatatt	360
gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc cttcgggttg	420
taaagttctg tcgcagggga cgaaaatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta	480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa	540
agggagcgta ggcgggagga taagttgaat gtgaaatcta tgggctcaac ccatagttgc	600
gttcaaaact gttcttcttg agtgaagtag aggcaggcgg aattcctagt gtagcgggtga	660
aatgcgtaga tattagagga acaccagtgg cgaagcggcc tgctgggctt ttactgacgc	720
tgagctcgaa agcgtgggta gcaacaggat tagataccct ggtagtccac gcggtaaaccg	780
atgattacta gtgtgggtgg actgacccat ccatgccgga gttaacacaa tagtaatcca	840
cctggggagt acgcgcagtg aactcaaagg attgacgggg cccgcacaag cagtgagtat	900
gtggtttatt cgacgcacgc gagactacag tcttgacatc gatgacggac tagagatatg	960
tctttctcgg acacgaagac aggtggtgca tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt	1020
tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct taccattagt tgttacgcaa gagcactcta	1080
atgggactgc cgttgacaaa acggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccct	1140
tatgacctgg gcgacacacg tactacaatg gcggtcaaca gaggaggga aagccgcgag	1200
gcagagcaaa cccctaaaag ccgtctcagt tcggattgca ggctgcaact cgcctgcatg	1260
aagtcggaat tgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt	1320
gtacacaccg cccgtcacac catgagagcc ggtaacaccc gaagtcaata gtctaaccgc	1380
aaggaggaca ttgccgaagg tgggatggta attggggtga agtagtaaca aggtagccgt	1440

5

<210> 45

<211> 1495

<212> ADN

<213> *Clostridium leptum*

10

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1495)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 25 de *Clostridium*

15

<400> 45

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaaac 60
gagaaccatt ggatcgagga ttctgtccaag tgaagggtggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgataca gctgggaggc atctccctgg ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttgtc agggacgaag caagtgacgg tacctgacga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagtggca agcgttatcc 540
ggatttattg ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaatgca agtcagatgt gaaaactatg 600
gggctcaacc catagcctgc atttgaaact gtatttcttg agtgctggag aggcaatcga 660
attccgtgtg tagcgggtga aatgcgtaga tatacggagg aacaccagtg gcgaagcggg 720
ttgctggaca agtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatggat actaggtgtg gggggactga cccctccgt 840
gccgcagcta acgcaataag tatcccacct ggggagtagc atcgcaaggt tgaaactcaa 900
aggaattgac gggggccgc acaagcgggtg gagtatgtgg ttaattcga cgcaacgcga 960
agaaccttac cagggttga catcctacta acgaaccaga gatggattag gtgcccttcg 1020
gggaaagtag agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
aagtcccgc acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
ctgccgttga caaacggag gaagggtggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttacgtc 1200
ctgggccaca cacgtactac aatggcggcc acaaagaga ggcaaagccg cgaggtggag 1260
caaattctca aaagccgtcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg 1320
gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac 1380
accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac accgaagtc cgtagcctaa ccgcaagggg 1440
ggcgcggccg aagggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495

5 <210> 46
<211> 1495
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

10 <220>
<221> ARNr
<222> (1)..(1495)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 26 de *Clostridium*

15 <400> 46

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcaccac tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaagggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcgttgtcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
gctcaaccgc tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgcggagag ggtaatcgga 660
attcctttgt gtagcgtga aatgcgtaga tataagaaga acaccagtgg cgaaggcgga 720
ttactggacg ataactgacg gtgaggcgcg aaagcgtggg ggagcaacag attaaatacc 780
ctggtagtcc acgctgttaa cgatcgatac taggtgtgcc gggactgacc ccctgcgtgc 840
ccggagttaa ccacaataag tatcgcacct ggggagtagc atcgcaaggt gaacttcaaa 900
ggaattgacg ggggcccgc ccaagccgtg gattatgtgg ttaattcgaa gcaacgcgaa 960
gaacctaccc agggcttgac atcctgctaa cgaagtagag atacattagg tgccttttcg 1020
gggaaagcag agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
aagtcccgc aagagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
ctgccgttga caaacggag gaaggcgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc 1200
ctgggctaca cacgtaatac aatggcgggt aacaaaggga tgcaaagccg cgaggcagag 1260
cgaaccccaa aaagccgtcc cagttcggtat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagtgc 1320
gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac 1380
accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac accgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag 1440
ggcgcggccg aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495

<210> 47
5 <211> 1509
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

<220>
10 <221> ARNr
<222> (1)..(1509)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 27 de *Clostridium*

<400> 47

15

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagtaacccc tgaaggagtt ttcggacaac tgatgggact acttagtggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg agtaacctgc cttggagtgg ggaataacag ctggaaacag ctgctaatac 180
cgcataatat gtctgtgtcg catggcactg gacatcaaag atttatcgct ctgagatgga 240
ctcgcgtctg attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcgacga tcagtagccg 300
gactgagagg ttggccggcc acattgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggagggc 360
agcagtgggg aatattgggc aatgggcgca agcctgacct agcaacgccg cgtgaaggaa 420
gaaggctttc gggttgtaaa cttcttttaa gggggaagag cagaagacgg tacccttga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgtc 540
cggatttact ggggtgtaaag ggcgtgcagc cggagagaca agtcagatgt gaaatccacg 600
ggctcaaccc gtgaactgca tttgaaactg tttcctggag ttcggagggt atggaattct 660
tgtagcggt gaaatgctgt agatatggga gaaccaccag tgcgaggggg cttccgggac 720
tgtacttgac tgtagaggtc tcaaagctgg gggagcaccg aggaatgaga taccgtgata 780
gtcccacgcg gtaacggatg attactaggt gttgggggga cccaggctct ttcggtgccg 840
ggcgcaaacc ctttaggaat tccacctggg gaattacgtt tggcaagaaa ggaacttcaa 900
agaaattgaa cgggggaccc cccaaccgg tggaggcatg gtgttttatt tcggaggaac 960
gggaagaacc tttaccttgt tctgaccttc cggatgacga agtgagcaaa gtcaacttcc 1020
cttcggggcc atggaggaca ggtggtggca tgggtggctg tcagctcgtg tcgtgagatg 1080
ttgggttaag tcccgcacg agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag gtagagctgg 1140
gcactctgga gagactgccc gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatcatc 1200
atgcccctta tgatcagggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgaga 1260
cgggtgacgtt aagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt ctgcaactcg 1320
actacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc 1380
cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcgg aaatgcccgga agtcagtgac 1440
ctaaccgaaa ggaaggagct gccgaagggt gagccggtaa ctggggtgaa gtcgtaacaa 1500
ggtagccgt 1509

<210> 48
5 <211> 1583
<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

<220>
10 <221> ARNr
<222> (1)..(1583)
<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 28 de *Clostridium*

<400> 48

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtcgaac	60
ggagcttata tttcagaagt tttcggatgg acgagagata agcttagtgg cggacgggtg	120
agtaacacgt gagcaacctg cttttcagag ggggataaca gttggaaacg actgctaata	180
ccgcataacg ctgcgatggg gcatcccgat gcagccaaag gagcaatccg ctgaaagatg	240
ggctcgcggc cgattagcta gttggtgggg caacggccca ccaaggcgac gatcggtagc	300
cggactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag	360
gcagcagtgg gggatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg	420
aagacggtct tcggattgta aacctctgtc tttggggaag aaaatgacgg tacccaaaga	480
ggaagctccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggggag cgagcgttgt	540
ccggaattac tgggtgtaaa gggagcgtag cgggcgagaa agttgaatgt taaatctacc	600
ggcttaactg gtagctgctt ccaaaacttc ttggtcttga gtgaaagtaa gaggccaggg	660
cggaaattct tagtgtaagc gggtgaaaat gcgttagata ttagggagga accaccaggt	720
gggcgaaggg cggcttgctg ggctttaact ggacggctgg aggcttgga aaggcgtggg	780
gagagcaaac acagggaatt aagtataccc tggatatatgt cacacgcttg taaagagtat	840
gattaactta gggtggtggg gggaacttga ccctttcgtg tgcgcgcagg ttaacacaca	900
tttagagtat atccaacttg gggagagtac ggccggcaaa gtttgaaact tcaaaaggga	960
aattgagacc ggggggcccg gccaccaagc acagtggaga gtatggtggg ttttaatttcg	1020
agaagcaacc ggcggaagag aaactttacc agtccttgac atcgggtggcg gcataagccc	1080
tagagattag gtgaagccct tcggggggccc caccagacag gtggtgcatg gttgtcgtca	1140
gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc ccgcaaacga gcgcaaccct tattattagt	1200
ttgctacgca agagcactct aatgagactg ccgttgacaa aacggaggaa ggtggggatg	1260
acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtactacaat ggcactgaaa	1320
cagaggggaag cgacatcgcg aggtgaagcg aatcccaaaa aagtgtccca gttcggattg	1380
caggctgcaa ctgcctgca tgaagtcgga attgctagta atcgcggatc agcatgccgc	1440
ggtgaatacg ttcccggggc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tcggtaaacac	1500
ccgaagccag tagcctaacc gcaaggaggg cgctgtcgaa ggtgggattg atgactgggg	1560
tgaagtcgta acaaggtagc cgt	1583

5

<210> 49

<211> 1519

<212> ADN

<213> *Clostridium coccooides*

10

<220>

<221> ARNr
 <222> (1)..(1519)
 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 29 de *Clostridium*

5 <400> 49

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac      60
gggtgtacgg gaaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag      120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc      180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc      240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc      300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc      360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgcgt ggggtgaagaa      420
gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaaagaaaa tgacgggtacc tgaagaagaa      480
gccccgggct aactacgtgc cagcagccgg cggtaattac gtaggggggc aggcgttatc      540
cggatttact gggtggtaaa ggggggcgca aacggcgatg gcaggccagg aatggaaagc      600
ccggggggccc aaccccggga cttgctcttg ggaaactggc ttggctggga gtggcaggag      660
gggcaggcgg aaattcctgg tggtagcggg ggaaaatggc taaaaatcaa gaagaaaaac      720
cgggtggggaa aggcggcctg gtgggactgc gaactgacgt tgaaggcccg aaagcgtggg      780
gaacaaacag gatagattcc ctggtagttc cacgccgtaa acgatgatta ctaggtgtcg      840
gggagcagag actgcccggt gccgcagcca acgcattaag taatccacct ggggagtacg      900
ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac ggggaccgca acaagcgggt gagcatgtgg      960
tttaattcga agcaacgcga agaaccttac ctggctctga catcccgatg acgagtgagc     1020
aaagtcactt tcccttcggg gcattggaga cagggtggtc atggttgtcg tcagctcgtg     1080
tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag     1140
gtagagctgg gactctgga gagactgccg gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg     1200
tcaaatacat atgcccctta tgatcagggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag     1260
ggaagcgaga cggtgacgtt aagcaaatac caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt     1320
ctgcaactcg actacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg     1380
aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcgg aaatgccoga     1440
agtcagtgac ctaaccgaaa ggaaggagct gccgaagggt gagccggtaa ctggggtgaa     1500
gtcgtaacaa ggtagccgt                                     1519
    
```

10 <210> 50
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1497)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 30 de *Clostridium*

<400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 1475

<212> ADN

15 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1475)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 31 de *Clostridium*

<400> 51

gagtttgatc ctggctcagg ataaacgctg gcggcgcaca taagacatgc aagtcgaacg	60
aacttaatac cttgcttgca aggtaagcgg ttagtgccgg actggtgagt aacacgtaag	120
aaatctgcct atcagagggg aataacagtg agaaatcact gctaataccg catatgccat	180
agttatcgca tgataatagt gggaaagaag caattcgctg atagatgagc ttgcggctga	240
ttagctagtt ggtggggtaa cggcctacca aggcgacgat cagtagccgg cctgagaggg	300
tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga	360
atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgacgccgc gtgagtgaag aagtatttcg	420
gtatgtaaag ctctatcagc agggaagaaa atgacggtag ctgactaaga aagccccggc	480
taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggggcaa gcgttatccg gatttactgg	540
tgtaaaggga gcgtagacgg cagcgcaagt ctgagtgaag tcccatggct taccatgaa	600
actgcttttg aaactgtgca gctggagtgc aggagaggta agcgggaatcc tagtgtagcg	660
gttgaaatgc gtagattatc agaaggaaca ccggtggccg aggcggcctg ctgggctttt	720
actgacgtg aggcctcgaag cgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg	780
cggtaaacga tgattactag gtgtgggtgg actgaccca tccgtgccgg agttaacaca	840
ataagtaatc cacctgggga gtacggccgc aagggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg	900
ccgcacaaag cagtggagta tgtggtttta ttcgacgcaa cgcaagaac cttaccaggt	960
cttgacatcg agtgacggac atagagatat gtctttcctt cgggacacga agacaggtgg	1020
tgcatgggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa	1080
cccttaccat tagttgctac gcaagagcac tctaattgga ctgccgttga caaaacggag	1140
gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggcgaca cacgtactac	1200
aatggcggtc aacagaggga ggcaaagccg cgaggcagag caaacccta aaagccgtct	1260
cagttcggat tgcaggctgc aactcgcctg catgaagtcg gaattgctag taatcgcgga	1320
tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc acaccatgag	1380
agccggtaac acccgaagtc aatagtctaa ccgcaaggag gacattgccg aaggtgggat	1440
tggttaattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt	1475

<210> 52

<211> 1491

<212> ADN

15 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 32 de *Clostridium*

<400> 52

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
gagaatcagt ggattgagga ttcgtccaaa tgaaactgag gaaagtggcg gacgggtgag      120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaaacagc cgctaataacc      180
gcatgataca gttgggaggc atctctctga ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc      240
tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggccacca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag      420
aaggctttcg gggtgtaaac ttcttttctg ggggacgaac aaatgacggt accccaggaa      480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatag gtaggtggca agcgttatcc      540
ggatttattg ggtgtaaagg gcgtgtaggc gggaatgcaa gtcagatgtg aaaactatgg      600
gctcaacca tagcctgcat ttgaaactgt atttcttgag tgctggagag gcaatcggaa      660
ttccgtgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tacggaggaa caccagtggc gaagcggatt      720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc      780
tggtagtcca cgccgtaacg atggatacta gtgtgggggg actgaccccc tccgtgccgc      840
agctaacgca ataagtatcc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga      900
attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagt atgtggttta attcgaagca acggaagaa      960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga accagagatg gattaggtgc ccttcgggga      1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt      1080
cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc      1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgccctt tacgtcctgg      1200
gccacacacg tactacaatg gcggttaaca aagagaggca agaccgcgag gtggagcaaa      1260
tctcaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc cgcctgcgtg aagttggaat      1320
cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacggt cccgggcctt gtacacaccg      1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aaggggggcg      1440
cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t      1491

```

<210> 53

<211> 1495

<212> ADN

15 <213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1495)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 33 de *Clostridium*

<400> 53

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcgggcgtgc ctaacacatg caagtccaac      60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag      120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc      180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc      240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc      300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggagggcagc      360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgct gggtgaagaa      420
gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaat gacggtacct gaagaagaag      480
ccccggctaa ctacgtgcc aagcccgcg taatacgtag ggggcaagcg ttatccggat      540
ttactgggtg taaagggggc gcagacggcg atgcaagcca ggagtgaag cccggggccc      600
aaccgccgga ctgctcttgg aactgcgtgg ctggagtgc ggaggggagc gcggaattcc      660
tggtgtagcg gtgaaatgcg tagatatcag aggaacaccg gtggcgaaag cggcctgctg      720
gactgcaact gacgttgagg cccgaaagcg gtgggagcaa acaggattag ataccctggt      780
agtccacgcc gtaaagcatg attactaggt gtcggggagc agagactgcc cggtgccgca      840
gccccaacgc ttaagtatcc acctggggag tacgttcgca agaataaac tcaaaggaat      900
tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc      960
ttaccaggcc ttgacatccc cctggatggc ccgtaacggg gccagccctt tttgggcagg     1020
ggagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg     1080
caacgagcgc aaccctgcc cgcagtagcc agcattttag atggggactc tgccgggact     1140
gccggggaca acccgaggga aggcggggat gacgtcaa atcatgccc cttatggcct     1200
gggctacaca cgtgctacaa tggcgccgac agagggagga gaagcggcga cgcggagcga     1260
acccccaaaa cggcgtccca gttcggattg tagtctgcaa cccgactaca tgaagccgga     1320
atcgctagta atcgcggatc agaagtcgc ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtacacac     1380
cgcccgtcac accatgggag ccgggaatgc ccgaagtctg tgaccgaacc cgtaagggga     1440
ggggcagccg aaggcaggcc cggtgactgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt      1495

```

<210> 54

<211> 1493

<212> ADN

15 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 34 de *Clostridium*

<400> 54

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagcacccc tgaaggagtt ttccgacaac ggatgggaat gcttagtgct ggactggtga      120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac      180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc      240
tcgcgtctga tttgttagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag      420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa      480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat gtaggtggca agcgttgtcc      540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg      600
gctcaaccgg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag gtaatcggaa      660
ttccttgtgt agcggtgaaa tgcgtagata taaggaagaa caccagtggc gaaggcggat      720
tactggacga taactgacgg tgaggcgcca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc      780
ctggtagtcc acgctgtaaa cgatcgatac taggtgtgctg gggactgacc ccctgcgtgc      840
cggagttaac acaataagta tcgcacctgg ggagtacgat cgcaaggttg aaactcaaag      900
gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag      960
aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg      1020
gaaagcagag acaggtggtg catggtgtgc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa      1080
gtcccgcaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact      1140
gccgttgaca aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct      1200
gggctacaca cgtaatacaa tggcgggtta caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg      1260
aacccccaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga      1320
atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac      1380
cgcccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctaacc gcaaggaggg      1440
cgcgcccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt          1493

```

<210> 55

<211> 1498

<212> ADN

15 <213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1498)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 35 de *Clostridium*

<400> 55

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac	60
gggtgtacag aaggaagat tacggtcgga aggtctgtgc atgagtggcg gacgggtgag	120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc	180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc	240
gcgtctgatt attttttttg tcagggtaac ggccctaccaa agcgacgatc agtagccggc	300
ctgagagggc ggacggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggagggcag	360
cagtggggga tattgcacaa tggggggaac cctgatgcag cgacgccgcg tgggtgaaga	420
agcgctcgg cgcgtaaagc cctgtcagca gggaagaaaa tgacgggtacc tgaagaagaa	480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta aggggcaagc gttatccgga	540
tttactgggt gtaaaggggg cgacagcgcc gatgcaagcc aggagtgaag gccccgggcc	600
caacccccgg actgctcttg ggaactgcgg tggctggagt gcaggagggg caggccggaa	660
ttcctgggtg agcgggtgaa tgcgtagata tcaggaggaa caccgggtggc gaaggcggcc	720
tgctggactg caactgacgt tgaggccgga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc	780
ctggtagtca cgccgtaaag gatgattact aggtgtcggg gagcagagac tgcccgggtgc	840
cgcagccaac gcattaagta atccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg aaactcaaag	900
gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag	960
aaccttacca ggccttgaca tccccctgga tggcccgtaa cggggtcagc ctttcggggc	1020
aggggagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt ggggttaagtc	1080
ccgcaacgag cgcaacccct gcccgagta gccagcattt tagatgggga ctctgcgggg	1140
actgccgggg acaacccgga ggaaggcggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatgg	1200
cctgggctac acacgtgcta caatggcgcc gacagaggga ggcgaagcgg cgacgcggag	1260
cgaaccccaa aaacggcgtc ccagttcgga ttgtagtctg caacccgact acatgaagcc	1320
ggaatcgcta gtaatcgcg atcagaatgc cgcggtgaat acgttcccgg gtcttgtaca	1380
caccgcccgt cacaccatgg gagccgggaa tgcccgaagt ctgtgaccga acccgtaagg	1440
10 ggaggggagc ccgaaggcag gcccggtgac tgggggtgaag tcgtaacaag gtagccgt	1498

<210> 56

<211> 1491

<212> ADN

15 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1491)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 36 de *Clostridium*

<400> 56

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggaagc ttaacacatg caagtccaac	60
ggagcgcccta tgaaggagat ttcggtcaac ggaataggct gcttagtggc tgacgggtga	120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctttcagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac	180
cgcataaacac ataggtgtcg catggcattt atgtcaaaga tttatcgctg aaagatggcc	240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcgacgat cagtagccgg	300
actgagaggt tagccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca	360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaagggaag	420
aaggctttcg gggtgtaaac ttcttttaag agggaagagc agaagacggc acctcttgaa	480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagtggcaa gcgttgtccg	540
gatttactgg gtgtaaaggc cgtgtagccg ggctgacagt cagatgtgaa attccggggc	600
tcaacccccg acctgcattt gaaactgttg gtcttgagta tcggagaggc aggcggaatt	660
cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt aggaggaaca ccagtggcga aggcggcctg	720
ctggacgaca actgacgggtg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct	780
ggtagtccac gctgtaaacg atggatacta ggtgtgcggg gactgacccc ctgcgtgccg	840
cagttaaacac aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caagggtgaa actcaaagga	900
attgacgggg gcccgacaaa gcgggtggatt atgtggttta attcgatgca acgcaagaa	960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga ggtagagata cgtcaggtgc ccttcgggga	1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt	1080
cccgcaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc	1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatac tcatgcccct tatgtcctgg	1200
gctacacacg taatacaatg gcggtaaaca gagggatgca atactgcga gtggagcgaa	1260
cccctaaaag ccgtcccagt tcagattgca gtctgcaact cgactgcatg aagtcggaat	1320
cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg	1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aaggagggcg	1440
cgggccgaagg tgggttcgat aattgggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t	1491

<210> 57

<211> 1493

<212> ADN

15 <213> *Clostridium coccooides*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 37 de *Clostridium*

<400> 57

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcgggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac      60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag      120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc      180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cggtggtaca ggatgggccc      240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc      300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc      360
agtgggggat attgcacaat ggggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga      420
agtatttcgg tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaaa tgacgggtacc tgactaagaa      480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg gggggcaagc gttatccgga      540
tttactgggt gtaaaggag cgtagacggc agcgcaagtc tgaagtgaag tcccatggct      600
taaccatgga actgctttgg aaactgtgca gctggagtgc aggagaggta agcgggaattc      660
ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa ggcggcttac      720
tggactgtac tgacgttgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg      780
tagtccacgc cgtaaacgat gattactagg tgttggggga ccaaggtctt cggtgccggc      840
gcaaacgcat taagtaatcc acctggggag tacgttcgca agaagaaac tcaaaggaat      900
tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc      960
ttacctggtc ttgacatccc gatgacgagt gagcaaagtc actttccctt cggggcattg     1020
gagacagggt gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc     1080
aacgagcgca acccctatct ccagtagcca gcaggtagag ctgggcactc tggagagact     1140
gccccgggata accgggagga aggcggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatgatca     1200
gggctacaca cgtgctacaa tggcgtaaac aaagggaagc gagacggtga cgttgagcaa     1260
atccccaaaa taacgtccca gttcggattg tagtctgcaa ctcgactaca tgaagctgga     1320
atcgctagta atcgcgaaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtacacac     1380
cgcccgtcac accatgggag tcggaaatgc ccgaagtcag tgacctaac gaaaggaagg     1440
10 agctgccgaa ggtggagccg gtaactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt      1493

```

<210> 58

<211> 1493

<212> ADN

15 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1493)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 38 de *Clostridium*

<400> 58

```

aaagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga      120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac      180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc      240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag      420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa      480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat gtagtggcaa gcgttgtccg      540
gatttactgg gtgtaaaggg cgtgcagccg gagagacaag tcagatgtga aatccacggg      600
ctcaaccctg gaactgcatt tgaaactgtt tcccttgagt gtcggagagg taatcggaat      660
tccttgtgta gcggtgaaat gcgtagatat aaggaagaac accagtggcg aaggcggatt      720
actggacgat aaactgacgg tgaggcgcca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc      780
ctggtagtcc acgctgtaaa cgatcgatac taggtgtgcg gggactgacc ccctgcgtgc      840
cggagttaac acaataagta tcgcacctgg ggagtacgat cgcaaggttg aaactcaaag      900
gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag      960
aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg      1020
gaaagtagag acaggtggtg catggtgtgc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa      1080
gtcccgcaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact      1140
gccgttgaca aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct      1200
gggctacaca cgtaatacaa tggcgggtta caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg      1260
aacccccaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga      1320
atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac      1380
cgcccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctaacc gcaaggaggg      1440
cgcggccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt      1493

```

<210> 59

<211> 1511

<212> ADN

15 <213> *Clostridium leptum*

<220>

<221> ARNr

<222> (1)..(1511)

5 <223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 39 de *Clostridium*

<400> 59

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagcaccctc tgaaggagtt ttccgacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga      120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac      180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc      240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg      300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag      420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa      480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac gtaggtggca agcgttgtcc      540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg      600
gctcaaccgg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag gtaatcggaa      660
ttccttgtgt agcgggtgaaa tgcgtagata taaggaagac accagtggcg aagcggatta      720
ctggacgata actgacggtg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagatacctg      780
ggtagtcaac gctgtaaacg atcgatacta ggtggtgcgg gggacttgac cccctgccgt      840
tgccggagtt aacaccaata aagtattcgg caccctgggg agtacgatcg caaaggttga      900
aaactcaaaa gaaatggacg gggggcccg cccaagcgg gtgggattat gttggtttat      960
ttcgaaagca acgcgaagaa ccctaacagg gcttgacatc ctgctaacga agtagagata     1020
cattaggtgc ccttcgggga aagtagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt     1080
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgctacgcaa     1140
gagcactcta gcgagactgc cgttgacaaa acggaggaag gcggggacga cgtcaaatca     1200
tcatgcccct tatgtcctgg gctacacacg taatacaatg gcggttaaca aagggatgca     1260
aagccgcgag gcagagcgaa ccccaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc     1320
cgctgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt     1380
cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtcgta     1440
gcctaaccgc aaggagggcg cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac     1500
aaggtagccg t                                                    1511

```

10

<210> 60

<211> 1499

<212> ADN
<213> *Clostridium leptum*

<220>

5 <221> ARNr

<222> (1)..(1499)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 40 de *Clostridium*

<400> 60

10

```

agagtttgat cctggctcag gataaacgct ggccggcatgc ctaacacatg caagtcgaac      60
ggagcgcctt ggaaggagac ttcggtcaac ggaagaggag gcttagtggc ggacgggtga      120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctacagagagg gggataaacac accgaaaggt gtgctaatac      180
cgcataacat atgagagggg catccctttc atatcaaaga tttattgctt tgagatggcc      240
tcgcgtccaa ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat tggtagccgg      300
actgagaggt tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca      360
gcagtgggga atattgcaca atggggggaa ccctgatgca gcaatgccgc gtgaaggatg      420
aaggttttcg gattgtaaac ttcttttgta cgggacgaag aaagtgcagg taccgtaaga      480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgccgtaata cgtaggtggc aagcggtatc      540
cggatttact ggggtgtaaag ggcgagtagg cgggattgca agtcagatgt gaaaactatg      600
ggctcaaccg atagagtgca tttgaaactg cagttcttga gtgatggaga ggcaggcgga      660
attcccgggtg tagcgggtgga atgcgtagat atcgggaggg aacaccagtg gcgaaggcgg      720
cctgctggac attaactgac gctgatgcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata      780
ccctggtagt cacgctgtaa acgatgatta ctaggtgtgg ggggtactga ccccttccc      840
gtgccggagt taacacaata agtaatccac ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc      900
aaaggaattg acggggggccc gcacaagcag tggagtatgt ggttttaatt cgaagcaacg      960
cgaagaacct taccagggtg tgacatgggg atgaccgctt tagagataga gctttctctt     1020
cggagacatc ccacacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg     1080
ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt gttagtgtgct acgcaagagc actctagcga     1140
gactgccgtt gacaaaacgg aggaaggtgg ggacgacgtc aaatcatcat gccctttatg     1200
tcctgggcta cacacgtact acaatggcgg acatacagag ggaagcaaga cagcgatgtg     1260
gagcaaatac ctaaaagccg tctcagttca gattgcaggc tgcaaccgcg ctgcatgaag     1320
tcggaattgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta     1380
cacaccgccc gtcacaccat gagagtcgga aacacccgaa gcctgtagcc caaccgcaag     1440
gggggacgag tcgaaggtgg gtctgataat tgggggtgaag tcgtaacaaa ggtagccgt      1499

```

<210> 61

15 <211> 1512

<212> ADN
<213> *Clostridium coccooides*

<220>

5 <221> ARNr

<222> (1)..(1512)

<223> secuencia del gen que codifica para ARNr 16S de la cepa 41 de *Clostridium*

<400> 61

10

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac      60
ggagatatca ttttcgaagc gattagttta ctaagagcgg agatgttgct atcttagtgg      120
cggacgggtg agtaacgcgt gggtaacctg ccttgactg ggggataaca cttagaaata      180
ggtgctaata ccgcataaca gtaggagacg catgtctttt acttgaaaac tccgggtggtg      240
taagatggac ccgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa cggcccacca aggcaacgat      300
cagtagccgg cctgagaggg tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct      360
acgggaggga gcagtgggga atattggaca atggggggaa ccctgatcca gcgacgccgc      420
gtgagtgaag aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc agggagaaga gaaatgacgg      480
tacctgacta agaagccccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtataa cgtagggggc      540
aagcgttatc cggatttact ggggtgtaaag ggagcgtaga cggcgatgca agtctgaagt      600
gaaaggcggg ggcccaaccc ccgactgct ttggaaactg tatggctgga gtgcaggaga      660
ggtaagtgga attcctagtg tagcggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg      720
cgaaagcggc ttactggact gtaactgacg ttgaggctcg aaagcgtggg gagcaaacia      780
gattagatac ctggtagtca cgccgtaaac gatgatcacc ggtttcgggtg ggttatggac      840
ccatcggttg cgcagcaaac gcagtagtga tccacctggg gagtaacgtt cgcaagaatg      900
aaacttcaaa ggaaatgacg ggggacccgg cacaagcggg ggaggcatgt gtttaattcg      960
aagcaacgcg aagaacctta cccaagtctt gacatcccgt gacgagttag taacgtcact     1020
ttcccttcgg ggcagcggag acagggtggt catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat     1080
gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cctatcctta gtagccagcg agttaggtcg     1140
ggcactctag ggagactgcc ggggacaacc cggaggaagg tggggatgac gtcaaatacat     1200
catgcccctt atgatttggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcagag     1260
cctgtgaagg taagcgaatc ccagaaataa cgtctcagtt cggattgtag tctgcaactc     1320
gactacatga agctggaatc gctagtaatc gcggatcaga atgccgcggg gaatacgttc     1380
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtcg gaaatgcccg aagtctgtga     1440
cccaacctga gaaggaggga gcagccgaag gcaggtcgga tgactggggt gaagtcgtaa     1500
caaggtagcc gt                                           1512

```

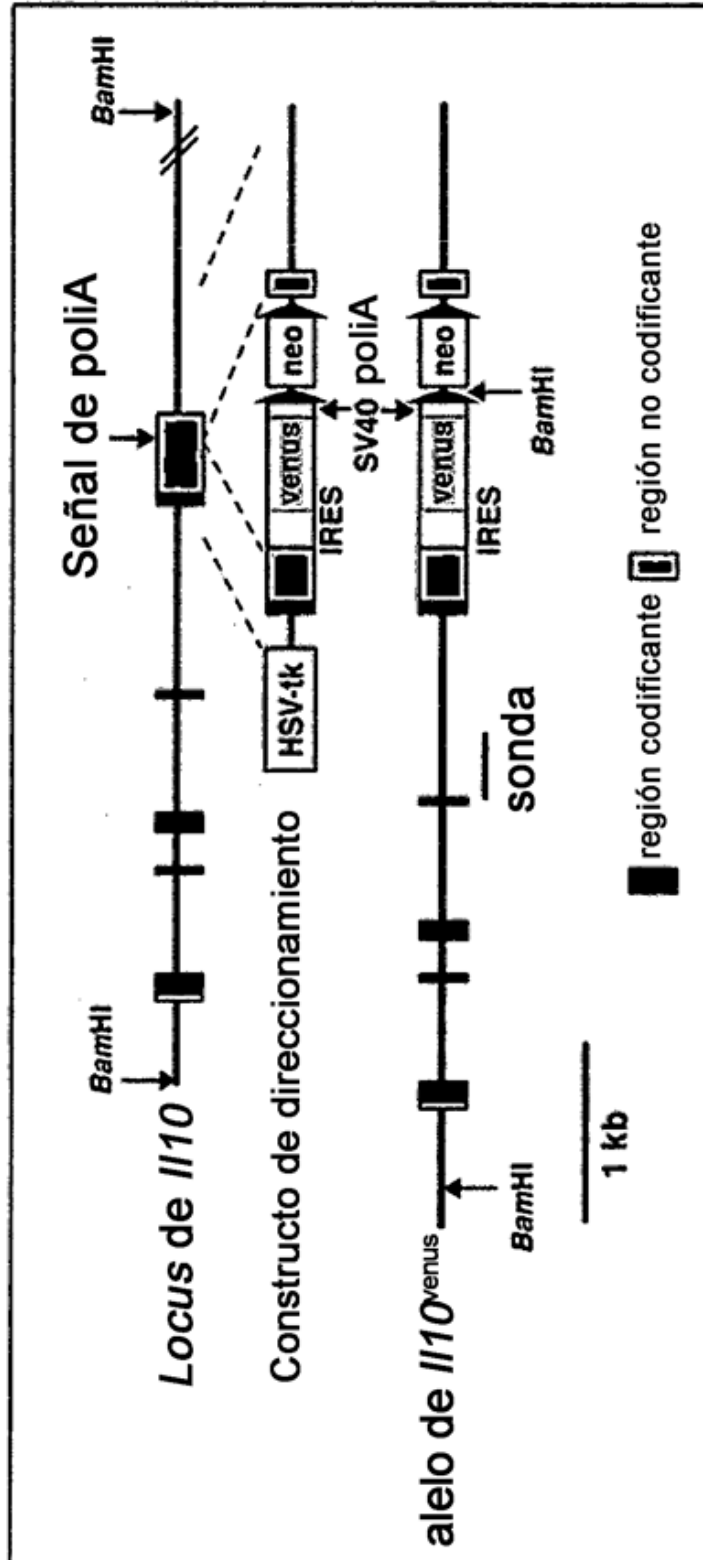
	<210> 62	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 62	
10	ggtgaatacg ttcccg	17
	<210> 63	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
20	<400> 63	
	tacggctacc ttgttacgac tt	22
25	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 64	
35	aaatgacggt acctgactaa	20
	<210> 65	
	<211> 22	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
45	<400> 65	
	cttgagttt cattctgcg aa	22
	<210> 66	
50	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 66	
	gcacaagcag tggagt	16
60	<210> 67	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	

	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 67	
5	cttctccgt ttgtcaa	18
	<210> 68	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
15	<400> 68	
	gagaggaagg tccccac	18
	<210> 69	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 69	
30	cgctactgg ctggtcag	19

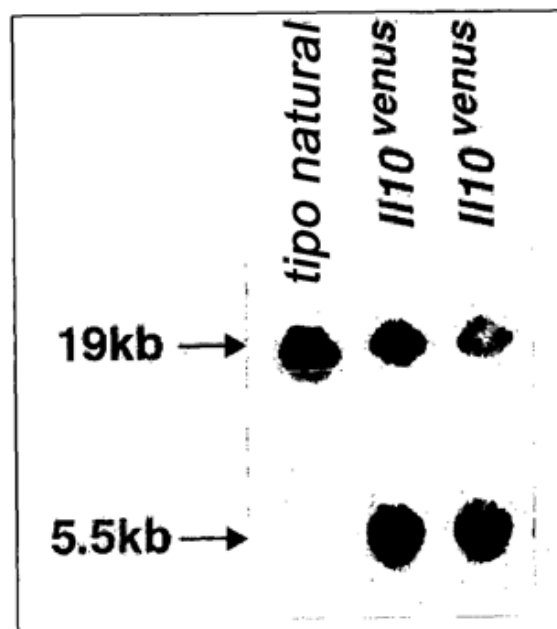
REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica mediante la inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3, comprendiendo la composición, como principio activo, bacterias pertenecientes al género *Clostridium* de los grupos XIVa y/o IV, en la que las bacterias inducen dicha proliferación o acumulación de células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que las bacterias pertenecen a los grupos XIVa y IV de *Clostridium* en combinación.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición comprende además bacterias pertenecientes a un grupo de *Clostridium* distinto del grupo XIVa o el grupo IV de *Clostridium*.
4. Composición para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que las bacterias pertenecientes a los grupos XIVa e IV de *Clostridium* en combinación comprenden múltiples cepas de bacterias pertenecientes al grupo XIVa o el grupo IV de *Clostridium* en combinación como principio activo.
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas bacterias según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores están en forma de esporas.
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas bacterias se obtienen de una muestra fecal obtenida de un humano.
7. Composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica mediante la inducción de proliferación o acumulación de células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3, comprendiendo la composición, como principio activo, una fracción de formación de esporas de materia fecal humana, en la que la fracción de formación de esporas induce dicha proliferación o acumulación de células T reguladoras positivas para el factor de transcripción Foxp3.
8. Composición para su uso según la reivindicación 7, en la que la fracción de formación de esporas puede obtenerse mediante tratamiento con cloroformo de materia fecal humana.
9. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enfermedad alérgica es alergia alimentaria.
10. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la enfermedad alérgica es polinosis o asma.
11. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición suprime la proliferación de células T efectoras.
12. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se formula como preparación farmacéutica para administración oral.
13. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se formula como preparación farmacéutica usando una composición que permite la administración al colon.
14. Composición para su uso según la reivindicación 13, en la que la composición se formula como unidad de dosificación de liberación retardada que tiene un material de recubrimiento adecuado para retrasar la liberación en 3-5 horas.
15. Composición para su uso según la reivindicación 13, en la que la composición se formula como preparación farmacéutica que emplea una composición sensible al pH que comprende un polímero entérico.

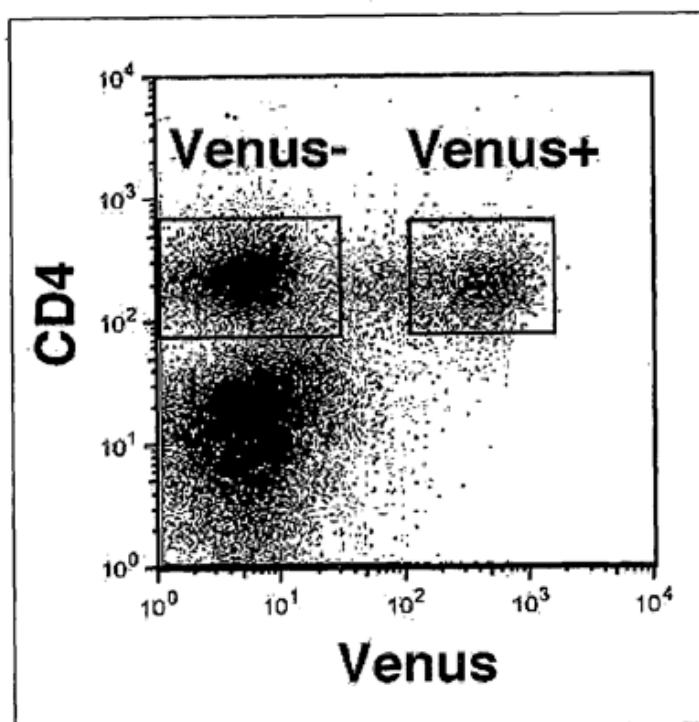
[Fig. 1]



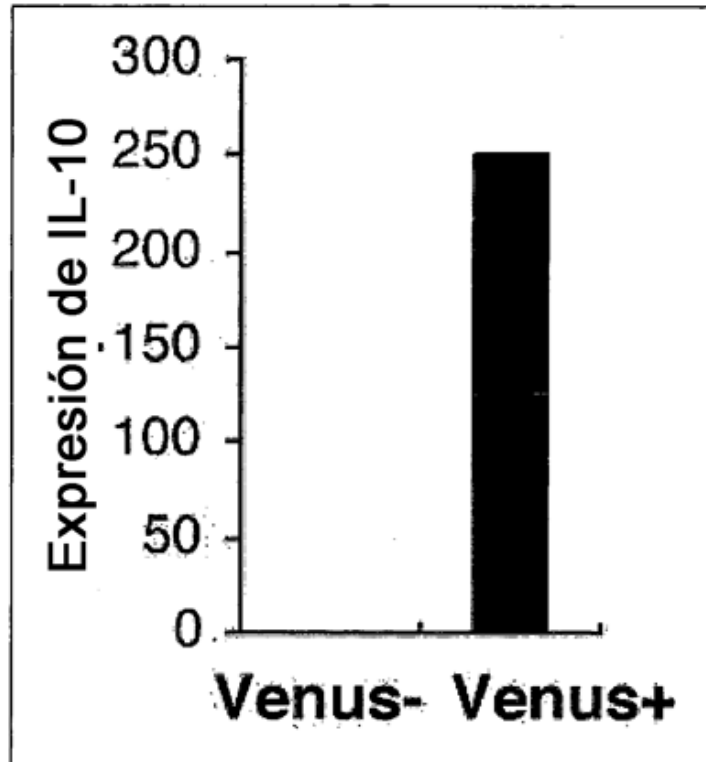
[Fig. 2]



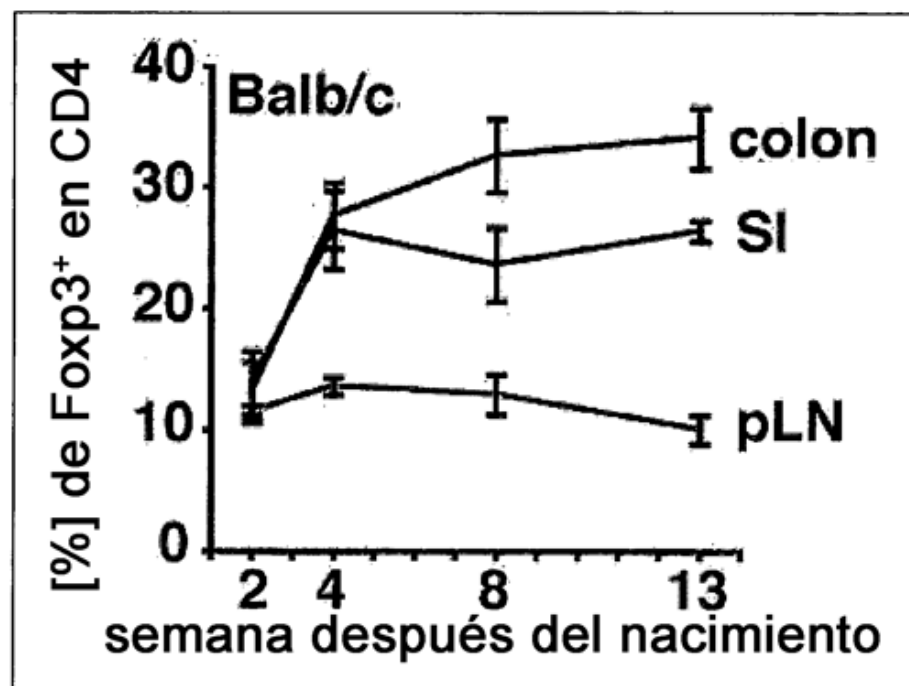
[Fig. 3]



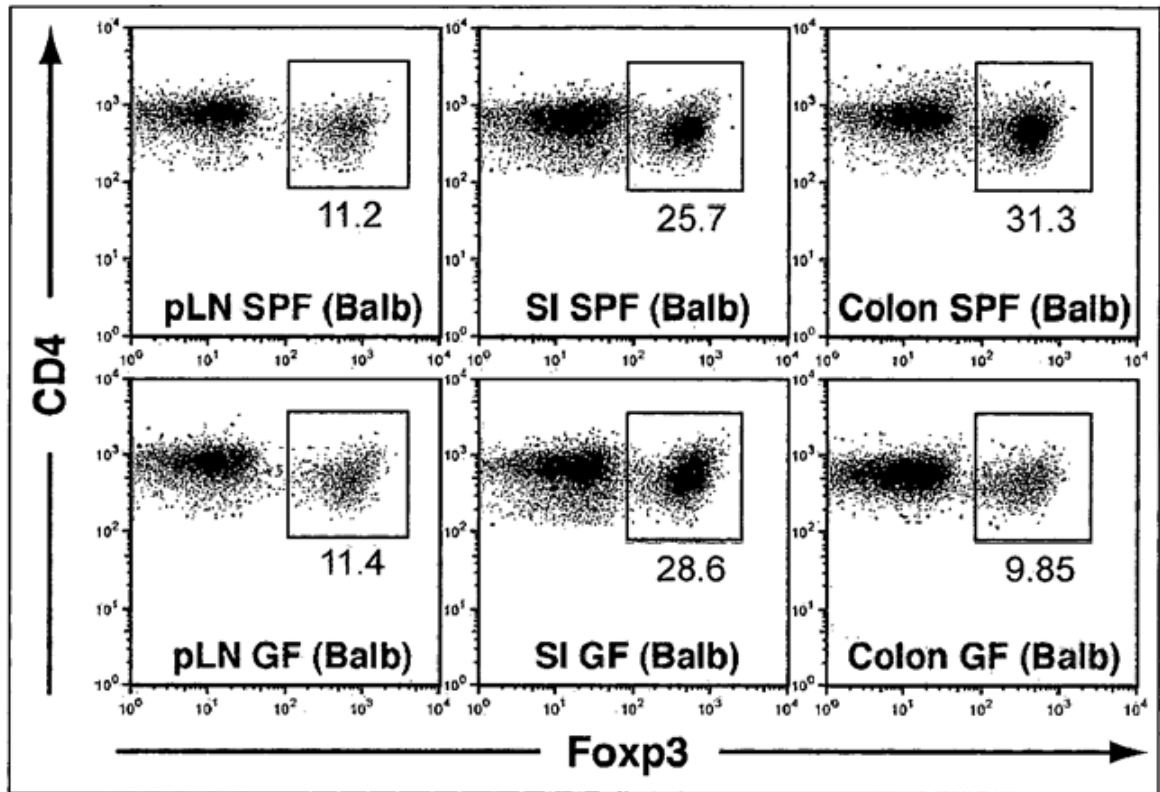
[Fig. 4]



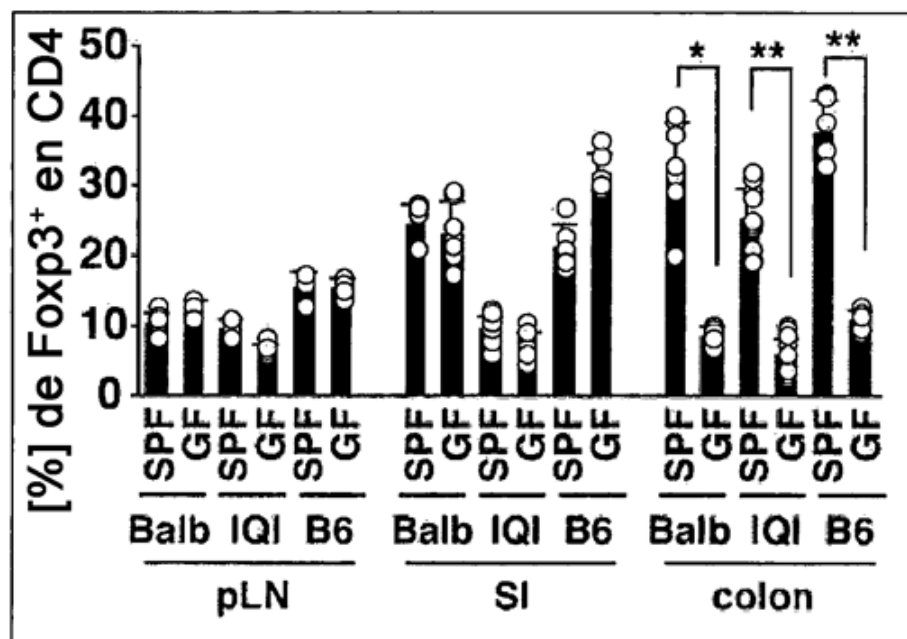
[Fig. 5]



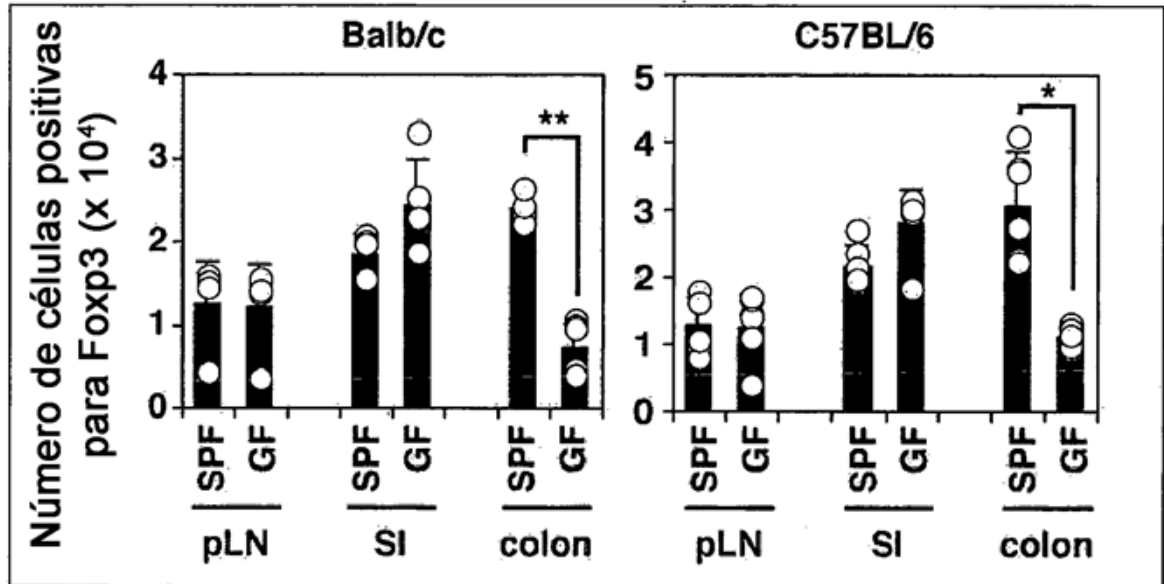
[Fig. 6]



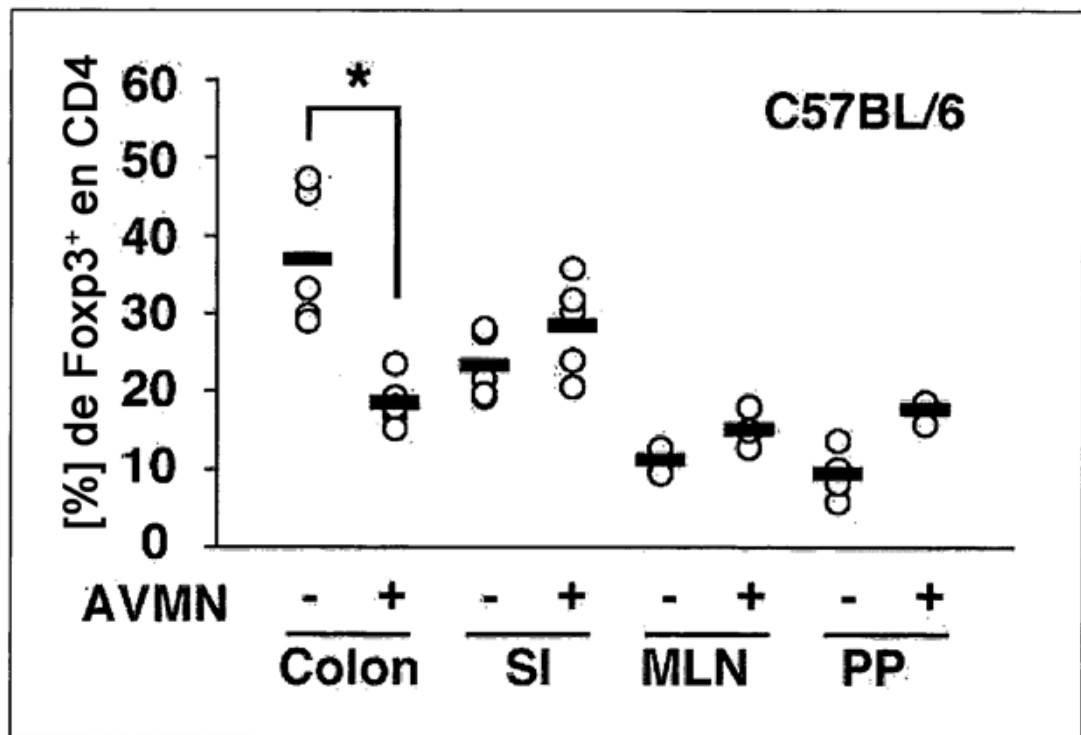
[Fig. 7]



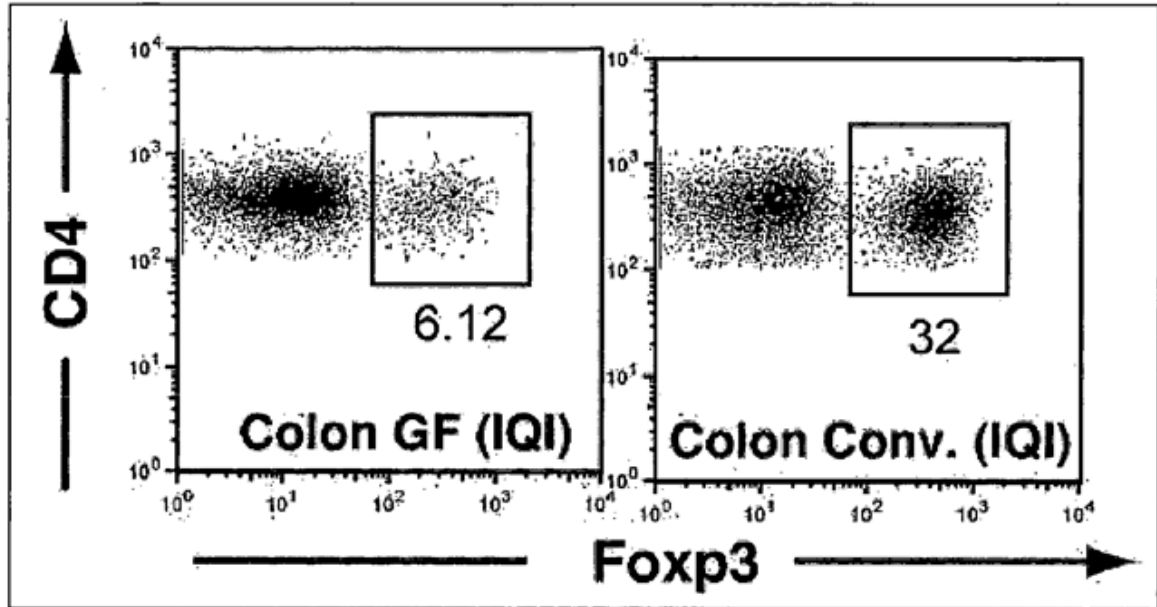
[Fig. 8]



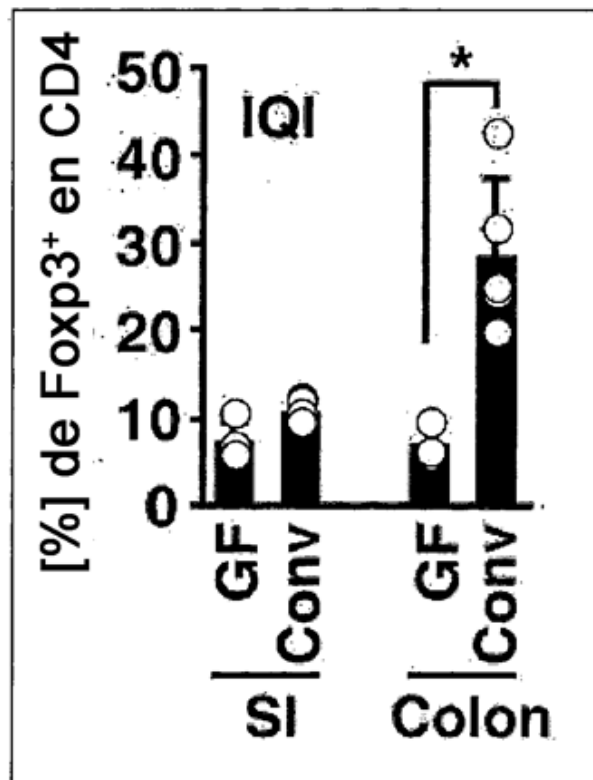
[Fig. 9]



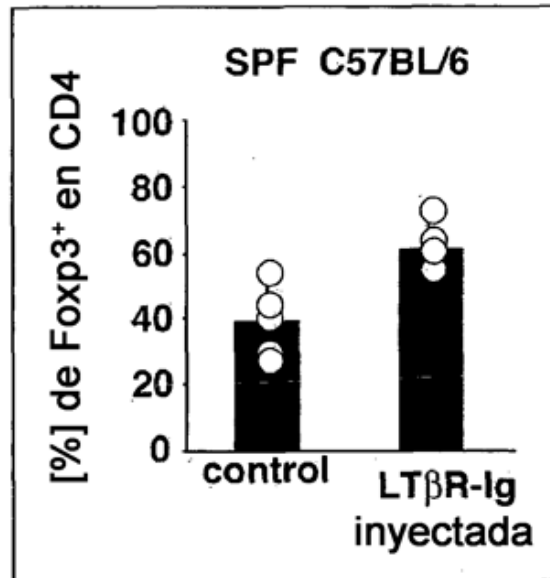
[Fig. 10]



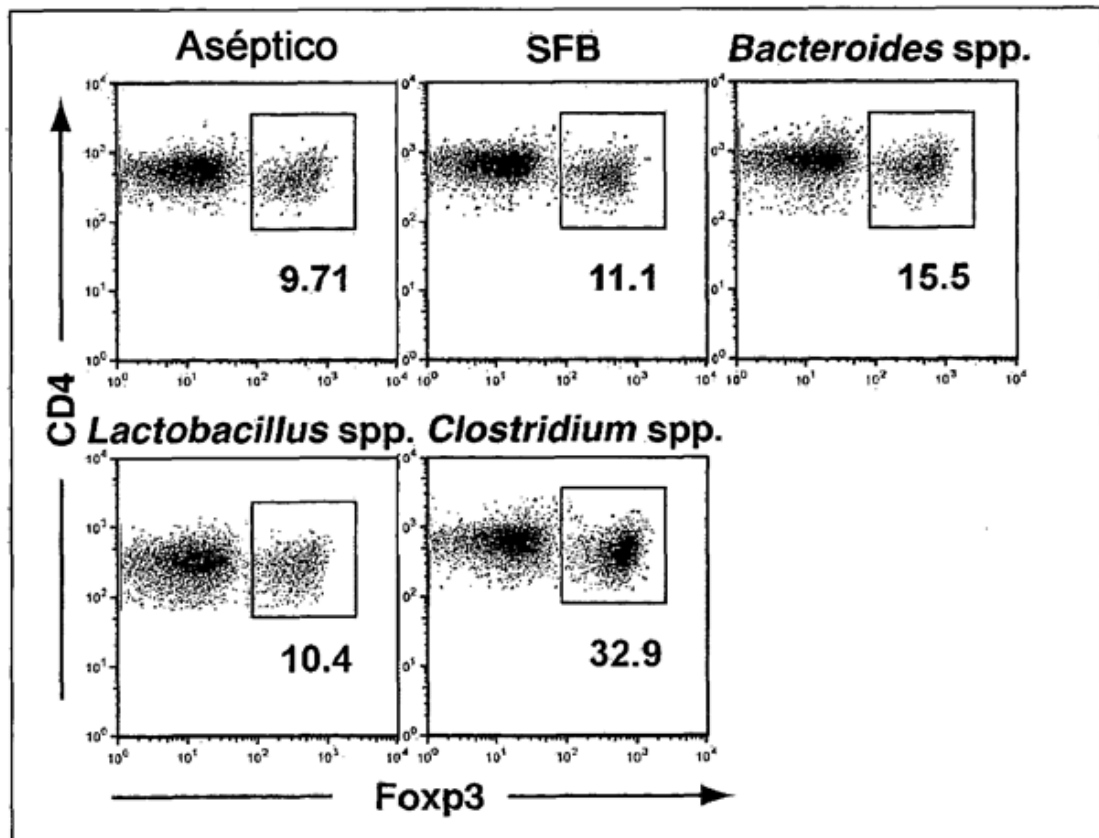
[Fig. 11]



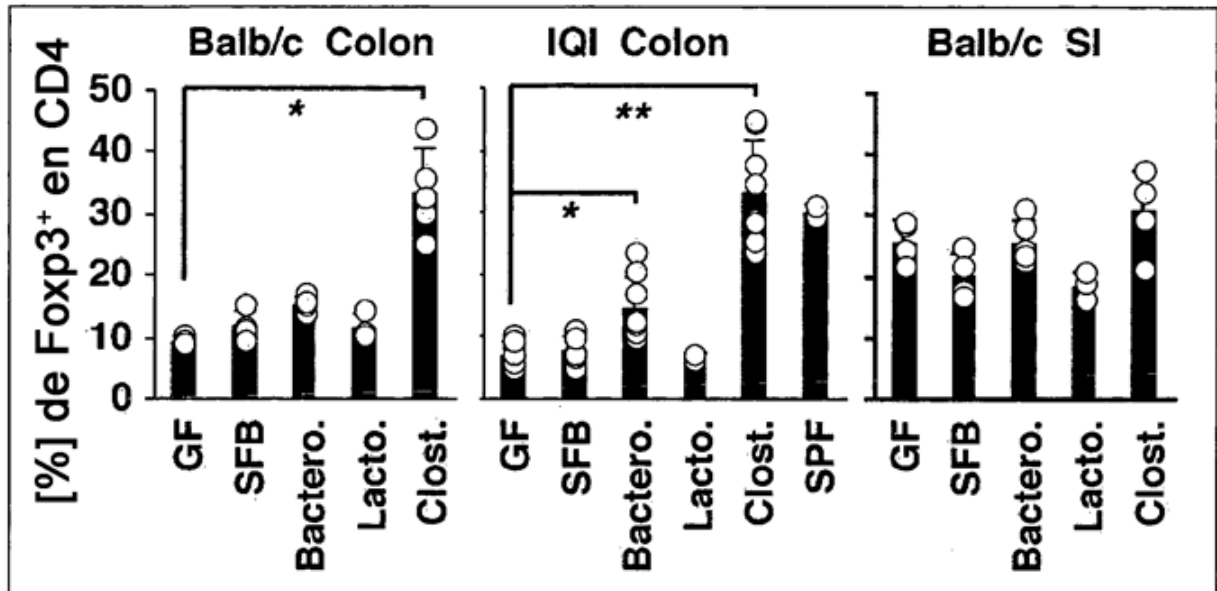
[Fig. 12]



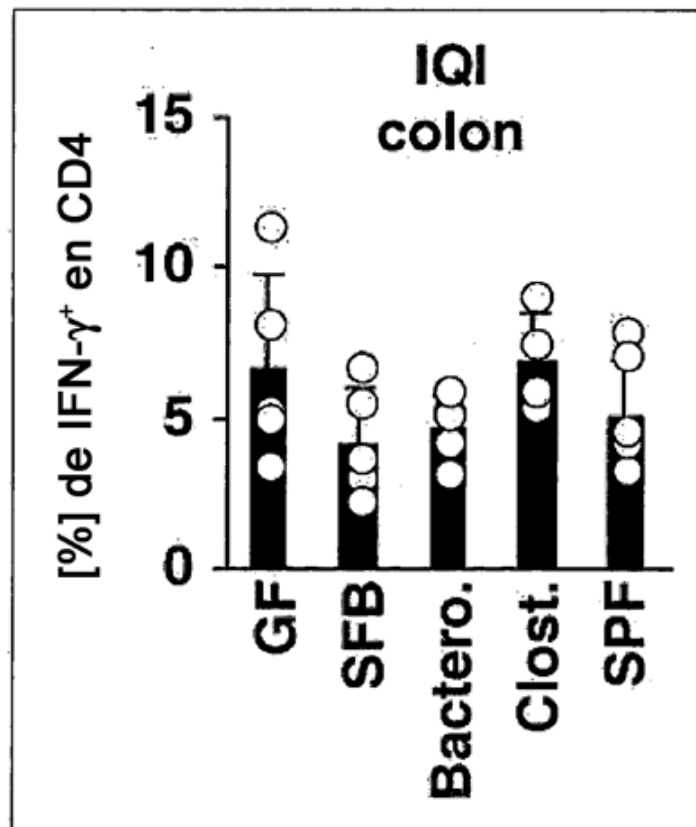
[Fig. 13]



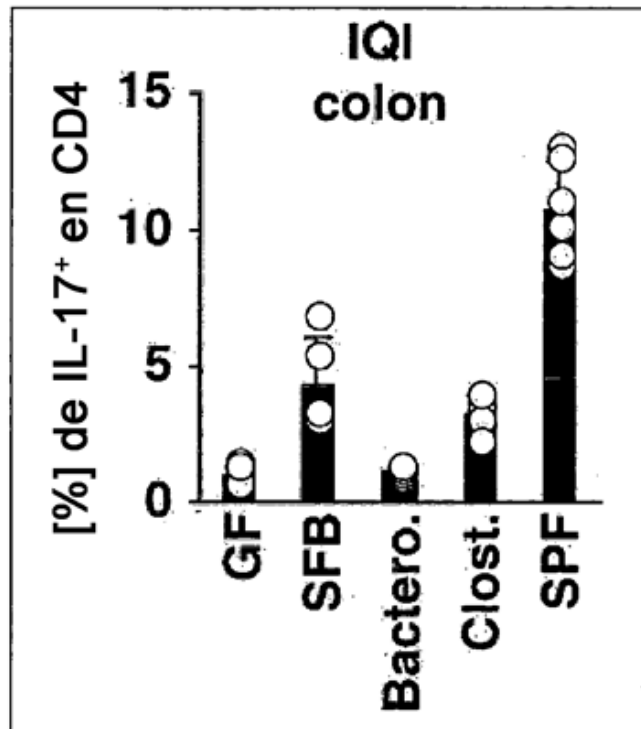
[Fig. 14]



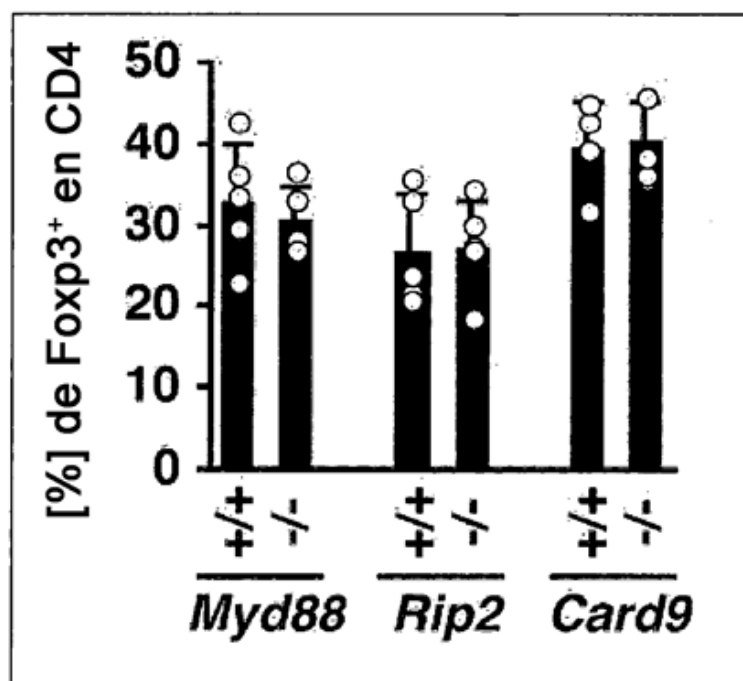
[Fig. 15]



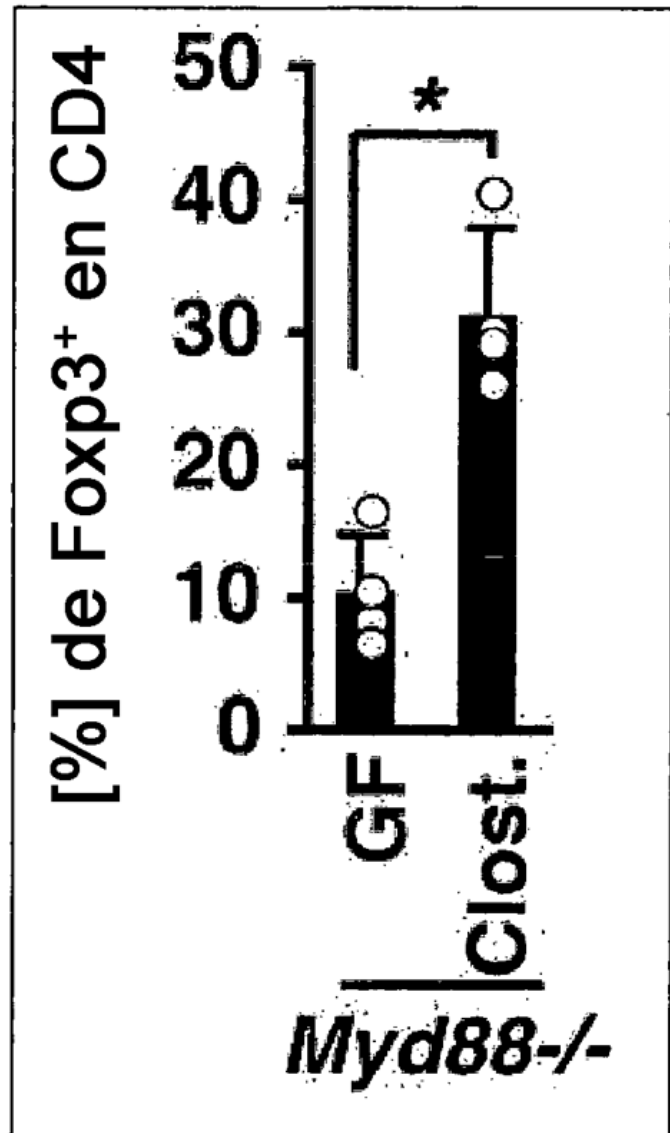
[Fig. 16]



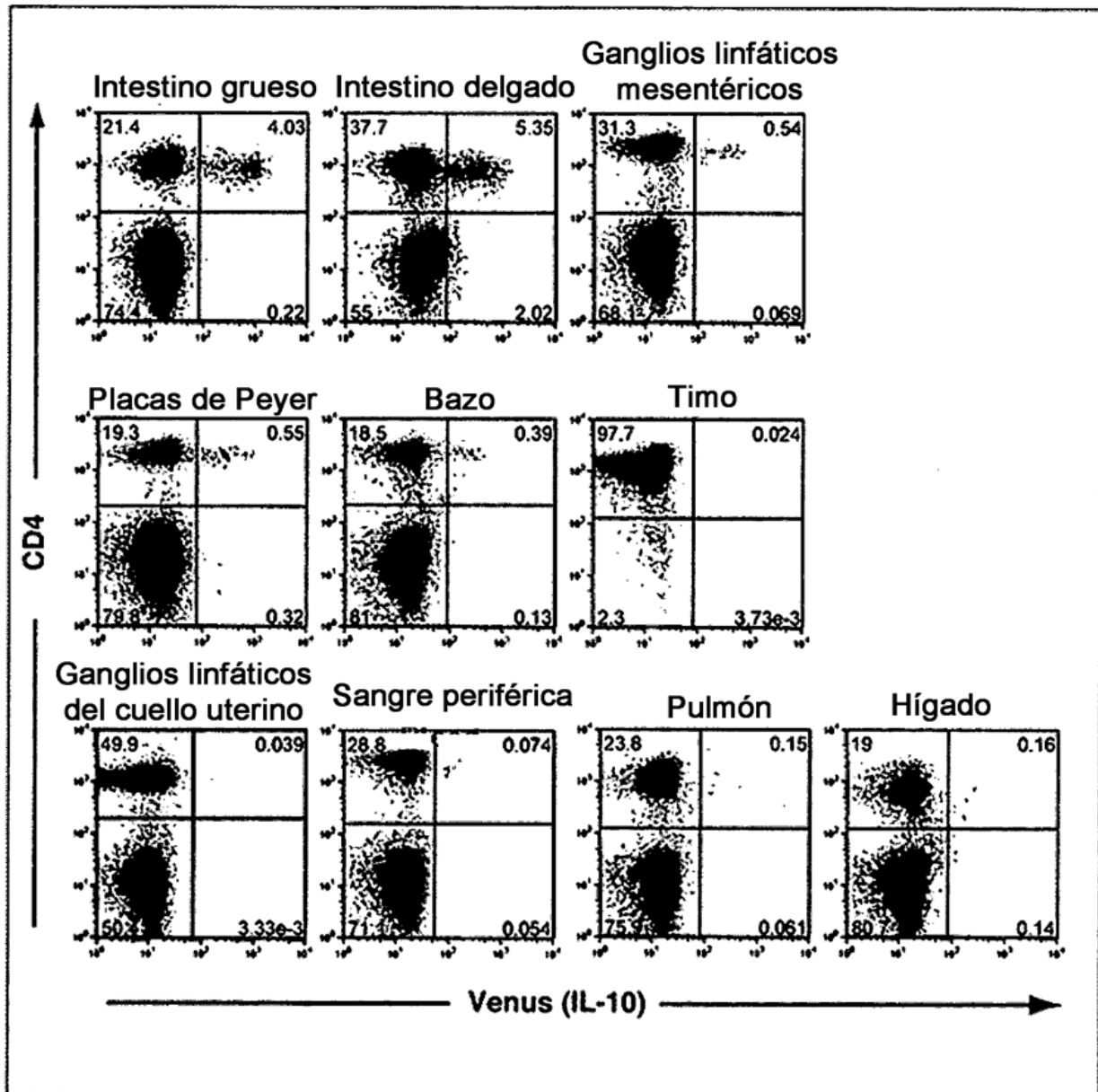
[Fig. 17]



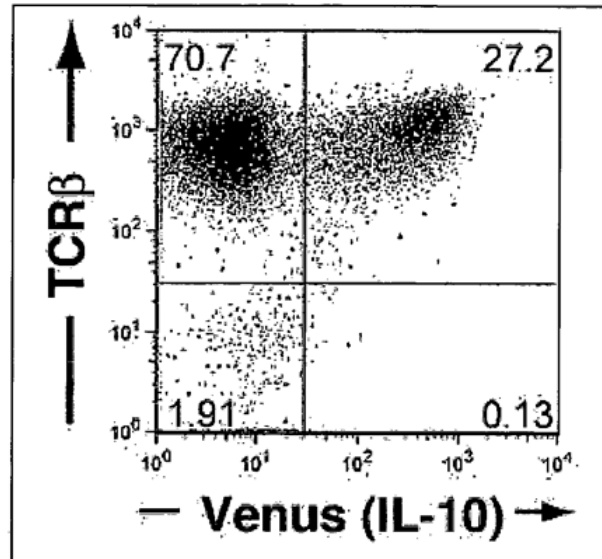
[Fig. 18]



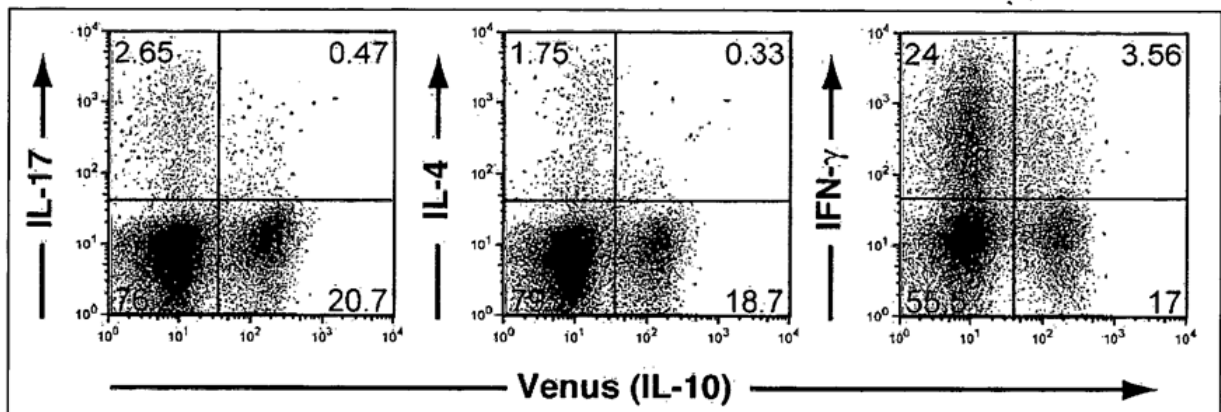
[Fig. 19]



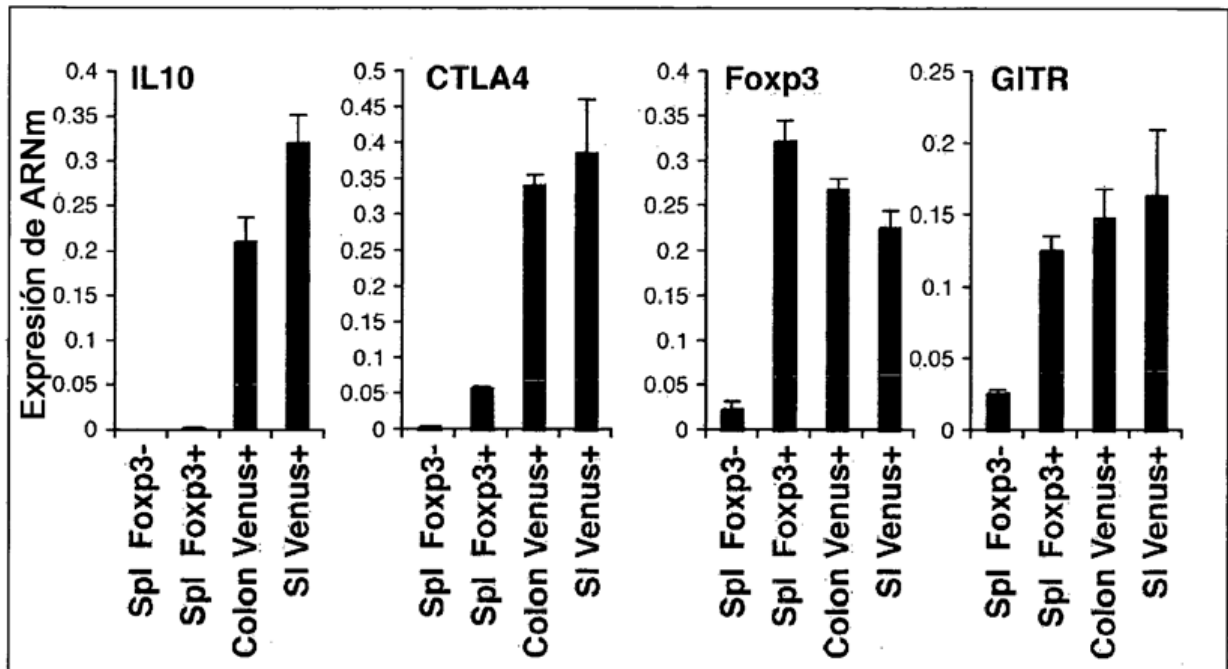
[Fig. 20]



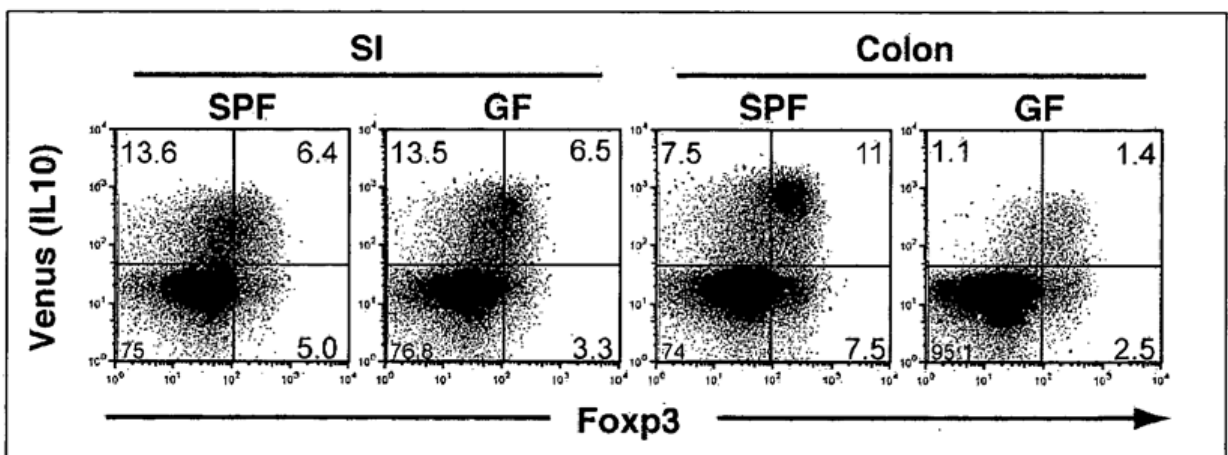
[Fig. 21]



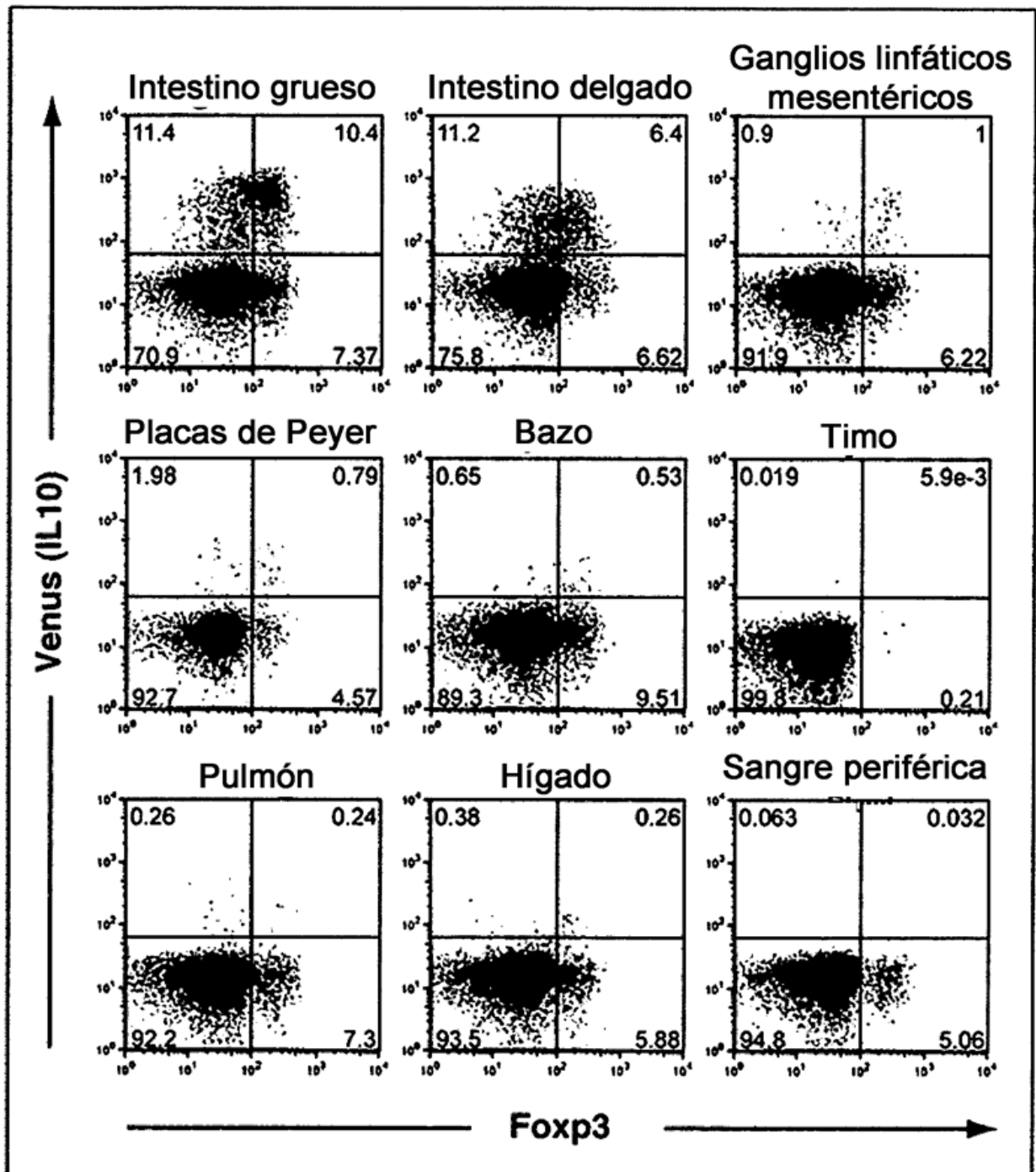
[Fig. 22]



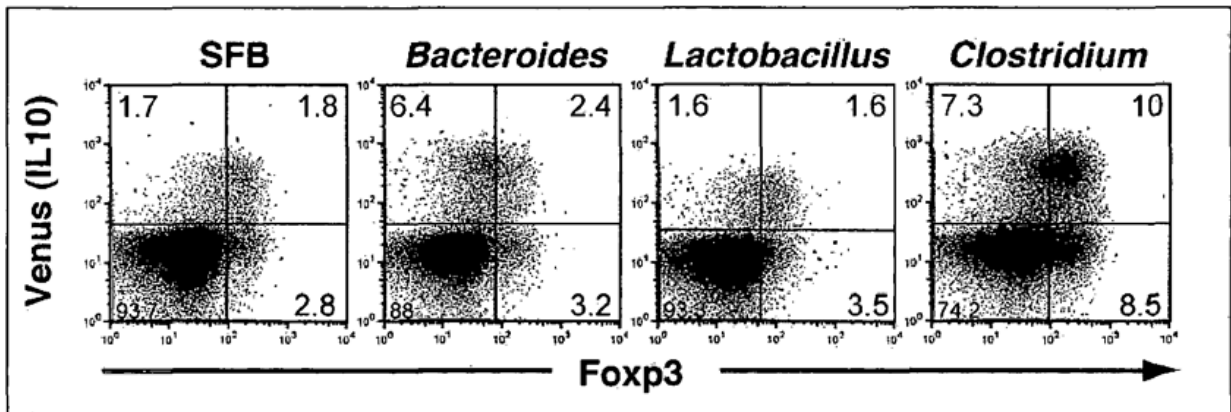
[Fig. 23]



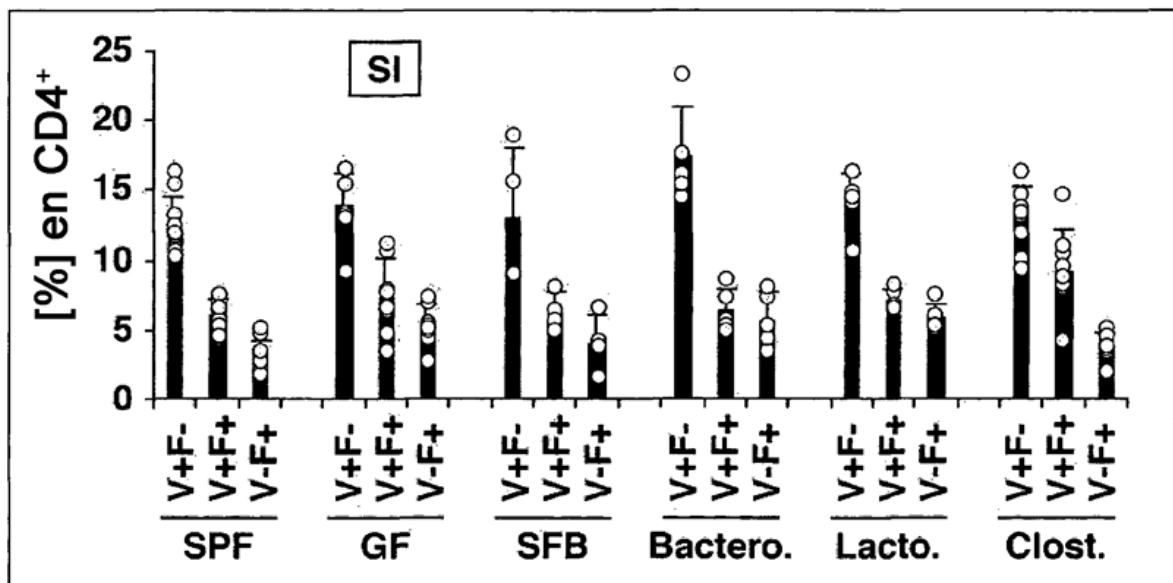
[Fig. 24]



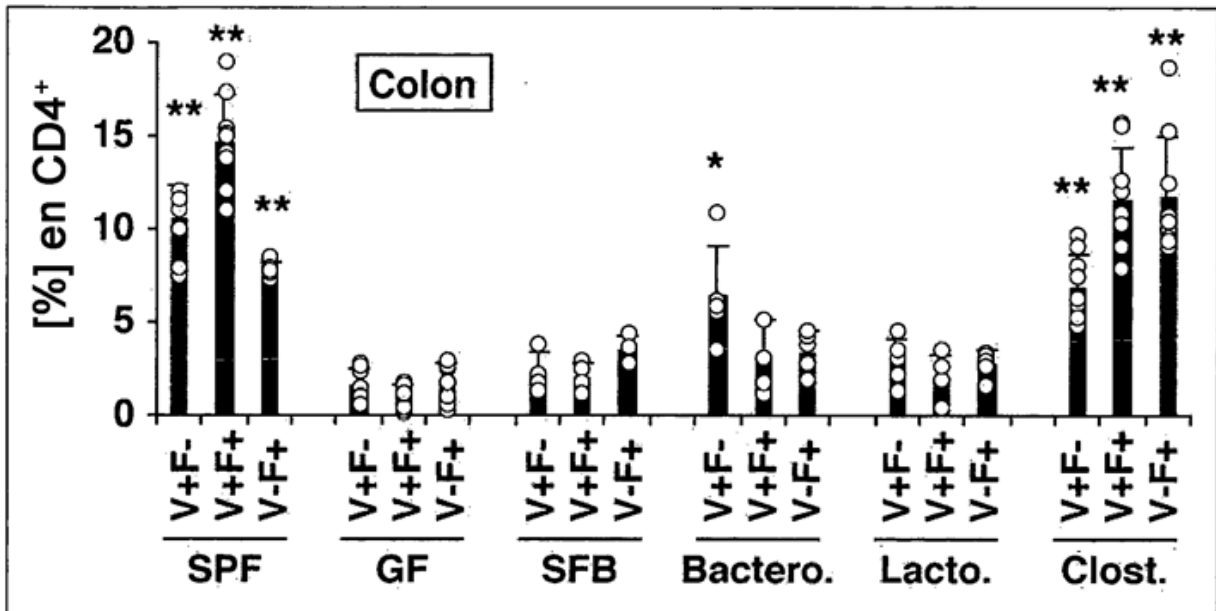
[Fig. 25]



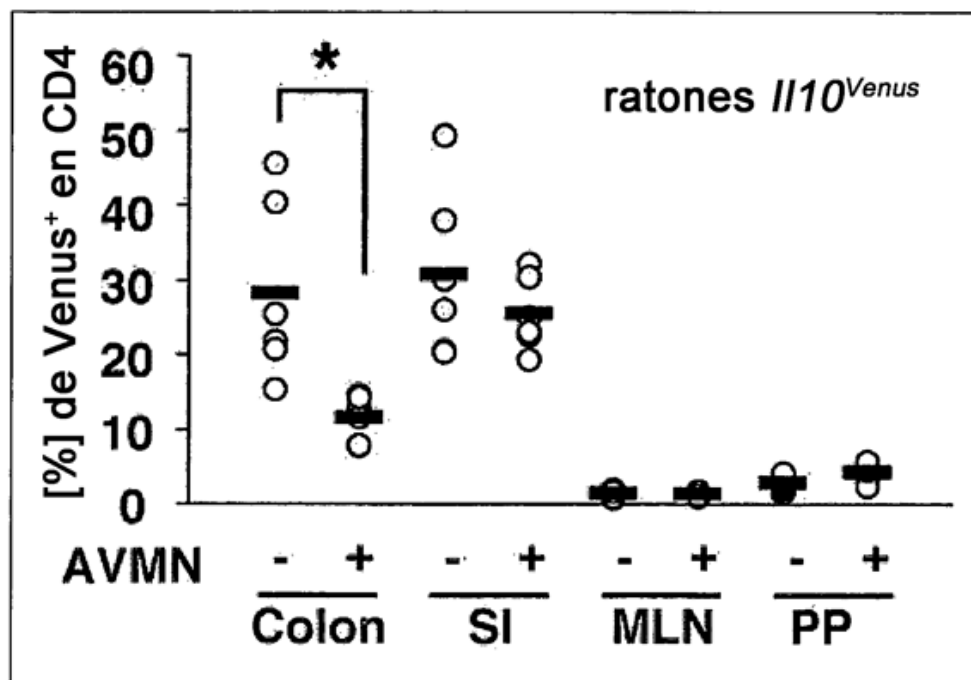
[Fig. 26]



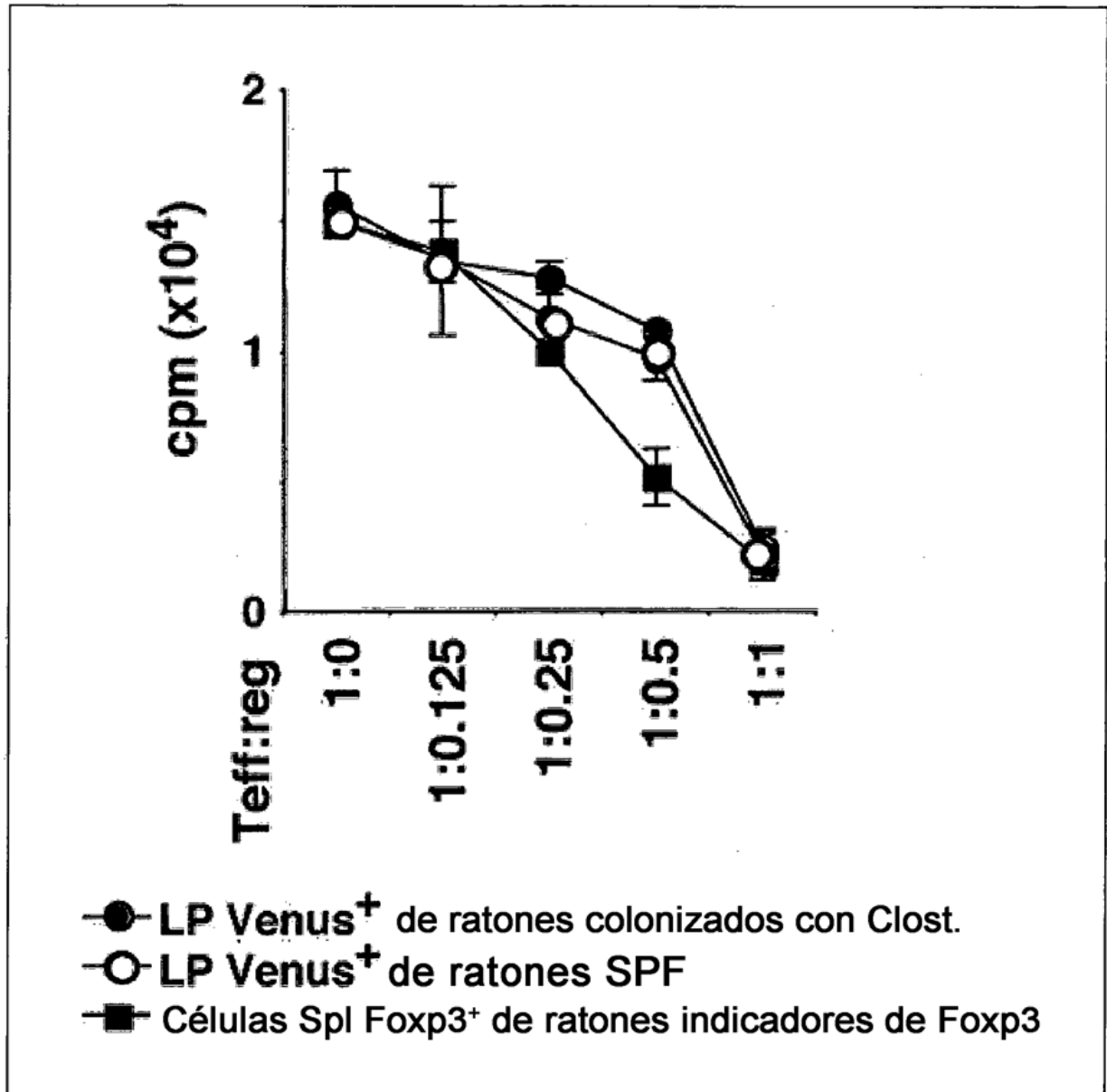
[Fig. 27]



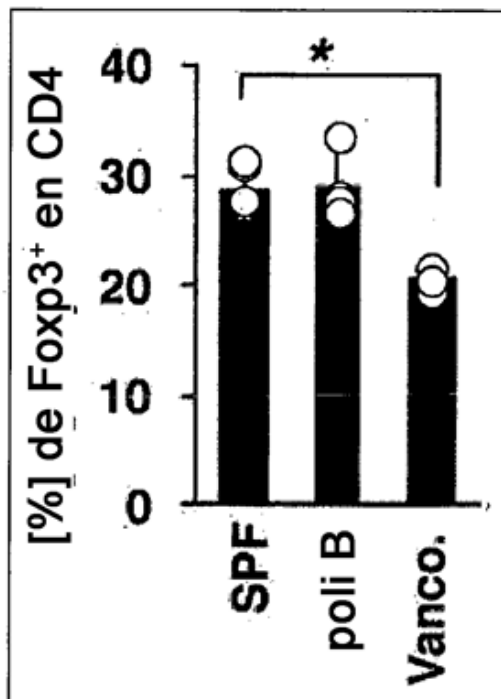
[Fig. 28]



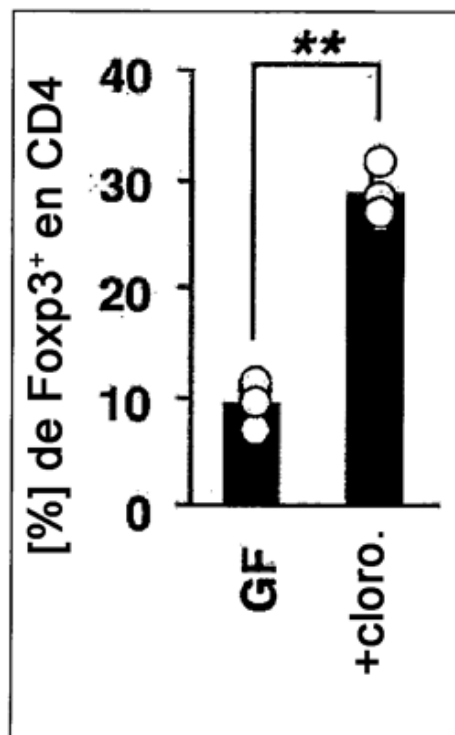
[Fig. 29]



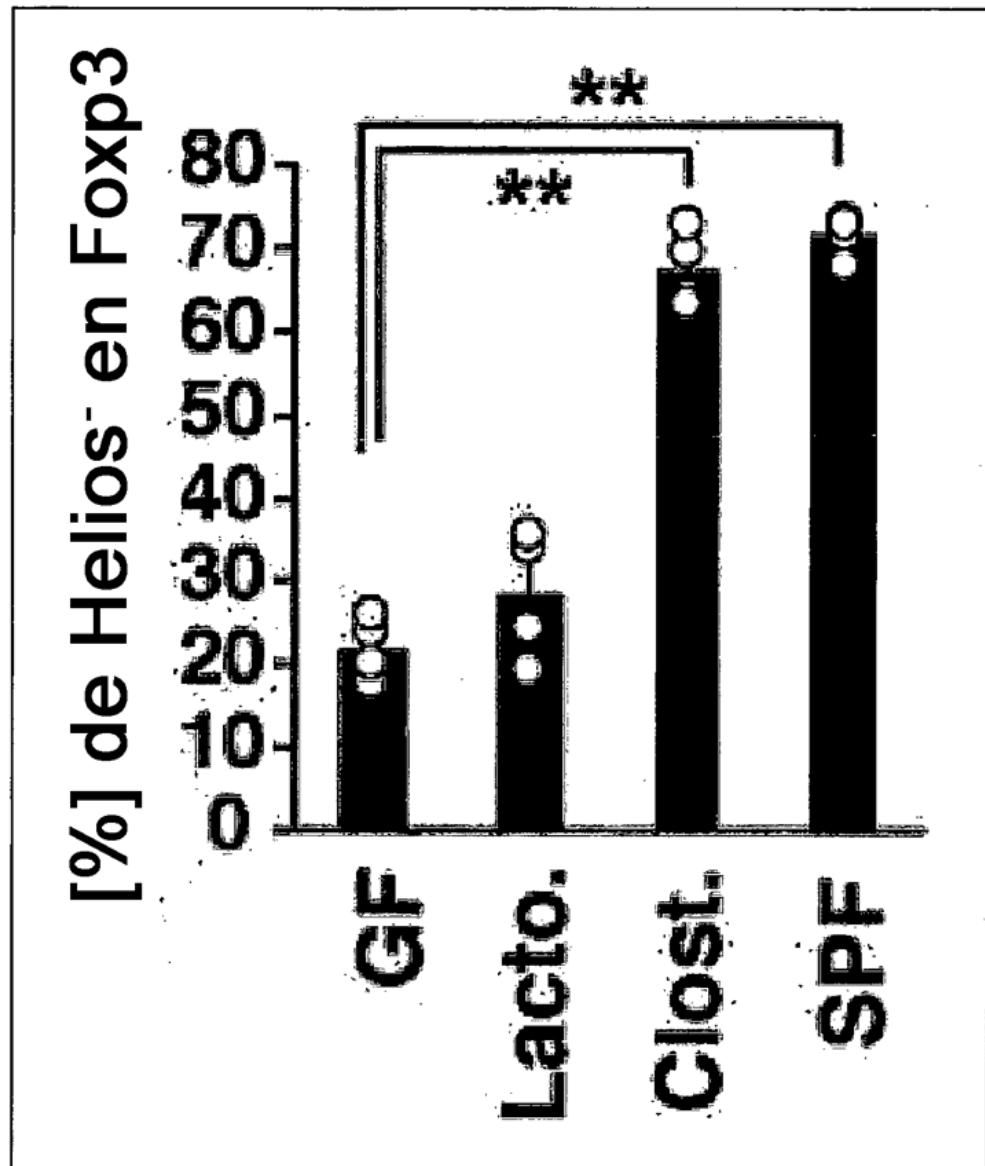
[Fig. 30]



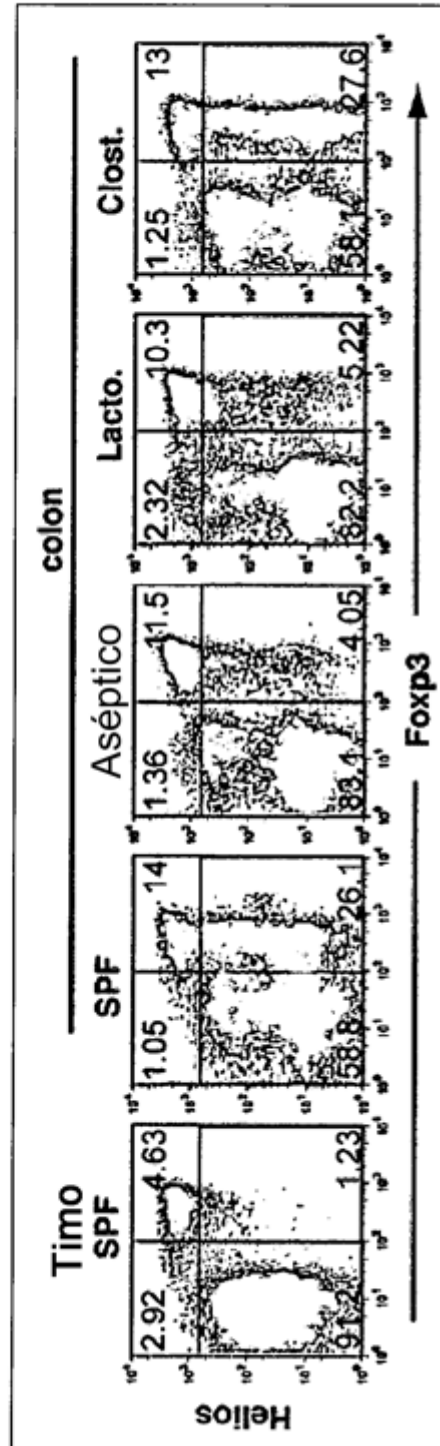
[Fig. 31]



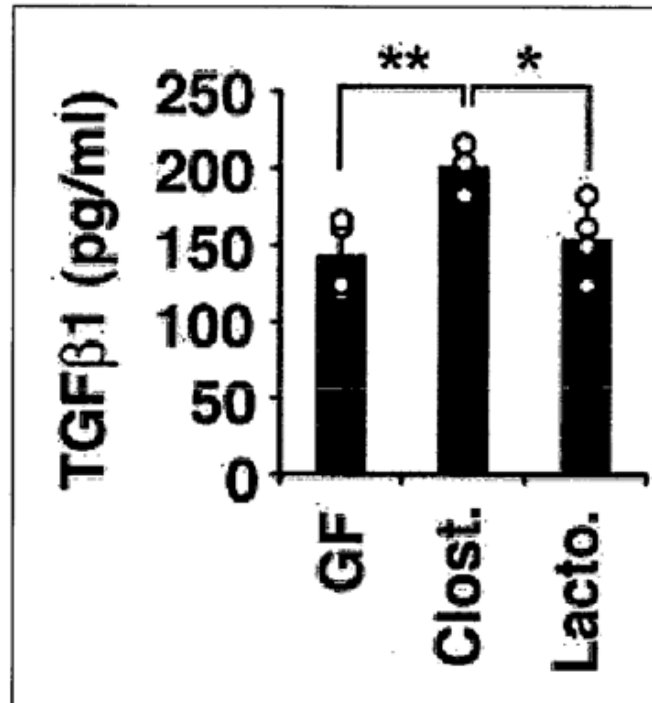
[Fig. 32].



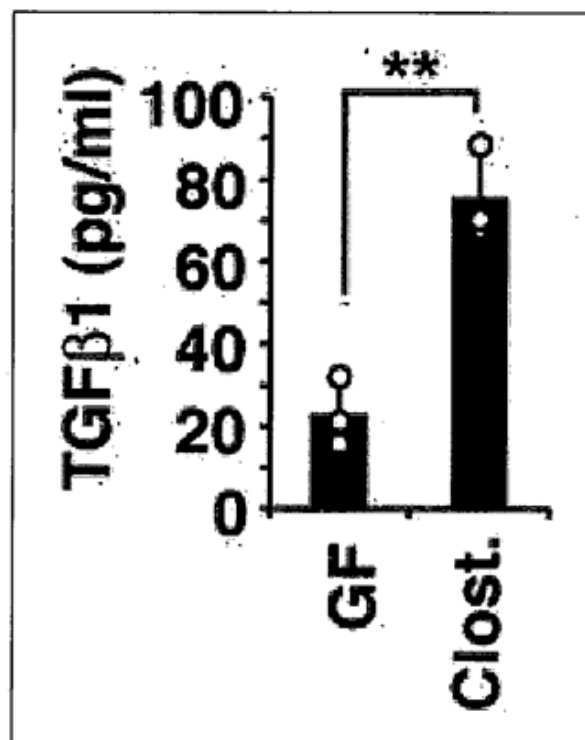
[Fig. 33]



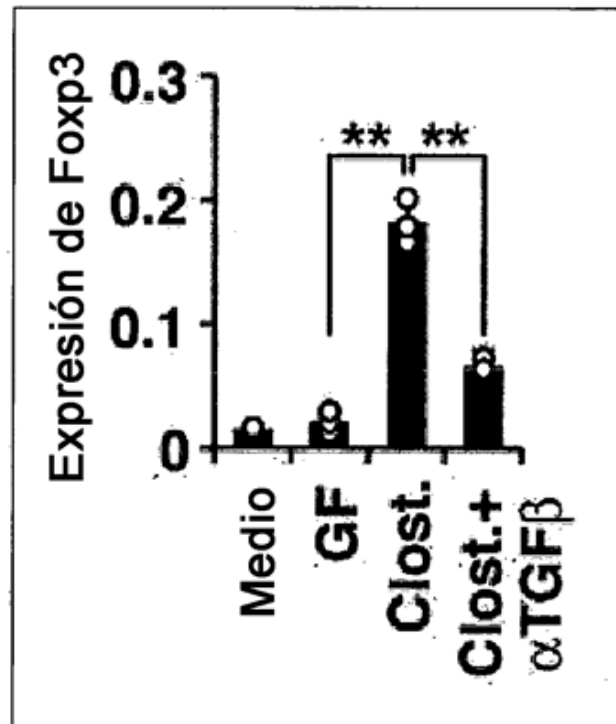
[Fig. 34]



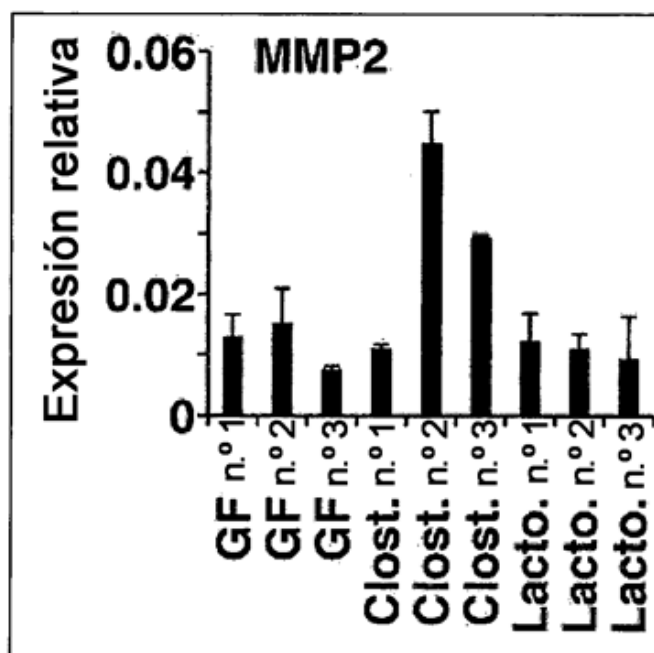
[Fig. 35]



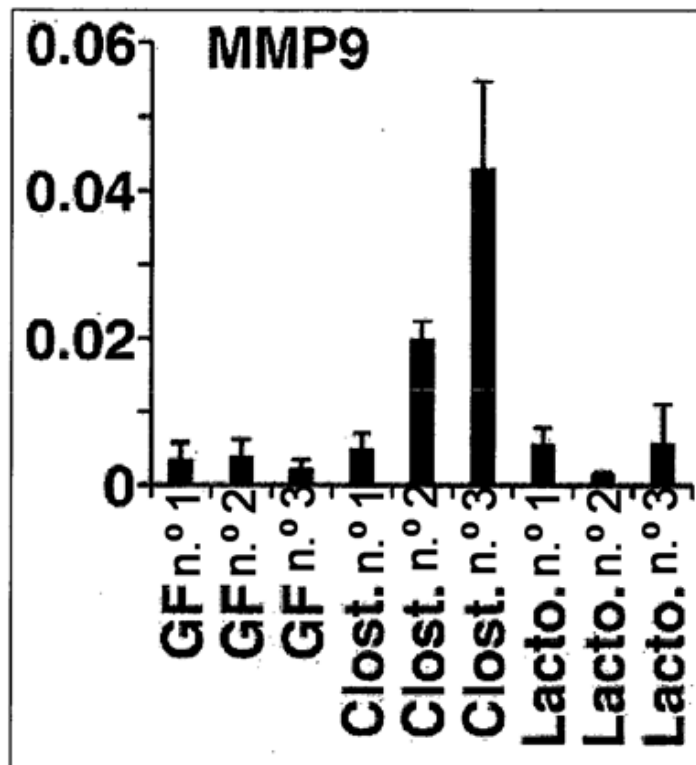
[Fig. 36]



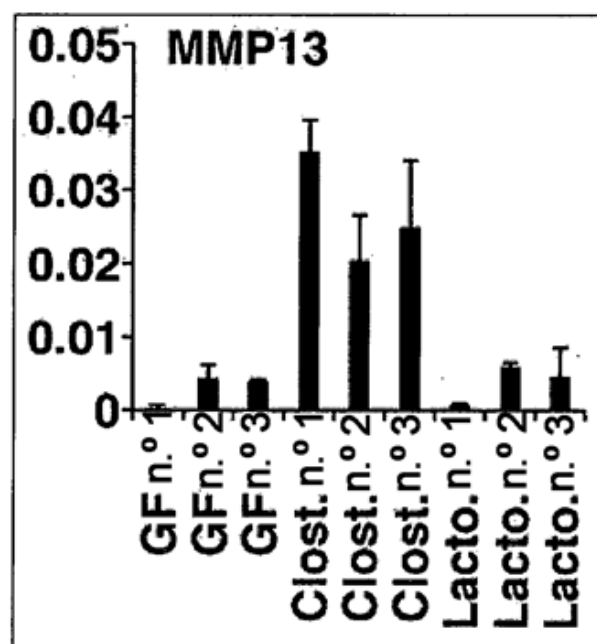
[Fig. 37]



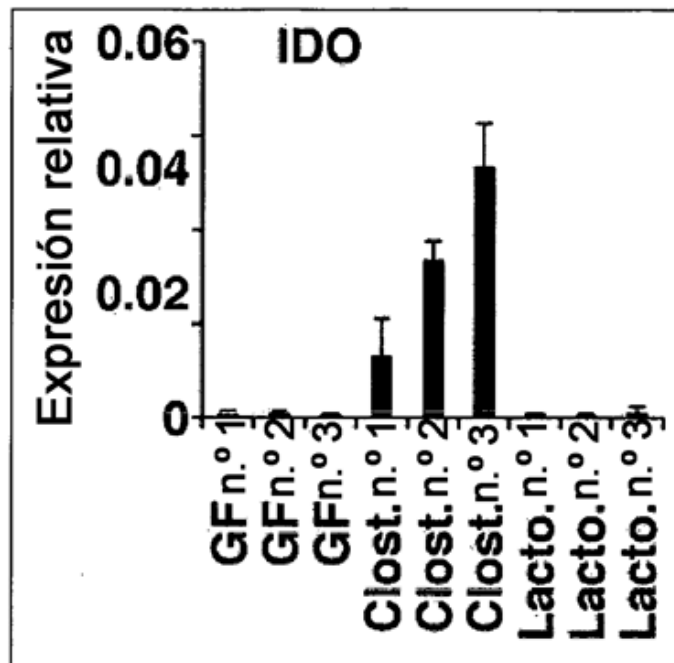
[Fig. 38]



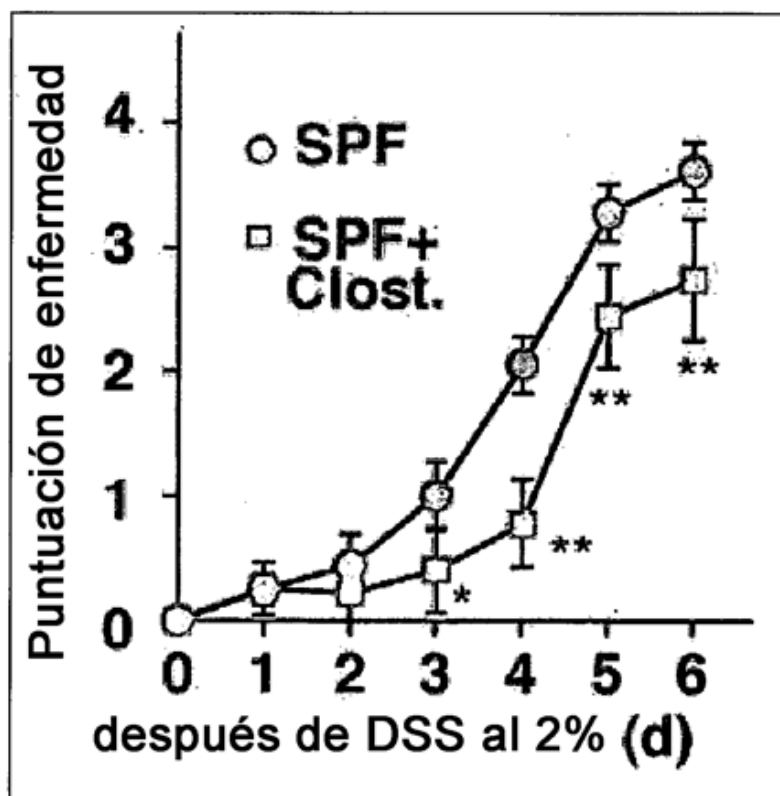
[Fig. 39]



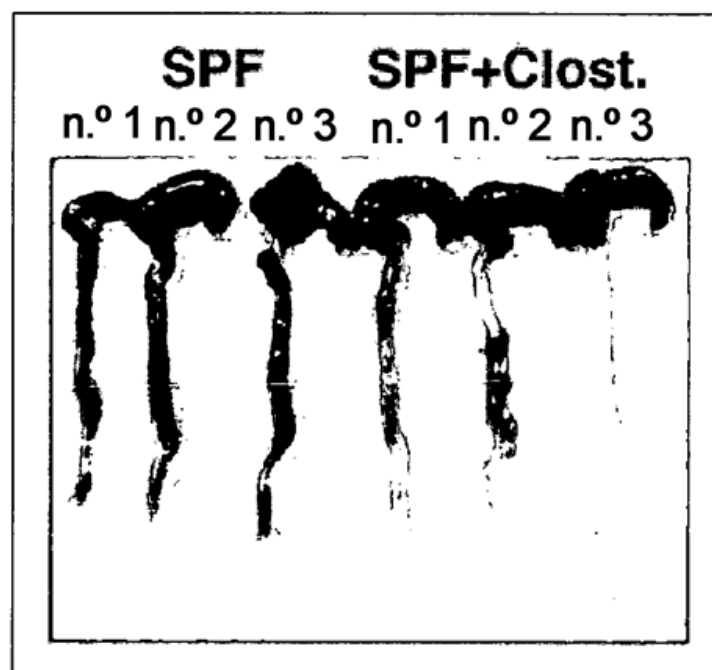
[Fig. 40]



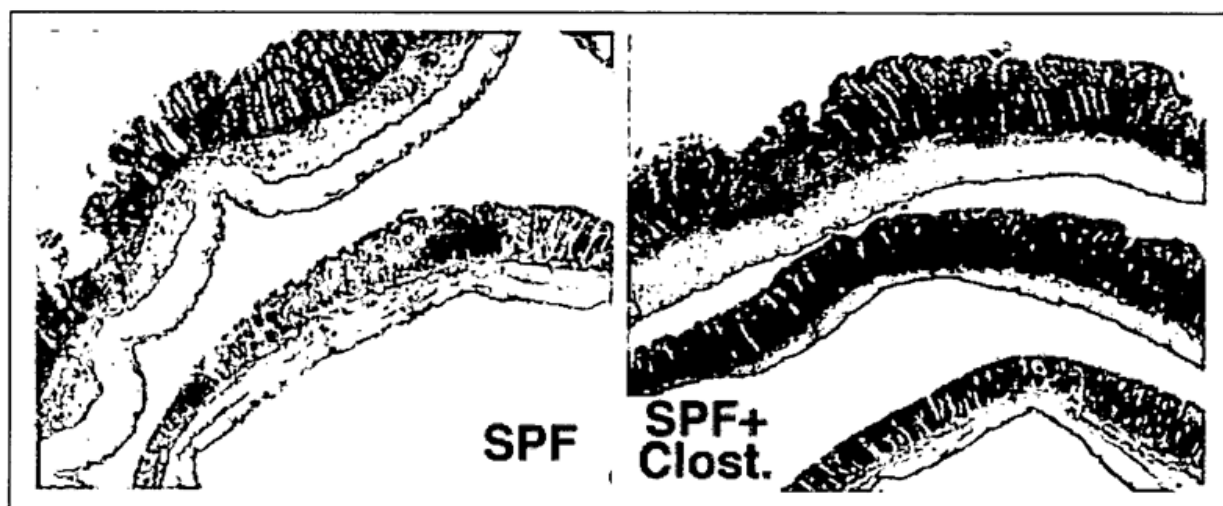
[Fig. 41]



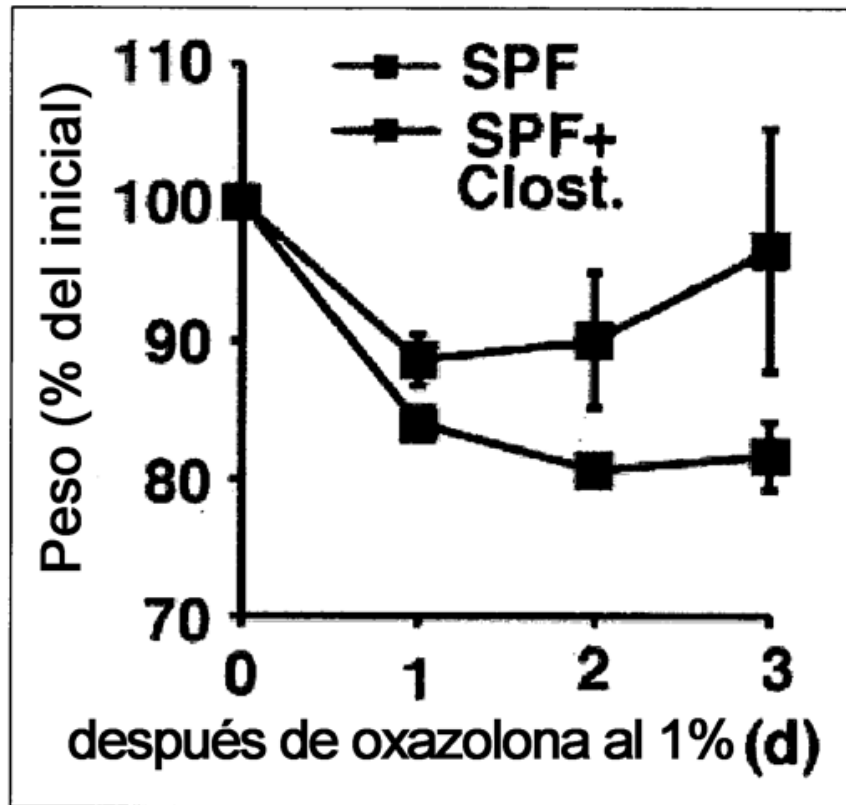
[Fig. 42]



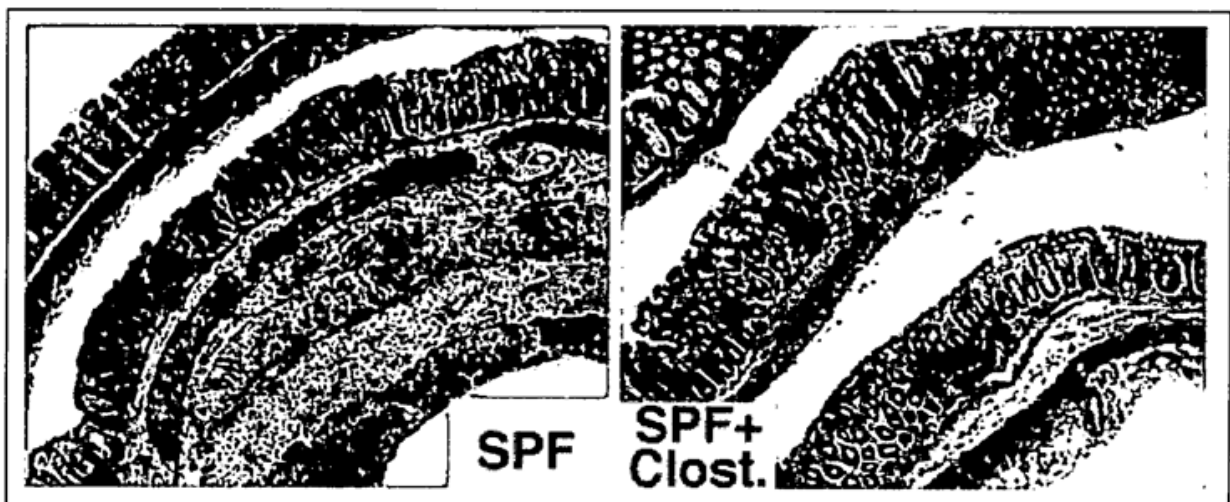
[Fig. 43]



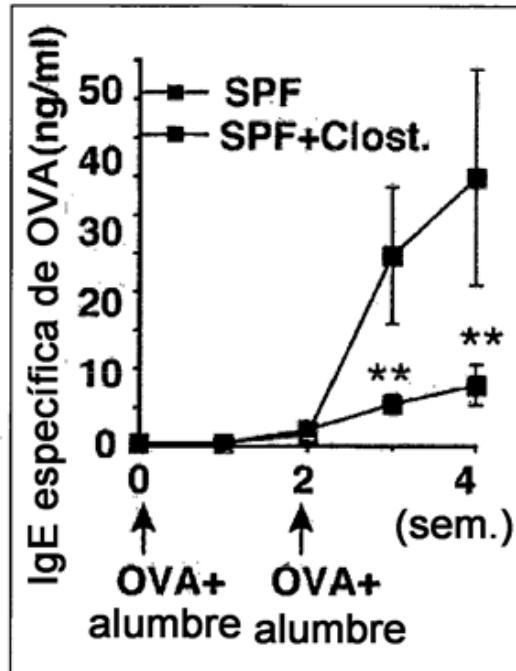
[Fig. 44]



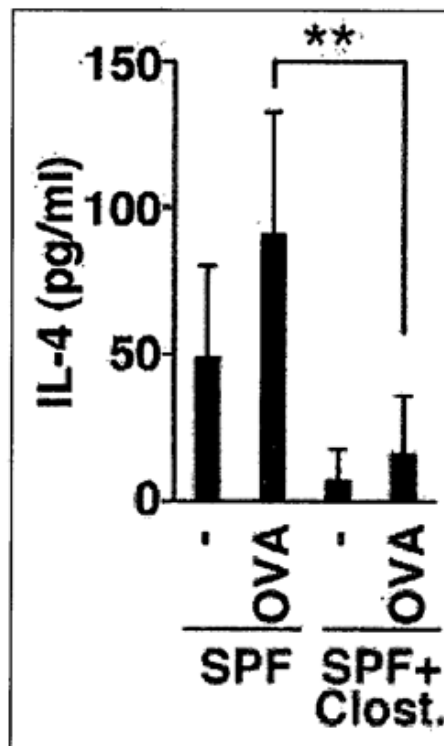
[Fig. 45]



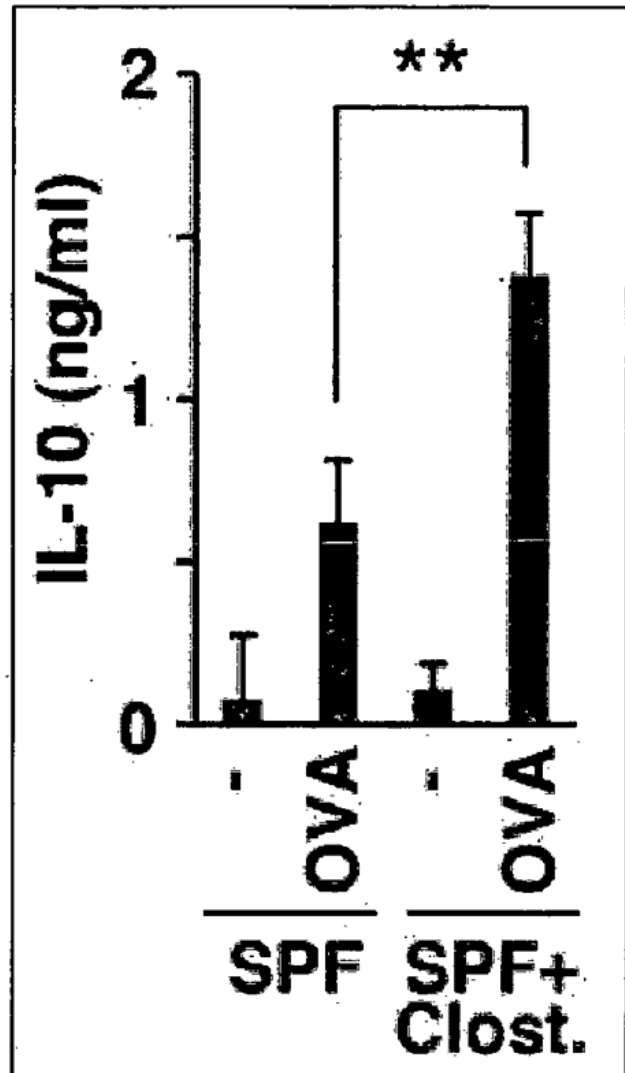
[Fig. 46]



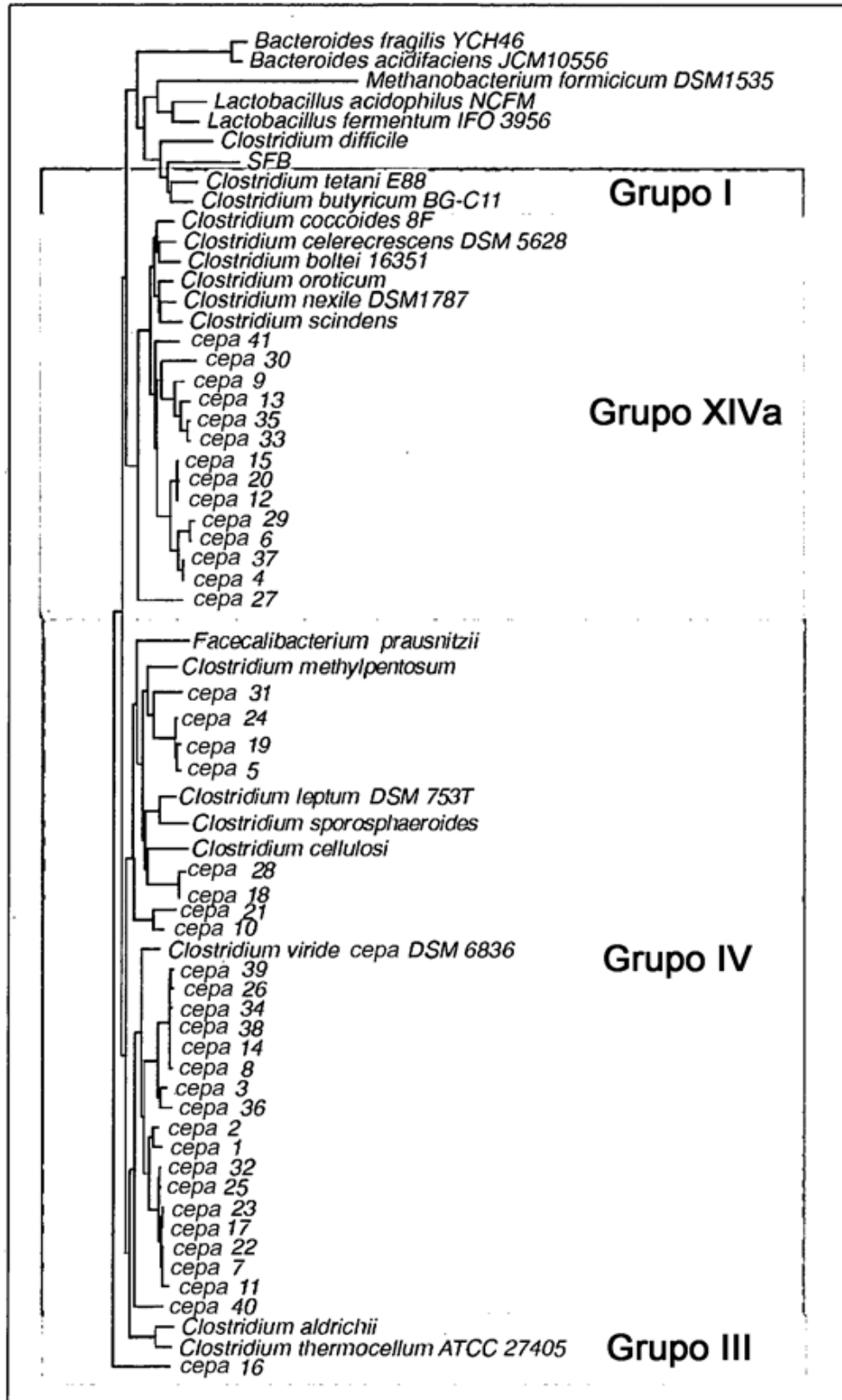
[Fig. 47]



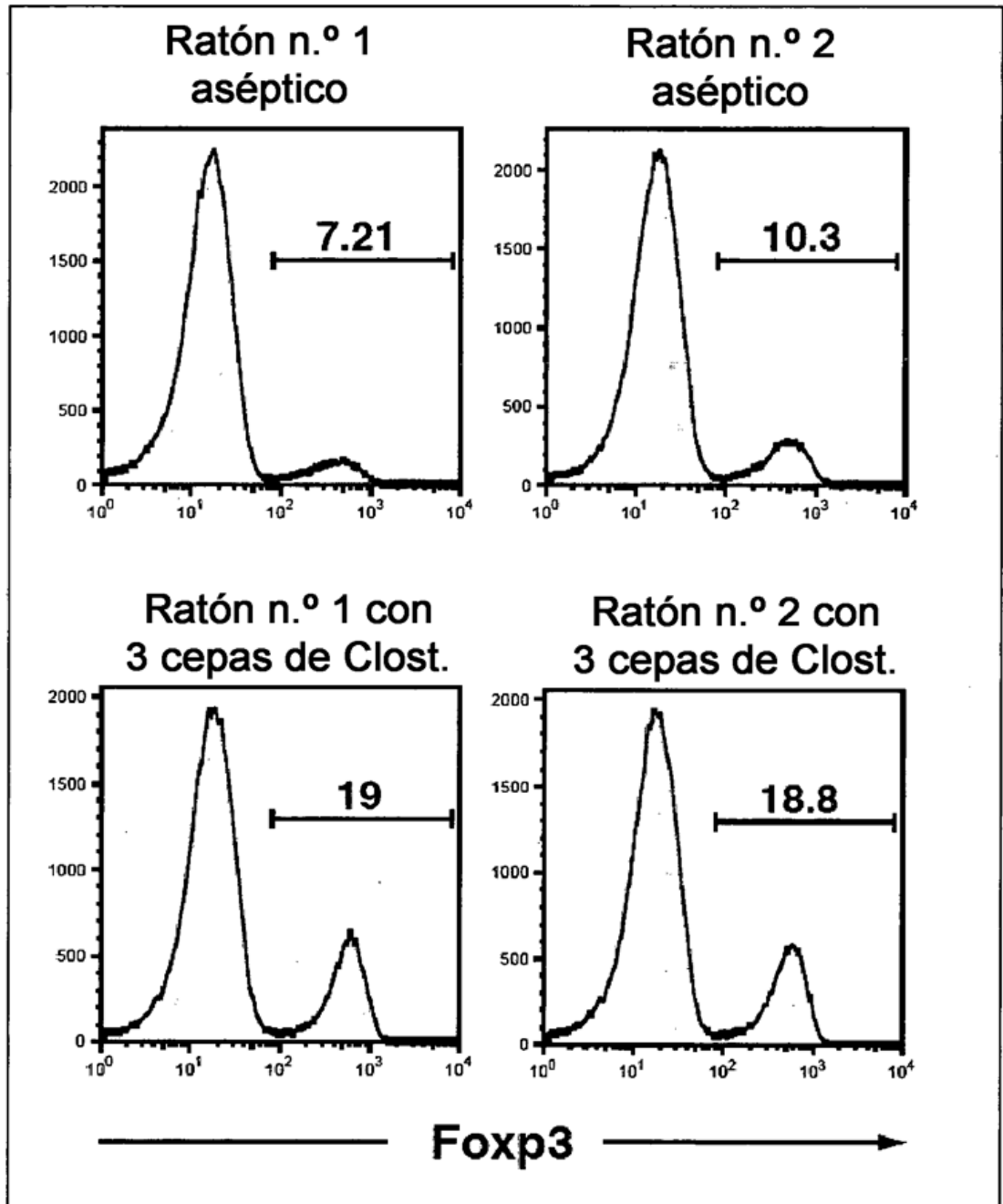
[Fig. 48]



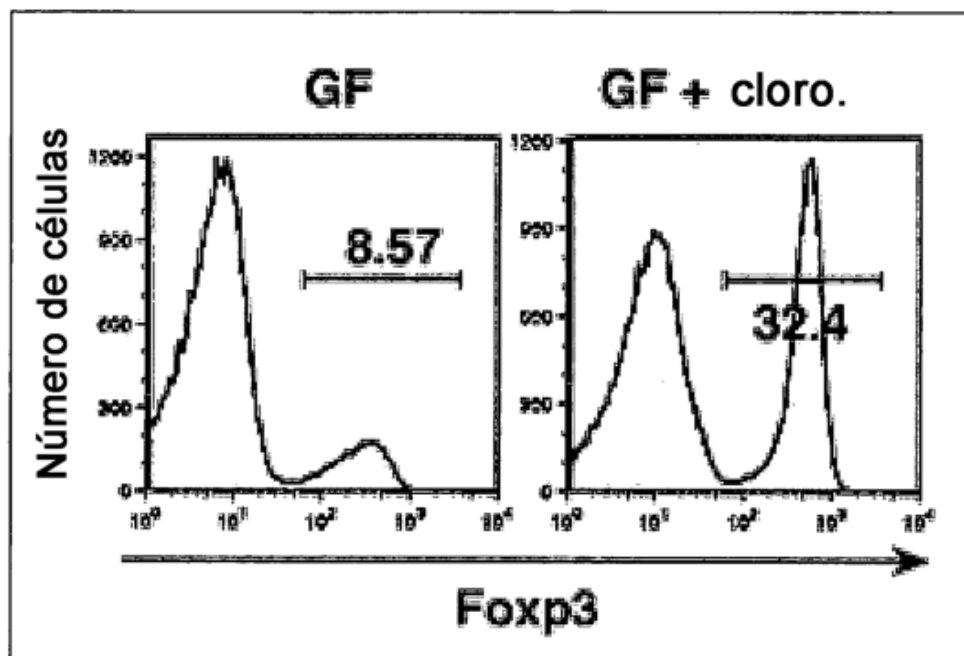
[Fig. 49]



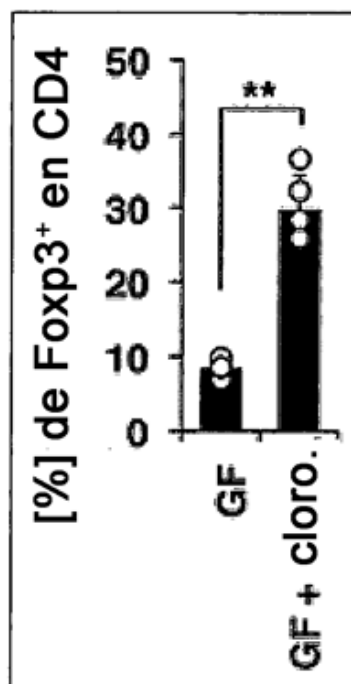
[Fig. 50]



[Fig. 51]



[Fig. 52]



[Fig. 53]

