

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 314**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2007 PCT/US2007/001367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2007 WO07084633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2007 E 07718326 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 1984021**

54 Título: **Bacterias Gram-negativas viables no tóxicas**

30 Prioridad:

19.01.2006 US 760314 P

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

11.11.2016

73 Titular/es:

**RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES,
INC. (100.0%)
6440 N. Swan Rd Suite 200
Tucson, AZ 85718, US**

72 Inventor/es:

**WOODARD, RONALD WESLEY;
MEREDITH, TIMOTHY CHARLES y
AGGARWAL, PARAG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 589 314 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

Bacterias Gram-negativas viables no tóxicas

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad para la Solicitud Provisional Estadounidense 60/760.314, presentada el 19 de enero de 2006. Esta invención fue realizada con el apoyo del gobierno bajo la Subvención N° GM53609 otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con bacterias Gram-negativas viables (v.g., *E. coli*) que carecen substancialmente de lipopolisacárido (LPS, endotoxina) en la membrana externa, así como con composiciones y métodos para inducir respuestas inmunes y para investigar y desarrollar agentes terapéuticos.

15 **Antecedentes de la invención**

El lipopolisacárido (LPS, endotoxina) es el antígeno más importante de las bacterias Gram-negativas. El LPS es un glicofosfolípido consistente en una cadena de carbohidrato de tamaño variable antigénica covalentemente unida al lípido A, la región hidrofóbica conservada estructuralmente definida como 1,4'-bisfosfato de N,O-acil-beta-1,6-D-glucosamina. La toxicidad del LPS se expresa mediante el lípido A a través de la interacción con células B y macrófagos del sistema inmunitario de los mamíferos, un proceso que da lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF, que pueden tener consecuencias fatales para el hospedador. El lípido A también activa los linfocitos T humanos (Th-1) "*in vitro*", así como las células T CD4+ y CD8+ murinas "*in vivo*", una propiedad que permite al sistema inmunitario del hospedador elaborar una respuesta específica y anamnésica de anticuerpos IgG frente a la cadena carbohidratada de tamaño variable del LPS. Sobre estas bases, se ha reconocido recientemente al LPS como un antígeno dependiente de células T "*in vivo*".

Para expresar totalmente su toxicidad, el LPS debe conservar su arquitectura supramolecular, a través de la asociación de varias unidades de monómeros de glicofosfolípido que forman la estructura del lípido A. Esta reorganización conformacional de la molécula es también fundamental para la expresión total de las características inmunogénicas.

La sepsis y el shock séptico son afecciones clínicas bien definidas que están causadas por bacterias y por LPS, que es la endotoxina elaborada por las bacterias responsables de las patologías antes mencionadas.

Los signos clínicos de la sepsis y del shock séptico varían dependiendo de la cantidad de endotoxina presente y del tiempo transcurrido en el proceso de la enfermedad. Los signos clínicos más tempranos de una infección pueden ser fiebre, depresión leve y falta de apetito. Más allá en el proceso de la enfermedad, el paciente exhibirá signos más obvios de shock, incluyendo un aumento del ritmo cardíaco, presión de pulso débil, deshidratación, obscurecimiento de encías, pies y orejas fríos, temperatura por debajo de lo normal, aumento de la frecuencia respiratoria o diarrea. Una vez un paciente ha exhibido signos de shock endotóxico, habría que considerarlo como una situación de urgencia y habría que contactar inmediatamente con un médico.

A pesar del uso juicioso de antibióticos y de otras medidas terapéuticas, la mortalidad por trastornos relacionados con la endotoxina sigue siendo un problema significativo. La resistencia a los antibióticos de las bacterias, la severidad de los procesos morbosos subyacentes y la inadecuada administración de una terapia de soporte dan cuenta en parte del fracaso de los tratamientos convencionales. Lo que se necesita es una mayor comprensión de las bacterias Gram-negativas que causan trastornos relacionados con la endotoxina. Adicionalmente, se necesitan tratamientos mejorados para los trastornos relacionados con la endotoxina.

US2005/0106184 y también Tzeng *et al.* (2002; J. Bacteriol. 184: 2379-2388) describen cepas mutantes de *Neisseria meningitidis* que producen moléculas de lípido A libres de KDO. Tan & Darby (2005; J. Bacteriol. 187: 6599-6600) describen mutantes viables de *Yersinia pestis* que producen moléculas de lípido A libres de KDO. Fujishima *et al.* (2002; Microbiol. 148: 103-112) describen mutantes sensibles a la temperatura de *Escherichia coli* con mutaciones con cambio de sentido en *kdsA* y afectados en la producción de KDO.

50 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona en un aspecto una cepa mutante bacteriana Gram-negativa no condicionada viable que puede crecer y dividirse con una ruta biosintética KDO₂-LípidoIV_A mutada que da lugar a la alteración de dicha ruta y a deficiencia de lipopolisacárido en la membrana externa, donde dicha cepa mutante bacteriana carece de KDO y exhibe LípidoIV_A en la membrana externa.

La alteración en la ruta biosintética KDO₂-LípidoIV_A puede estar causada por al menos una mutación en un gen seleccionado entre el grupo consistente en *gutQ*, *kdsD*, *kdsB* y *waaA*.

La cepa bacteriana de la invención puede incluir una mutación que elimine la asociación entre KDO₂ y LípidolV_A.

La alteración en la ruta biosintética KDO₂-LípidolV_A puede estar causada por al menos una mutación en un gen seleccionado entre el grupo consistente en *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB* y *waaA*, y dicha cepa puede además incluir una mutación en un gen seleccionado entre *msbA* o *yjHD*. La cepa bacteriana de la invención puede también incluir una mutación en un gen *lpxM*.

La cepa bacteriana de la invención puede también incluir una mutación en *msbA* y/o *yjHD*. La cepa bacteriana de la invención que incluye una mutación en *msbA* o *yjHD* puede además incluir una mutación en un gen *lpxM*.

La cepa bacteriana de la invención puede ser seleccionada entre el grupo consistente en *Escherichia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Legionella spp.*, *Corynebacteria spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.* y *Vibrio spp.* Por ejemplo, la cepa bacteriana puede ser seleccionada entre *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.* y *Pseudomonas spp.* La cepa bacteriana puede ser *E. coli*.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición que contiene la membrana externa de la cepa bacteriana de la invención como aquí se define.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que contiene la membrana externa de la cepa bacteriana de la invención como aquí se define.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para uso en la inmunización de un sujeto que se encuentra en riesgo de adquirir una afección, la cual contiene la membrana externa de la cepa bacteriana de la invención como aquí se define, donde dicha afección es

- i) shock séptico, donde dicha bacteria Gram-negativa es *E. coli*, o
- ii) fiebres entéricas, donde dicha bacteria Gram-negativa es una *Salmonella spp.*

La invención proporciona en otro aspecto un método de producción de LípidolV_A, consistente en extraer LípidolV_A de la cepa bacteriana de la invención como aquí se define.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de cribado para un agente antipirogénico, consistente en el uso de una cepa bacteriana de la invención como aquí se define.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan una amplia gama de métodos y composiciones que emplean bacterias Gram-negativas (*v.g.*, *E. coli*) carentes de un LPS. Se describen realizaciones ejemplares más adelante en el Resumen de la invención, la Descripción detallada de la invención y la sección de Ejemplos que se darán después. La presente invención no se limita a estas realizaciones ejemplares. Las bacterias Gram-negativas carentes de LPS pueden ser generadas por cualquier mecanismo. Se describe aquí una variedad diversa de diferentes mecanismos para generar dichas bacterias. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se mutan genes (*v.g.*, para reducir o eliminar la expresión de proteína funcional) que están implicados en la síntesis de KDO. En algunas realizaciones, se mutan genes que están implicados en la asociación de KDO con LípidolV_A. En algunas realizaciones, se mutan genes que están implicados en la síntesis de LípidolV_A. En algunas realizaciones, se mutan otros genes implicados en la producción o presentación del LPS. La presente invención no se limita a la mutación de genes. En algunos ejemplos, se altera la expresión usando interferencia de ARN u otras técnicas. En algunos ejemplos, se altera la función de la proteína disponiendo de inhibidores (*v.g.*, ligandos competitivos o no competitivos sintéticos o naturales, anticuerpos, etc.). En algunos ejemplos, se provee además a las bacterias modificadas de nutrientes, otras modificaciones u otros componentes útiles para mantener la salud, el crecimiento, etc. en vista de las alteraciones realizadas para afectar al status LPS. Las realizaciones de la presente invención no se limitan a estos mecanismos, a menos que se especifique algo diferente. La presente invención demuestra que las bacterias carentes de LPS son viables, pueden ser producidas a través de una variedad de rutas y encuentran utilización en una variedad de escenarios.

La capa de LPS es esencial tanto para la forma como para la función de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Además de ser un mediador principal de la patogenia Gram-negativa, se ha reconocido desde hace mucho tiempo a una estructura de LPS (endotoxina) consistente en al menos KDO₂-lípidolV_A [2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosonato (KDO)] como la estructura mínima necesaria en *Escherichia coli* para un crecimiento sostenido.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una cepa bacteriana Gram-negativa viable carente de KDO a pesar de elaborar exclusivamente el lípidolV_A precursor del LPS endotóxicamente inactivo, un antagonista conocido de la sepsis inducida por LPS en humanos. La presente divulgación proporciona bacterias Gram-negativas viables carentes de expresión de la D-arabinosa 5-fosfato isomerasa (API). En algunas realizaciones, las bacterias Gram-negativas viables tienen mutaciones que hacen que la cepa esté substancialmente libre de KDO. En algunas realizaciones, las mutaciones incluyen una o más mutaciones en uno o más genes implicados en la síntesis o

modificación de KDO. En algunas realizaciones, las bacterias Gram-negativas viables tienen mutaciones, donde las mutaciones evitan la asociación entre KDO₂ y el Lípido IV_A en la ruta biosintética del LPS, de tal forma que el Lípido IV_A solo es transportado a la membrana externa. En algunas realizaciones, una o más mutaciones en los genes de síntesis de KDO, o una o más mutaciones en la ruta biosintética del LPS, incluyen mutaciones en, aunque sin limitación, los genes *gutQ*, *kdsD* (*yrbH*), *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* e *yhjD*, o cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación. En algunas realizaciones, la cepa carece, o carece substancialmente, de síntesis de proteínas KDO. En algunas realizaciones, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas viables expresa lípido IV_A. En algunas realizaciones, la bacteria Gram-negativa es *E. coli*.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método de producción de lípido IV_A, consistente en extraer lípido IV_A de bacterias Gram-negativas viables.

La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno relacionado con endotoxinas, consistente en administrar a un sujeto que tiene un trastorno relacionado con endotoxinas una composición que contiene lípido IV_A aislado de bacterias Gram-negativas.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una vacuna de membrana externa u otra composición para inducir una respuesta inmune frente a una bacteria Gram-negativa, incluyendo las composiciones una membrana externa de bacterias Gram-negativas viables de la invención. Dichas composiciones pueden ser utilizadas para inducir respuestas inmunes en investigación, cribado de fármacos y marcos terapéuticos.

La presente divulgación proporciona un adyuvante que incluye lípido IV_A aislado de bacterias Gram-negativas.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables que carecen de expresión de uno o más genes *gutQ*, *kdsD* (*yrbH*), *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* y/o *yhjD*, o de expresión de cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación asociado a la presentación de LPS en la membrana externa. Las bacterias de la invención, o sus porciones (*v.g.*, fracciones de membrana) hallan una utilización en aplicaciones de investigación y terapéuticas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta la caracterización de muestras de LPS extraídas de KPM22. Figura 1A: Composición de azúcar del núcleo interno-lípido A de LPS de extracto fenólico posdiálisis. GlcN-D-glucosamina; KDO-2-ceto-3-desoxi-D-*mano*-octulosonato; L-*glicero*-D-*mano*-heptosa - heptosa. Figura 1B: Análisis de SDS-PAGE de LPS de lisados de células enteras tratados con proteinasa K. El panel superior estaba teñido con plata, mientras que los paneles central e inferior son inmunotransferencias reveladas usando el mAb A6 dirigido contra el esqueleto de disacárido GlcN β-1,6-unido 1,4'-bisfosforilado no glicosilado del lípido A. La membrana del panel central fue tratada con ácido acético al 1% para liberar el lípido A antes de las reacciones inmunológicas. Las calles 1-5 son cepas de referencia de serovares de *Salmonella enterica* de diferentes quimiotipos de LPS [1. 3749 (Ra); 2. 3750 (Rb2); 3. 3748 (Rb3); 4. 3769 (Rd1), 5. 1102 (Re)], 6. BW30270 de tipo salvaje, 7. KPM22, 8. KPM25, 9. KPM22 con A5P en el medio de crecimiento, 10. KPM31, 11. KPM34, 12. KPM31 con A5P en el medio de crecimiento, 13. KPM40, 14. KPM42, 15. KPM40 con A5P en el medio de crecimiento, 16. 200 ng de lípido IV_A químicamente sintetizado (compuesto 406).

La Figura 2 presenta la caracterización del precursor del LPS en KPM22. Espectros de masas con ciclotrón de iones con transformación de Fourier con ionización por electronebulización con deconvolución de carga (ESI FT-ICR) en modo de iones negativos de muestras de LPS purificadas. Los números de masa dados se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras. Figura 2A: BW30270 (*insertado* distribución isotópica del glicoforoma I; 3915,71 u). Figura 2B: KPM22 (*insertado* estructura del lípido IV_A; 1404,86 u). Figura 2C: KPM25 (*insertado* LPS de tipo salvaje con estructura química de KDO₂-lípido A (endotoxina Re) representada y punto de unión de la heptosa indicado mediante flecha. Los marcajes de picos rojo, azul y verde corresponden a las familias de picos de los glicoformos I, IV y II, respectivamente (véase, *v.g.*, S. Müller-Loennies, B. Lindner, H. Brade, J. Biol. Chem. 278, 34090 (2003)). Se indican las asignaciones de picos de estructura individuales en la Tabla 9. PE-fosfatidiletanolamina; P- fosfato; P-*EtN*-fosfoetanolamina; LA_{tri}, LA_{tetra}, LA_{penta}, LA_{hexa} - estado de acilación del lípido A.

La Figura 3 presenta la separación con gradiente de sacarosa de las membranas interna y externa del BW30270 de tipo salvaje (a) y de KPM22 (b). Se estudiaron las fracciones en cuanto al contenido proteico total (X), a la fosfolipasa A de la membrana externa (OMPLA) (O) y a la NADH oxidasa de la membrana interna (▲). Se desarrollaron geles de SDS-PAGE (12%) de muestras proteicas en condiciones reductoras. Se indican los marcadores proteicos de masa molecular (kDa) a la izquierda de cada gel. Las flechas indican la posición de las proteínas PME (~35 kDa) [Q2].

La Figura 4 presenta la caracterización de KPM22. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de BW30270 de tipo salvaje (paneles A y B) y de KPM22 (paneles C y D). Las flechas indican las vesículas de la membrana externa (VME) en la superficie de la ME de KPM22 (panel C). MI- Membrana interna, ME-Membrana externa, PG-peptidoglicano. Barras de escala = 50 nm.

La Figura 5 presenta la caracterización de KPM22. Figura 5A: Producción de ácido colánico estimada como μg

de metilpentosa (L-fucosa) por ml por DO de cultivo de células suspendidas. Figura 5B: Inmunotransferencia del antígeno común enterobacteriano (ECA) usando el anticuerpo mAb 898. Calle 1 (BW30270), Calle 2 (KPM22), Calle 3 (KPM25).

La Figura 6 presenta los espectros de masas ESI FT-ICR de extractos de fase fenólica. Espectros de masas ESI FT-ICR de iones negativos con deconvolución de carga de la fase fenólica de BW30270 (A), KPM22 (B) y KPM25 (C). Se precipitó LPS a partir de extractos fenólicos brutos por adición gota a gota de agua. Tras aclaramiento por centrifugación, se dializó el sobrenadante fenólico y se trató como se ha descrito anteriormente. Hay que hacer notar que el lípido IVa no precipitó de la fase fenólica por la acción del agua durante este procedimiento (B). ECA_{cíc} - antígeno común enterobacteriano (ECA) cíclico.

La Figura 7 presenta las capacidades de inducción de citoquina hTNF α de las preparaciones de LPS. Se inocularon células mononucleares humanas (CMN) con diversas concentraciones de preparaciones de LPS aisladas como se ha descrito anteriormente. Se cuantificó la liberación de hTNF α usando un ensayo basado en ELISA. Se recogieron los puntos de datos por duplicado. (Barras sombreadas- BW30270, Barras vacías- KPM22, Barras cuadrículadas- KPM25).

La Figura 8 muestra el efecto de gutQ sobre la utilización del D-glucitol y la biosíntesis de LPS. (A) Curvas de crecimiento diauxico para BW30270 (\square), BW30270(Δ gutQ) (O) y BW30270(pT7-gutQ) (Δ). Se diluyeron cultivos de una noche crecidos en medio mínimo M9 suplementado con 1 μ g/ml de tiamina y 10 mM de D-glucosa en medio fresco con 2 mM de D-glucosa y 2 mM de D-glucitol como fuentes dobles de carbono. Se monitorizó el crecimiento celular midiendo la turbidez a 600 nm. (B) Geles de LPS de SDS-PAGE de tricina teñidos con plata de lisados de células enteras tratadas con proteinasa K de BW30270 (WT), BW30270(Δ gutQ) y BW30270(Δ kdsD). Se recogieron iguales cantidades de células bacterianas que crecían en medio mínimo (0,2% de glicerol) con (+) o sin (-) D-glucitol (10 mM) en la fase log temprana y se procesaron como se describe en los Procedimientos experimentales.

La Figura 9 muestra el crecimiento y la síntesis de LPS en la cepa Δ API BW30270(Δ gutQ Δ kdsD). (A) Curva de crecimiento de *E. coli* BW30270(Δ gutQ Δ yrbH) en medio mínimo MOPS con tiamina (1 μ g/ml) y glicerol (0,1%) como única fuente de carbono. Se suplementaron los fosfatos de azúcar en el medio con 10 μ M de G6P (Δ), 15 μ M de A5P (\square) o ambos (O). (B) Titulación de LPS con A5P. Se diluyó un cultivo en fase estacionaria crecido en medio mínimo MOPS (0,2% de glicerol, 5 μ M de A5P, 10 μ M de G6P) que había dejado de dividirse en medio fresco que contenía G6P (10 μ M) y concentraciones variables de A5P (0,1, 1, 10, 50 y 100 μ M) y se agitó durante 6 horas. Se prepararon muestras de LPS a partir del mismo número de células en base a la DO y se analizaron por SDS-PAGE con tricina y tinción de plata. (C) SDS-PAGE con tricina del LPS, y (D) análisis cualitativo por RT-PCR de *gutD* de muestras preparadas a partir de BW30270 de tipo salvaje (calles 1 y 2) y de BW30270(Δ gutQ Δ kdsD) (calles 3 y 4). Se preindujeron BW30270(Δ gutQ Δ kdsD) con 10 μ M de G6P y 5 μ M de A5P, se centrifugaron, se resuspendieron en medio mínimo MOPS fresco (0,2% de glicerol) con sólo A5P y 10 mM de D-glucitol como se ha indicado y se agitaron durante 4 horas más antes de la recogida para los análisis. S-marcadores de peso molecular de ADN de 0,1-1 kb; Con- ADN genómico como plantilla.

La Figura 10 muestra el operón *gut* de *E. coli* K-12 MG1655. Se determinaron los sitios de inicio de la transcripción usando el mapeo de transcriptasa inversa de Yamada y Saier (véase, v.g., Yamada, M. & Saier, M. H., Jr. (1988) J Mol Biol 203, 569-83), y se indican mediante flechas.

La Figura 11 muestra la biosíntesis e incorporación de Kdo en LPS. Las enzimas implicadas son (1) D-arabinosa 5-fosfato isomerasa (KdsD/GutQ), (2) Kdo8P sintasa (KdsA), (3) Kdo8P fosfatasa (KdsC) y (4) CMPKdo sintetasa (KdsB). En *E. coli*, se transfieren entonces secuencialmente dos moléculas de Kdo activado al lípido IV_A por (5) la Kdo transferasa (WaaA) antes de la adición por etapas de las cadenas de acilo secundarias (6) laurato (LpxL) y (7) miristato (LpxM).

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación una serie de términos.

Tal como se usan aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal, tal como un mamífero, como un perro, un gato, aves, ganado y preferiblemente un humano.

Tal como se usan aquí, los términos "trastorno relacionado con LPS", "afección asociada a endotoxina", "trastorno asociado a endotoxina", "trastorno relacionado con endotoxina", "sepsis", "trastorno relacionado con sepsis" o términos similares describen cualquier afección asociada a LPS, v.g., una afección asociada a bacteriemia o introducción de lipopolisacárido en el torrente sanguíneo o sobre una superficie mucosa extragastrointestinal (v.g., el pulmón). Dichos trastornos incluyen, aunque sin limitación, shock relacionado con endotoxina, coagulación intravascular diseminada relacionada con endotoxina, anemia relacionada con endotoxina, trombocitopenia relacionada con endotoxina, síndrome de distrés respiratorio del adulto relacionado con endotoxina, insuficiencia renal relacionada con endotoxina, enfermedad hepática o hepatitis relacionada con endotoxina, síndrome de respuesta inmune sistémica (SRIS) como resultado de infección por Gram-negativos, sepsis neonatal por Gram-negativos, meningitis por Gram-negativos, neumonía por Gram-negativos, neutropenia y/o leucopenia como resultado de infección por Gram-negativos, shock hemodinámico y piresis relacionada con endotoxina.

El término "bacteria Gram-negativa viable no tóxica" se refiere a una cepa bacteriana Gram-negativa viable que tiene una membrana externa substancialmente libre de LPS.

Los términos "células" y "células huésped" y "células huésped recombinantes", que son usados aquí indistintamente, se refieren a células que son capaces de ser, o han sido, transformadas con un vector, típicamente un vector de expresión. Las células huésped aquí utilizadas son preferiblemente bacterias Gram-negativas. Se entiende que dichos términos se refieren no sólo a la célula objeto en particular, sino a la progenie o a la progenie potencial de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye en el alcance del término tal como aquí se utiliza.

El término "medio de cultivo" está reconocido en la técnica y se refiere, en general, a cualquier sustancia o preparación utilizada para el cultivo de células vivas.

El término "derivado de", tal como se usa, por ejemplo, en el contexto de la derivación de lípido IVA de una cepa de bacterias Gram-negativas, se refiere a lípido IVA que puede ser obtenido de las bacterias o a la proteína, y pretende incluir fragmentos o porciones de proteínas.

El término "defectuoso", tal como se usa aquí con respecto a un gen o a la expresión génica, significa que el gen no es un gen de tipo salvaje y que el organismo no tiene un genotipo de tipo salvaje y/o un fenotipo de tipo salvaje. El gen, genotipo o fenotipo defectuoso puede ser la consecuencia de una mutación en ese gen, o en un gen que regula la expresión de ese gen (v.g., transcripcional o postranscripcional), de tal forma que su expresión normal resulta alterada o extinguida. "Expresión génica alterada" pretende incluir tanto la inhibición completa como la disminución de la expresión génica (v.g., como en una mutación con fugas), por debajo de la expresión génica de tipo salvaje.

El término "bacterias Gram-negativas" está reconocido en la técnica y se refiere, en general, a bacterias que no retienen la tinción Gram (v.g., la deposición de un complejo coloreado entre cristal violeta y yodo). En una tinción Gram ejemplar, primeramente se fijan las células en un portaobjetos por calor y se tiñen con un colorante básico (v.g., cristal violeta), que es captado por todas las bacterias (es decir, tanto Gram-negativas como Gram-positivas). Se tratan entonces los portaobjetos con una mezcla de yodo-KI para fijar la tinción, se lavan con acetona o alcohol y finalmente se contratiñen con un colorante más pálido de diferente color (v.g., safranina). Los organismos Gram-positivos conservan la tinción violeta inicial, mientras que los organismos Gram-negativos se decoloran por el solvente orgánico y por ello muestran la contratinción. Como bacterias Gram-negativas y líneas celulares ejemplares, se incluyen, aunque sin limitación, *Escherichia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Legionella spp.*, *Corynebacteria spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.* y *Vibrio spp.*

El término "bacterias Gram-negativas mutantes" "bacterias Gram-negativas mutantes de LPS", "bacterias Gram-negativas mutantes kdsD y gutQ", "bacterias Gram-negativas mutantes API" o términos similares, tal como se usan aquí, incluyen las bacterias Gram-negativas de la invención que han sido mutadas una o más veces en, por ejemplo, uno o más de los genes gutQ, kdsD, kdsA, kdsB, waaA, msaA, yhjD, o cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación, para producir así una membrana externa substancialmente carente de expresión proteica LPS.

Una "porción inmunogénica de una molécula" se refiere a una porción de la molécula que es capaz de provocar una reacción inmune frente a la molécula en un sujeto.

El término "aislado", tal como se aplica a moléculas de LPS o de lípido IVA, se refiere a LPS o lípido IVA que ha sido aislado (v.g., aislamiento parcial o completo) de otros componentes bacterianos, en particular de la membrana externa.

Tal como se usa aquí, el término "porción", cuando se usa en relación a una secuencia (v.g., una secuencia de aminoácidos de una proteína, una secuencia de ácido nucleico de un gen), representa cualquier cantidad de la secuencia referenciada (v.g., 0,001%, 0,1%, 1%, 10%, 30%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99,999% de una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico).

El término "modulación", tal como se usa aquí, se refiere tanto a la regulación a más (es decir, activación o estimulación (v.g., por agonismo o potenciación)) como a la regulación a menos (es decir, inhibición o supresión (v.g., por antagonismo, disminución o inhibición)). El término "inducible" se refiere, en particular, a una expresión génica que no es constitutiva, pero que tiene lugar en respuesta a un estímulo (v.g., temperatura, metales pesados u otro aditivo del medio).

El término "animales no humanos" incluye cualquier animal que pueda ser tratado o utilizado en pruebas de la presente invención, incluyendo mamíferos, tales como primates no humanos, roedores, ovejas, perros, vacas y

cerdos, y pollos, así como anfibios, reptiles, etc. Los animales no humanos preferidos son seleccionados entre la familia de los primates o la familia de los roedores (v.g., rata y ratón).

5 El término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos u oligonucleótidos, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando resulte apropiado, el ácido ribonucleico (ARN). También habría que entender que el término incluye, como equivalentes, análogos de ARN o de ADN preparados a partir de análogos nucleotídicos, y, según sea aplicable para la realización que se esté describiendo, polinucleótidos de una sola hebra (sentido o antisentido) y de doble hebra.

10 El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material que no es no deseable biológicamente o de algún otro modo, es decir, que el material puede ser administrado a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de un modo perjudicial con cualquiera de los otros compuestos de la composición farmacéutica en la que está contenido.

15 El término "pirogénico" o "pirogenicidad" se refiere a la capacidad de un compuesto para inducir fiebre o una respuesta febril cuando se administra a un sujeto. Dichas respuestas febriles están generalmente mediadas por las citoquinas proinflamatorias del huésped IL-1, IL-6 y/o TNF- α , cuya secreción es inducida, v.g., por LPS.

20 Una sustancia que tiene "pirogenicidad reducida" o un "derivado con pirogenicidad reducida" se refiere a una sustancia que tiene menos actividad pirogénica que la sustancia de contrapartida, v.g., que es menos de aproximadamente un 80% pirogénica en relación a una sustancia de contrapartida, preferiblemente menos de aproximadamente un 70% pirogénica, más preferiblemente menos de aproximadamente un 60% pirogénica, más preferiblemente menos de aproximadamente un 50% pirogénica, más preferiblemente menos de aproximadamente un 40% pirogénica, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente un 30% pirogénica. En otros términos, una sustancia que tiene pirogenicidad reducida es al menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o 70% menos pirogénica que la correspondiente sustancia, según se determina mediante cualquiera de los ensayos aquí descritos o conocidos en la técnica.

30 "Pirogenicidad substancialmente reducida" o "derivado con pirogenicidad substancialmente reducida" se refieren a una sustancia (v.g., producida por bacterias Gram-negativas viables no tóxicas) que ha sido alterada de tal forma que tiene menos de un 20% de pirogenicidad en relación a la sustancia de tipo salvaje, preferiblemente menos de un 10% de pirogenicidad, preferiblemente menos de un 1% de pirogenicidad, preferiblemente menos de un 10⁻¹% de pirogenicidad, preferiblemente menos de un 10⁻²% de pirogenicidad, preferiblemente menos de un 10⁻³% de pirogenicidad, preferiblemente menos de un 10⁻⁴% de pirogenicidad, preferiblemente menos de un 10⁻⁵% de pirogenicidad y más preferiblemente menos de un 10⁻⁶% de pirogenicidad en relación a la sustancia de tipo salvaje. En otros términos, una sustancia que tiene pirogenicidad substancialmente reducida es al menos aproximadamente un 90%, un 99%, 10 veces, aproximadamente 10² veces, aproximadamente 10³ veces, al menos aproximadamente 10⁴ veces, al menos aproximadamente 10⁵ veces, al menos aproximadamente 10⁶ veces, menos pirogénica en relación a la correspondiente sustancia inalterada, según se determina por cualquiera de los ensayos aquí descritos o conocidos en la técnica.

45 Tal como se usa aquí, el término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico (v.g., mediante un vector de expresión) en una célula receptora por transferencia génica mediada por ácidos nucleicos. "Transformación", tal como se usa aquí, se refiere a un proceso en el cual el genotipo de una célula cambia como resultado de la captación celular de ADN o ARN exógeno. En una realización ilustrativa, una célula transformada es una que expresa una forma mutante de uno o más de los genes kdsD y gutQ. Una célula transformada puede ser también una que exprese un ácido nucleico que interfiere con la expresión de un gen gutQ, kdsD, kdsA, kdsB, waaA, msbA, ynjD o cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación.

50 Tal como se usa aquí, el término "transgén" significa un ácido nucleico (v.g., un gen kdsD, gutQ, kdsA, kdsB, waaA, msbA, ynjD mutante o cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación, o un transcripto antisentido de éstos) que ha sido introducido en una célula. Un transgén podría ser parcial o totalmente heterólogo, es decir, extraño, para el animal o célula transgénicos en los que se introduce, o puede ser homólogo a un gen endógeno del organismo o célula en los que se introduce, pero que ha sido diseñado para ser insertado, o que es insertado, en el genoma del animal o célula de tal forma que se altere el genoma de la célula en la que se inserta. Un transgén también puede estar presente en una célula en forma de episoma.

60 El término "tratar" a un sujeto para una afección o enfermedad, tal como se utiliza aquí, pretende incluir la curación, así como el mejoramiento, de al menos un síntoma de la afección o enfermedad.

65 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Se hace aquí referencia a vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos como "vectores de expresión". El término "sistema de expresión", tal como se utiliza aquí, se refiere a un vector de expresión en condiciones mediante las cuales un ARNm puede transcribirse y/o un ARNm puede traducirse a proteína, ARN estructural u otro componente celular. El sistema de expresión puede ser un

sistema de expresión *in vitro*, de disponibilidad comercial o fácilmente preparado según técnicas conocidas en este campo, o puede ser un sistema de expresión *in vivo*, tal como una célula eucariótica o procariótica que contiene el vector de expresión. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas del ADN recombinante están con frecuencia en forma de "plásmidos", que hacen referencia, en general, a bucles de ADN de doble hebra circulares que, en su forma de vector, no se unen al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" son usados indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir aquellas otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y son bien conocidas en la técnica o que se conocerán en la técnica a partir de ahora (*v.g.*, vectores cósmidos, fagémidos y bacteriófagos).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona Gram-negativas no tóxicas según se define en las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables (*v.g.*, *E. coli*) substancialmente carentes de lipopolisacárido (LPS, endotoxina) en la membrana externa. La presente divulgación proporciona métodos de generación de bacterias Gram-negativas viables no tóxicas y usos de los mismos. La presente invención también proporciona composiciones y desvela métodos para inducir respuestas inmunes y para investigar y desarrollar agentes terapéuticos.

Las bacterias Gram-negativas poseen una bicapa lipídica asimétrica que rodea el peptidoglicano, la membrana externa (ME). La lámina interna de la ME está primariamente compuesta por diversos glicerofosfolípidos, mientras que la lámina externa contiene predominantemente la macromolécula anfifílica única, el lipopolisacárido (LPS). En *Escherichia coli* y otras bacterias entéricas estrechamente relacionadas, existen $\sim 10^6$ moléculas de LPS por célula, que cubren prácticamente el 75% del área superficial celular total, lo que representa $\sim 30\%$ del peso bruto de la ME (véanse, *v.g.*, S. M. Galloway, C. R. Raetz, *J. Biol. Chem.* 265, 6394 (1990); L. Leive, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235, 109 (1974); H. Nikaido, en *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt, Ed. (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987), vol. 1, pp. 29-47).

La localización expuesta en la interfaz entre la célula bacteriana y el medio ambiente acuoso presenta LPS como antígeno de superficie asociado a ME principal. El LPS está implicado en un espectro diverso de actividades patológicas y fisiológicas asociadas a la respuesta inmune del huésped (véanse, *v.g.*, A. Wiese, *et al.*, *Biol. Chem.* 380, 767 (1999); H. Heine, *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 19, 279 (2001)). El LPS es una molécula inmunoestimuladora/inflamatoria reconocida como mediador en la patogenia Gram-negativa y la inflamación generalizada, y como tal el término endotoxina es frecuentemente utilizado indistintamente con LPS. La capa de LPS es esencial tanto para la forma como para la función de la ME de las bacterias Gram-negativas. Por lo tanto, además de ser un jugador clave en la patogenia Gram-negativa, el LPS es también un determinante crítico de la supervivencia de la bacteria.

El LPS de diversas bacterias Gram-negativas se conforma a una arquitectura estructural común conceptualmente dividida en tres regiones: el lípido A embebido en la ME, un núcleo de oligosacárido y una cadena de polisacárido hidrofílica específica de O consistente en unidades de *n*-repeticiones en Enterobacteriaceae u oligosacáridos ramificados cortos en ciertas bacterias, que comprenden patógenos de mucosas humanos, tales como *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y *Chlamydia spp.* El lípido A es el dominio de LPS más conservado entre los géneros de bacterias Gram-negativas, y al ser el componente estructural responsable de las actividades biológicas en el huésped, representa un principio endotóxico del LPS. En las bacterias entéricas, el lípido A consiste en un esqueleto de disacárido de D-glucosamina β -1,6-unido que se acila con cuatro ácidos (R)-3-hidroximirísticos en uniones éster-(3,3') o amida-(2,2'). Las moléculas de lípido A maduro de las cepas de tipo salvaje de *E. coli* contienen típicamente dos cadenas de acilo adicionales, primariamente laurato y miristato, unidas al grupo (R)-3-hidroximiristoilo de la glucosamina no reductora para formar las unidades de aciloxiacilo características del lípido A. El núcleo de oligosacárido conecta el lípido A a la cadena de polisacárido hipervariable, y se divide aún en las regiones interna y externa del núcleo de oligosacárido. Aunque el núcleo externo no está tan bien conservado, variando tanto en composición de sacáridos como en uniones glicosídicas, la mayoría de las bacterias Gram-negativas elaboran un núcleo interno que contiene al menos una molécula de 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosonato (KDO).

KDO es un componente esencial del LPS, y es un residuo conservado que se encuentra en prácticamente todas las estructuras de LPS (véase, *v.g.*, O. Holst, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 14, 87 (2002)). La estructura mínima del LPS requerida para el crecimiento de *E. coli* son dos residuos de KDO unidos al lípido A (KDO2-lípido A o Re endotoxina) (véanse, *v.g.*, C. R. Raetz, C. Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635 (2002); S. Gronow, H. Brade, *J. Endotoxin Res.* 7, 3 (2001)), lo que resalta la importancia de KDO en el mantenimiento de la integridad y de la viabilidad de la célula bacteriana. La L-API está codificada por el gen *kdsD* en *E. coli* K-12 (véase, *v.g.*, Meredith, T. C. & Woodard, R. W. (2003) *J Biol Chem* 278, 32771-7).

La naturaleza ubicua de KDO en las estructuras de LPS ha impulsado la investigación sobre su biosíntesis. La ruta se inicia por la enzima d-arabinosa 5-fosfato (A5P) isomerasa (API), que convierte el intermediario de la ruta de las pentosas D-ribulosa 5-fosfato en A5P. A continuación, el A5P se condensa con fosfoenolpiruvato, para formar Kdo 8-

fosfato (Kdo8P) (KdsA), se hidroliza a Kdo (KdsC) y se activa como el nucleótido de azúcar CMP-Kdo (KdsB), antes de ser transferido finalmente de CMP-Kdo al lípido IVA aceptor (WaaA) (Figura 11). Las aciltransferasas tardías LpxL y LpxM transfieren a continuación los ácidos grasos laurato y miristato, respectivamente, al Kdo2-lípido IVA para formar las unidades de aciloxiacilo características del Kdo-lípido A hexaacilado. En *E. coli* K-12, hay dos genes API (*kdsD* y *gutQ*).

Se especuló que pueden existir otras API en *E. coli* en base a búsquedas de homología. En particular, la lectura abierta final del operón del glucitol *gutQ* tiene una homología significativa (45% de identidad) con *kdsD* (anteriormente *yrbH*). G-API es el último producto génico del operón *gutAEBDMRQ*, que contiene siete genes transcritos convergentemente (Figura 10). Como se muestra en la Tabla 1, *gutQ* y *kdsD* comparten propiedades bioquímicas similares.

Tabla 1

Propiedades bioquímicas de *kdsD* y *gutQ*

| Propiedad | <i>kdsD</i> ^a | <i>gutQ</i> |
|--|----------------------------|----------------------------|
| K_m (A5P) | 0,61 ± 0,06 mM | 1,2 ± 0,1 mM |
| K_m (Ru5P) | 0,35 ± 0,08 mM | 0,64 ± 0,08 mM |
| k_{cat} (A5P a Ru5P) | 157 ± 4 seg ⁻¹ | 218 ± 4 seg ⁻¹ |
| k_{cat} (Ru5P a A5P) | 255 ± 16 seg ⁻¹ | 242 ± 11 seg ⁻¹ |
| K_{eq} (calc.) _b | 0,47 (0,35) | 0,47 (0,48) |
| pH óptimo | 8,4 | 8,25 |
| Específico para A5P/Ru5P _c | Sí | Sí |
| Equiv. de Zn ²⁺ /subunidad ^d | 1,0 ± 0,1 | 1,4 ± 0,2 |
| Inhibición por Zn ²⁺ 10 mM ^e | Sí | Sí |
| Activación por EDTA ^f | Sí | Sí |
| Subunidad PM | 35104 Da | 33909 Da |
| (cacl.) ^g | (35196 Da) | (34031 Da) |
| PM nativo ^h | 122 ± 5 kDa (tetrámero) | 133 ± 4 kDa (tetrámero) |

^a Datos de Yamada, M., Yamada, Y. & Saier, M. H., Jr. (1990) DNA Seq 1, 141-5 ^b Medida por RMN ³¹P; calculada a partir de la relación de Haldane (Ru5P/A5P) ^c Véanse los procedimientos experimentales para los sustratos estudiados ^d Equivalentes de Zn²⁺ por monómero determinados por espectrometría de plasma-masas inductivamente acoplada de alta resolución ^e Queda menos de un 5% de actividad ^f Como enzima aislada con 10 μM EDTA ^g Determinado por espectrometría de masas con ionización por electronebulización; calculado a partir de la secuencia proteica ^h Determinado por filtración por gel

El operón del glucitol expresa un sistema de fosfoenolpiruvato:azúcar fosfotransferasa (PTS) que es responsable de la captación y el catabolismo coordinados del D-glucitol desde el ambiente (véase, v.g., T. C. Meredith, R. W. Woodard, J. Biol. Chem. 278, 32771 (2003)). El operón fue originalmente estudiado por Lengeler (véanse, v.g., C. Galanos, *et al.*, Eur. J. Biochem. 9, 245 (1969); S. Müller-Loennies, *et al.*, J. Biol. Chem. 278, 34090 (2003)) y posteriormente por Saier (véanse, v.g., K. A. Brozek, C. R. Raetz, J. Biol. Chem. 265, 15410 (1990); H. Nikaido, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 593 (2003)), y se sabe que consiste en siete genes convergentemente transcritos, *gutAEBDMRQ*. El complejo EII^{Gut} está formado por *gutA* (dominio EIIC1), *gutE* (dominios EIIBC2) y *gutB* (dominio EIIA), y transporta el D-glucitol a través de la membrana interna y hacia el interior de la célula como D-glucitol 6-fosfato. El D-glucitol 6-fosfato es entonces metabolizado por *gutD*, una deshidrogenasa dependiente de NADH, al intermediario glicolítico D-fructosa 6-fosfato. La expresión del operón *gut* está estrechamente controlada por un sistema regulador de múltiples componentes complejo, consistente en un represor transcripcional (*gutR*) y un activador transcripcional (*gutM*) además de la regulación mediada por AMPc-CAP (monofosfato de adenosina cíclico-proteína activadora de catabolitos) (véase, v.g., C. J. Belunis, *et al.*, J. Biol. Chem. 270, 27646 (1995)). Sin embargo, la función de *gutQ* sigue siendo desconocida (véase, v.g., R. C. Goldman, W. E. Kohlbrenner, J. Bacteriol. 163, 256 (1985)).

En experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención, se construyeron bacterias Gram-negativas viables substancialmente carentes de expresión de LPS en la membrana externa a pesar de elaborar de manera exclusiva el precursor de LPS endotóxicamente inactivo lípido IV_a, un antagonista conocido de la sepsis inducida por LPS en humanos. La presente invención no se limita a métodos particulares de construcción de bacterias Gram-negativas viables substancialmente carentes de expresión de LPS en la membrana externa (v.g., a través de la supresión de la expresión de API; a través de mutación de los genes *gutQ* y/o *kdsD*; a través de la supresión de la expresión de KDO; a través de la inhibición de las asociaciones entre KDO y el Lípido IVA; a través de mutaciones de los genes *kdsA* y/o *kdsB* y/o *waaA* y/o *msbA* y/o *yhjD*, u otros genes biosintéticos, de procesamiento o de circulación; a través de la supresión de la expresión del lípido IV_A; a través de mutaciones del gen *lpxM*, u otros genes biosintéticos, de procesamiento o de circulación para el lípido IV_A).

La presente invención contempla el uso de cualquier tipo de cepa bacteriana Gram-negativa en la construcción de bacterias Gram-negativas viables substancialmente carentes de expresión de LPS en la membrana externa. Como ejemplos de bacterias Gram-negativas útiles en la presente invención, se incluyen, aunque sin limitación, *Escherichia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Legionella spp.*, *Corynebacteria spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp* y *Vibrio spp.* En realizaciones preferidas, se usa *Escherichia coli*. Como ejemplos de cepas de *Escherichia coli* que pueden ser utilizadas, se incluyen, aunque sin limitación, *Escherichia coli* (*E. coli*) cepas DH5a, HB 101, HS-4, 4608-58, 1-184-68, 53638-C-17, 13-80 y 6-81 (véanse, v.g., Sambrook, *et al.*, (Eds.), 1993, En: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Grant *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:4645; Sansonetti *et al.*, 1982, Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 132A:351), *E. coli* enterotoxigénica (Evans *et al.*, 1975, Infect. Immun., 12:656), *E. coli* enteropatógena (Donnenberg *et al.*, 1994, J. Infect. Dis., 169:831) y *E. coli* enterohemorrágica (véase, v.g., McKee y O'Brien, 1995, Infect. Immun., 63: 2070).

La presente invención no se limita a condiciones de cultivo específicas para el crecimiento de cepas bacterianas Gram-negativas mutantes (v.g., cepas bacterianas Gram-negativas con mutaciones en los genes *kdsD* y/o *gutQ*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* *yhjD*, u otros genes biosintéticos, de procesamiento o de circulación). Con fines ilustrativos, las bacterias pueden ser cultivadas en cualquier medio líquido estándar adecuado para el crecimiento bacteriano, tal como un medio LB (Difco, Detroit Mich.), caldo Nutriente (Difco), caldo Tryptic Soy (Difco) o caldo mínimo M9 (Difco), usando técnicas de cultivo convencionales apropiadas para la cepa bacteriana que se esté cultivando (Miller, 1991, supra). Como alternativa, las bacterias pueden ser cultivadas en medio sólido, tal como agar L (Difco), agar Nutriente (Difco), agar Tryptic Soy (Difco) o agar mínimo M9 (Difco). Para cepas bacterianas Gram-negativas donde dicha cepa comprende las mutaciones *kdsD* y/o *gutQ*, se usa una fuente exógena de D-arabinosa 5-fosfato para el crecimiento y la supervivencia de las bacterias (Meredith *et al.*, 2006, ACS Chem. Biol. 1:33-42). De manera alternativa, experimentos realizados durante el desarrollo de algunas realizaciones de la invención muestran que la sobreexpresión del gen *msbA* en cepas que comprenden las mutaciones *kdsD* y/o *gutQ* es una alternativa a la suplementación con D-arabinosa 5-fosfato para el crecimiento y la supervivencia de las bacterias.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con mutaciones en los genes *gutQ*, *kdsD* (*yrbH*), *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* y/o *yhjD*, o mutaciones en cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación. En algunas realizaciones, las mutaciones de los genes *gutQ* y *kdsD* inhiben la expresión de API en la cepa bacteriana, lo cual inhibe la expresión de KDO, lo que inhibe la expresión de LPS en la membrana externa. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con mutaciones en el gen *kdsA*. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con mutaciones en el gen *kdsB*. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con mutaciones en el gen *waaA*. Experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención mostraron que las mutaciones de *kdsA*, *kdsB* y/o *waaA* inhibían la ruta biosintética del LPS evitando la producción de KDO o la asociación entre KDO₂ y el Lípido IV_A, de tal forma que el Lípido IV_A solo es transportado a la membrana externa. Las células bacterianas sobreviven y están libres de LPS y son no tóxicas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con mutaciones en los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB* y/o *waaA*, y se incluye además una mutación en el gen *msbA*. En algunas realizaciones la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con mutaciones en los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB* o *waaA*, y se incluye además una mutación en el gen *yhjD*.

La presente invención contempla el uso de cualquier técnica para introducir mutaciones genéticas en bacterias Gram-negativas. Dichas técnicas incluyen, aunque sin limitación, mutagénesis no específica, usando agentes químicos tales como N-metil-N'-nitro N-nitrosoguanidina, naranja de acridina, bromuro de etidio o exposición no letal a la luz ultravioleta (véase, v.g., Miller (Ed.), 1991, En: A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). De manera alternativa, se pueden introducir las mutaciones usando mutagénesis Tn10, transducción mediada por bacteriófagos, intercambio alélico mediado por el fago lambda, o transferencia conjugacional, o mutagénesis dirigida a sitio usando técnicas de ADN recombinante (véanse, v.g., Miller (Ed.), 1991, supra; Hone, *et al.*, 1987, J. Infect. Dis., 156:167; Noriega, *et al.*, 1994, Infect. Immun., 62:5168; Hone, *et al.*, 1991, Vaccine, 9:810; Chatfield, *et al.*, 1992, Vaccine, 10:53; Pickard, *et al.*, 1994, Infect. Immun., 62:3984; Odegard, *et al.*, 1997, J. Biol. Chem., 272:19688; Lee, *et al.*, 1995, J. Biol. Chem., 270:27151; Garrett, *et al.*, 1998, J. Biol. Chem., 273:12457). Se puede usar cualquier método para introducir mutaciones, y se pueden introducir las mutaciones conjuntamente con una o más mutaciones adicionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables con más de una mutación, tal como mutaciones en los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA* *msbA*, *yhjD*, o mutaciones en cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación.

En algunas realizaciones, las mutaciones en bacterias Gram-negativas (v.g., mutaciones de los genes *gutQ*, *kdsD* (*yrbH*), *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* y/o *yhjD*, o mutaciones de cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación) se expresan constitutivamente o bajo el control de promotores inducibles, tales como, por ejemplo, la familia de promotores del shock térmico sensibles a la temperatura, o el promotor *nirB* anaeróticamente inducido (véase, v.g., Harborne, *et al.*, 1992, Mol. Micro., 6:2805) o promotores represibles, tales como *uapA* (véase, v.g.,

Gorfinkiel, *et al.*, 1993, J. Biol. Chem., 268:23376) o *gcv* (véase, *v.g.*, Stauffer, *et al.*, 1994, J. Bact, 176:6159). La selección de un promotor apropiado dependerá de la cepa bacteriana huésped y será obvia para los expertos en la técnica.

5 La presente divulgación proporciona bacterias Gram-negativas viables (*v.g.*, *E. coli*) que carecen de expresión de API. La presente divulgación no se limita a un método particular de inhibición de la expresión de API. En algunos ejemplos, se inhibe la expresión de API por supresión de la expresión de la proteína KDO. La presente invención no se limita a un método particular de supresión de la expresión de la proteína KDO. En algunas realizaciones, se suprime la expresión de la proteína KDO a través de, por ejemplo, mutación del gen *gutQ*, del gen *kdsD*, del gen *kdsA* o del gen *kdsB*, o mutaciones en cualquier otro gen biosintético de KDO.

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables no tóxicas (*v.g.*, libres de endotoxina) (*v.g.*, *E. coli*). La presente invención no se limita a un método particular de obtención de bacterias Gram-negativas viables no tóxicas. Se pueden obtener bacterias Gram-negativas viables no tóxicas por supresión de la expresión de LPS en la membrana externa. La presente invención no se limita a un método particular de supresión de la expresión de LPS en la membrana externa. En algunos ejemplos, se suprime la expresión de LPS por supresión de la expresión de la proteína API. La presente divulgación no se limita a un método particular de supresión de la expresión de API. En algunos ejemplos, se suprime la expresión de API por supresión de la expresión de la proteína KDO. La presente invención no se limita a un método particular de supresión de la expresión de la proteína KDO. En algunas realizaciones, se suprime la expresión de la proteína KDO a través de, por ejemplo, mutación del gen *gutQ* y del gen *kdsD*. En algunas realizaciones, no se produce expresión de la proteína KDO en la membrana externa debido a que la proteína KDO no se asocia al Lípido IV_A, de tal forma que sólo el Lípido IV_A es transportado a la membrana externa. Por ejemplo, mutaciones en los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA* *msbA* y/o *yhjD* o mutaciones de cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación eliminan la formación o la presentación en la membrana del complejo KDO₂-Lípido IV_A, para dar como resultado, por ejemplo, que sólo se transporte la molécula de Lípido IV_A a la membrana externa y que no haya posterior formación de LPS.

15 En algunas realizaciones, las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas pueden ser sometidas a ingeniería genética por métodos de clonación conocidos para los expertos en la técnica (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) para que expresen, produzcan y exhiban proteínas y péptidos no nativos, tales como, aunque sin limitación, LPS de otros organismos bacterianos, derivados lipídicos únicos, producción de proteínas o péptidos humanos, producción de proteínas o péptidos no humanos, producción de vacunas y similares. Dichos productos producidos hallan utilidad en una variedad de aplicaciones, incluyendo, aunque sin limitación, la terapéutica clínica y los trabajos de investigación básica.

20 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bacterias Gram-negativas viables (*v.g.*, *E. coli*) que tienen una membrana externa que expresa lípido IV_A. La presente invención no se limita a un método particular de obtención de bacterias Gram-negativas viables que tienen una membrana externa que expresa lípido IV_A. En algunos ejemplos, se obtienen bacterias Gram-negativas viables que tienen una membrana externa que expresa lípido IV_A por supresión de la expresión de la proteína API. La presente divulgación no se limita a un método particular de supresión de la expresión de la proteína API. En algunos ejemplos, se suprime la expresión de API por supresión de la expresión de la proteína KDO. La presente invención no se limita a un método particular de supresión de la expresión de la proteína BCDO. En algunas realizaciones, se suprime la expresión de la proteína KDO a través de, por ejemplo, mutación del gen *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* y/o *yhjD* o mutaciones de cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación. En algunas realizaciones, se obtienen bacterias Gram-negativas viables libres de LPS que tienen una membrana externa que expresa Lípido IV_A por inhibición de la asociación entre KDO y el Lípido IV_A, de tal forma que sólo se transporta Lípido IV_A a la membrana externa (*v.g.*, sin KDO). La presente invención no se limita a un método particular de inhibición de la asociación entre KDO y el Lípido IV_A. En algunas realizaciones, se inhibe la asociación de KDO y el Lípido IV_A mediante, por ejemplo, mutaciones en los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA* y/o *yhjD*, o mutaciones de cualquier otro gen biosintético, de procesamiento o de circulación. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona lípido IV_A aislado de bacterias Gram-negativas viables no tóxicas (*v.g.*, *E. coli*). Se usa el lípido IV_A, por ejemplo, en el estudio de las rutas de señalización del shock séptico de mamíferos, y como bloque de construcción en la síntesis de moléculas de tipo LPS. Los métodos actuales para aislar el lípido IV_A conllevan síntesis orgánica total tradicional, degradación del LPS maduro o purificación a partir de mutantes condicionados que elaboran una capa de LPS heterogénea que contiene una fracción del lípido IV_A deseado. Como inconvenientes de dichos métodos, se incluyen un bajo rendimiento en lípido IV_A y grandes cantidades de trabajo. El aislamiento de lípido IV_A a partir de las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas de la presente invención representa una mejora significativa con respecto a dichos métodos, debido a la presencia en la membrana externa de lípido IV_A.

25 La presente divulgación proporciona vesículas de membrana externa aisladas de bacterias Gram-negativas viables no tóxicas (*v.g.*, *E. coli*). El lípido IV_A es un antagonista de las rutas de señalización del shock séptico, y un enfoque viable para el tratamiento de pacientes con sepsis aguda es bloquear la ruta de señalización en la que está implicado el LPS. En algunos ejemplos, se usan vesículas aisladas de la membrana externa de bacterias Gram-

negativas viables que tienen una membrana externa que expresa lípido IVa para tratar, o prevenir profilácticamente, trastornos relacionados con la sepsis. Las vesículas de la membrana externa preparadas a partir de las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas de la presente divulgación (v.g., la cepa Δ API) contienen lípido IVa como antagonista de LPS.

En algunos ejemplos, se usan vesículas de la membrana externa aisladas de bacterias Gram-negativas viables (v.g., *E. coli*) con fines de obtención de vacunas mejoradas basadas en vesículas de membrana externa. Las vacunas basadas en VME son con frecuencia "detoxificadas" por eliminación del LPS mediante tratamientos químicos severos. Los métodos de eliminación, sin embargo, tienen un efecto perjudicial sobre los componentes proteicos de la vacuna de VME, que puede ser una buena candidata para dirigir anticuerpos contra, en particular, proteínas de la membrana externa clonadas de otros patógenos Gram-negativos. La detoxificación no sería necesaria con la cepa mutante Δ API como hospedador, proporcionando un nivel adicional de seguridad.

La presente divulgación proporciona bacterias Gram-negativas que tienen una membrana externa tanto con lípido IVa como con expresión de LPS. La separación de la toxicidad del LPS y de las propiedades inmunoestimulantes es un reto importante en el desarrollo de adyuvantes basados en LPS o vacunas basadas en LPS. Dado que el bloqueo en la cepa Δ API es precoz en la ruta del LPS, se pueden usar enzimas de otras bacterias (que modifiquen el LPS con grupos fosfato, etanolamina, L-4-desoxiarabinosa, diferentes longitudes de las cadenas de acilo, etc.) y enzimas mutadas con actividades alteradas para generar una serie de moléculas de LPS con actividades biológicas únicas en el interior de la célula. Ya existen muchos métodos para dichas manipulaciones genéticas en *Escherichia coli*. Además, se puede restaurar la síntesis del LPS maduro por inclusión de D-arabinosa 5-fosfato en el medio de crecimiento, lo que permite controlar y optimizar la cantidad y la proporción entre derivados de LPS y LPS maduro. Dichas "mezclas" de LPS pueden alcanzar el equilibrio deseado entre actividad inmunoestimulante y retención de niveles bajos aceptables de toxicidad potencial.

En algunos ejemplos, se usan bacterias Gram-negativas viables no tóxicas como hospedadores para la producción de moléculas terapéuticas libres de endotoxina. La presente divulgación no se limita a moléculas terapéuticas particulares. Tradicionalmente, la producción de moléculas terapéuticas en bacterias Gram-negativas, ya sean vesículas de ME para vacunas, moléculas de tipo LPS (tales como monofosforil-lípido A (MPLA)) para uso como adyuvantes, proteínas farmacéuticas recombinantes, macromoléculas o ADN para transfección con células de mamífero/terapia génica, se encuentra obstaculizada por la presencia de endotoxina procedente del huésped bacteriano. La contaminación de la molécula terapéutica con endotoxina es un problema, ya que el potencial inmunogénico del LPS está bien documentado. Las estrategias de producción actuales para aliviar la contaminación con endotoxina incluyen diversas técnicas de purificación, tales como los kits comercializados para la purificación de plásmidos de ADN libres de endotoxina, seguido de ensayos para medir los niveles de endotoxina. Como la cepa Δ API no produce endotoxina, no se requieren dichas etapas de purificación. Como tales, las cepas de bacterias Gram-negativas viables no tóxicas de la presente invención (v.g., la cepa Δ API) proporcionan métodos mejorados de aislamiento de moléculas terapéuticas libres de endotoxina (v.g., lípido IVa). Por ejemplo, se contempla la cepa Δ API como un hospedador para la producción de moléculas terapéuticas comercialmente importantes en un ambiente libre de endotoxina usando las bien estudiadas bacterias Gram-negativas. Adicionalmente, se contemplan cepas que tienen una mutación en los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA* *msbA* *yhjD*, o mutaciones en cualquier otro gen bacteriano biosintético, de procesamiento o de circulación, como hospedadores para la producción de moléculas terapéuticas comercialmente importantes en un ambiente libre de endotoxina usando bacterias Gram-negativas.

En algunos ejemplos, se pueden usar las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas para la producción de vacunas u otras composiciones que estimulen la respuesta inmune. Por ejemplo, se produce una vacuna menos tóxica contra la fiebre tifoidea usando las bacterias Gram-negativas aquí descritas. Las vacunas actuales para la fiebre tifoidea causan efectos colaterales debido a las endotoxinas presentes en la preparación vacunal. Se contempla que la utilización de las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas o porciones de las mismas como aquí se describe, donde no hay presencia de LPS (v.g., endotoxina) sobre la membrana externa, obviará los efectos colaterales causados por las preparaciones de vacunas impregnadas de endotoxina. La presente invención halla utilidad en cualquier preparación vacunal u otra composición donde típicamente se encuentra contaminación con endotoxina. También se contempla que las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas de la presente invención encuentren utilidad como vacunas atenuadas vivas debido a su fenotipo deficiente en LPS.

Como tal, la presente invención encuentra un uso en el desarrollo de vacunas de ME y otras composiciones para inducir respuestas inmunes que estén libres de contaminación con endotoxina y que puedan ser administradas a sujetos con fines de inmunización e investigación. Por ejemplo, se pueden preparar vacunas atenuadas o de ME usando procedimientos como los descritos en la Solicitud de Patente Estadounidense 2005/0013831 o en la Patente Estadounidense 6.558.677. Por ejemplo, dicha vacuna halla utilidad en la inmunización de sujetos en riesgo de adquirir shock séptico (v.g., por *E. coli*), tales como pacientes de cirugía. Además, se pueden desarrollar vacunas atenuadas o de ME libres de endotoxina para inmunización contra, por ejemplo, la tos ferina (v.g., *Bordetella* sp.), la brucelosis o el shock endotóxico (v.g., *Brucella* sp.), las infecciones pulmonares y respiratorias (v.g., *Pseudomonas* sp., *Haemophilus* sp., *Moraxella* sp.), el cólera (v.g., *Vibrio* sp.), la neumonía (v.g., *Klebsiella* sp., *Haemophilus* sp.), las úlceras gástricas (v.g., *Helicobacter* sp.), la meningitis (v.g., *Neisseria* sp., *Haemophilus* sp.), la otitis media (v.g.,

Haemophilus sp., *Moraxella* sp.), la disentería y la diarrea (v.g., *Shigella* sp., *E. coli*, *Vibrio* sp., *Campylobacter* sp., *Yersenia* sp.), las fiebres entéricas (v.g., *Salmonella* sp.), el tracoma y las enfermedades de transmisión sexual (v.g., *Chlamydia* sp.), la tularemia (v.g., *Franciscella* sp.) y la peste (v.g., *Yersinia* sp.).

5 En algunos ejemplos, las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas como aquí se describe hallan utilidad en la generación de anticuerpos terapéuticos para aplicaciones terapéuticas y de investigación. En algunos ejemplos, los sujetos son activamente inmunizados usando las bacterias Gram-negativas no tóxicas o porciones de las mismas (v.g., preparaciones de membrana), y se usan entonces anticuerpos preparados a partir de sueros hiperinmunes humanos para proteger pasivamente a los sujetos frente a la infección bacteriana y la sepsis. Sin embargo, se
10 consigue más tradicionalmente la generación de anticuerpos terapéuticos en animales hospedadores, tales como, aunque sin limitación, primates, conejos, perros, cobayas, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. Se crean anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, usando las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas como inmunógenos por sí mismos para crear anticuerpos en animales hospedadores para administración a sujetos humanos. Las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas aquí descritas hallan adicionalmente una utilidad como hospedadores para
15 presentar un antígeno extraño (v.g., péptido o proteína inmunogénica) que se usa para crear anticuerpos terapéuticos en un animal hospedador. Por ejemplo, las bacterias Gram-negativas viables no tóxicas, además de ser substancialmente deficientes en LPS, pueden ser genéticamente manipuladas (v.g., por métodos de clonación establecidos conocidos para los expertos en la técnica) para expresar proteínas y péptidos no nativos que hallan uso como inmunógenos para la producción de anticuerpos. Dichos inmunógenos incluyen, aunque sin limitación, péptidos para dirigir anticuerpos hacia células cancerosas y otras células causantes de enfermedad, proteínas de la
20 envuelta vírica para dirigir virus a las células y similares.

La presente divulgación proporciona bacterias Gram-negativas viables no tóxicas útiles para presentar proteínas inmunogénicas para la producción de anticuerpos terapéuticos. Un anticuerpo contra una proteína inmunogénica
25 puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal, siempre que pueda reconocer la proteína antigénica. Se pueden producir anticuerpos según un procedimiento convencional de preparación de anticuerpos o de antisueros conocido para los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, se usan bacterias Gram-negativas viables (v.g., *E. coli*) que tienen una membrana externa que expresa lípido IVa con fines de cribado farmacéutico (v.g., cribado para agentes antipirogénicos). La cepa mutante Δ API tiene una barrera de permeabilidad muy baja, que la hace particularmente susceptible a grandes moléculas de fármacos hidrofóbicas que normalmente no pueden penetrar en la ME. Los bioensayos de células enteras de colecciones de compuestos utilizan normalmente agentes permeabilizantes, tales como tolueno, EDTA, péptidos catiónicos, etc., para ayudar a identificar candidatos facilitando la penetración de la ME. Una vez hechos los
30 candidatos principales parentales, se puede usar la química medicinal para mejorar la solubilidad, el reparto, el tamaño, etc. y producir un antibiótico. Muchos candidatos principales potenciales de estos cribados se pierden porque el compuesto no puede acceder a su diana proteica dentro de la ME. Usando, por ejemplo, la cepa mutante Δ API en estos cribados se alivian los problemas de permeabilidad de la ME disminuyendo la barrera de permeabilidad sin necesidad de aportar reactivos adicionales. De forma similar, dicha baja permeabilidad de la ME
40 de la Δ API constituye una ventaja cuando se transforma, por ejemplo, la cepa mutante Δ API con plásmidos de ADN durante la generación de genotecas de ADN. Las células con alta eficacia de transformación son esenciales para todas las tecnologías de ADN recombinante, y la cepa Δ API es un hospedador útil para dichas aplicaciones.

45 Ejemplos

Ejemplo I

Este ejemplo describe los mutantes de Δ API TCM 15 y KPM22. Se construyó un mutante auxotrófico de Δ API con delección de G-API y L-API, TCM 15, que se hizo dependiente de A5P exógeno para el crecimiento según el dogma establecido KDO₂-lípido A para *E. coli*. TCM15 era incapaz de formar colonias en medio sólido, independientemente del medio de crecimiento, de la temperatura de incubación o del tiempo, sin incluir A5P. Cuando se cultivó en medio MOPS-mínimo líquido con un 0,2% de glicerol como única fuente de carbono, la división celular se reanudó rutinariamente tras un lapso de 32-48 horas a pesar de la falta de A5P.

55 Se vio que la cepa KPM22 de *E. coli* era un mutante Δ API no condicional capaz de tener un crecimiento sostenido en medios ricos sin un retraso inicial a 37°C, aunque no quedaba actividad API medible en los extractos celulares. Tal como se muestra en la Tabla 2, el tiempo de duplicación aumentó a casi el doble del de la cepa de tipo salvaje parental en medio LB.

Tabla 2. Tiempos de generación en medio LB a diversas temperaturas

| Cepa | 30°C (min.) | 37°C (min.) | 42°C (min.) |
|---------|-------------|-------------|------------------|
| BW30270 | 39 | 24 | 22 |
| KPM22 | 55 | 38 | N/A ^a |
| KPM25 | 40 | 25 | 23 |

^a. Después de 2-3 generaciones, el índice de crecimiento era no exponencial.

- 5 Después de cambiar a temperaturas no permisivas (42°C), no se mantuvieron los índices de crecimiento exponencial tras 2 a 3 generaciones. El crecimiento quedó restaurado para KPM22 a elevadas temperaturas mediante un plásmido codificante de *kdsD* (KPM25), lo que sugiere una envuelta celular defectuosa debido al bloqueo en la síntesis de KDO.
- 10 Para investigar aún más KPM22, se extrajeron muestras de LPS de las células usando el método de extracción con fenol-cloroformo-éter de petróleo (PCP) (véase, *v.g.*, C. Galanos, *et al.*, Eur. J. Biochem. 9, 245 (1969)). Se determinó la composición de sacáridos del extracto de LPS para los azúcares constituyentes del núcleo interno [KDO y L-*glicero-D-mano*-heptosa (heptosa)] y el lípido A [D-glucosamina (GlcN)] (véase la Figura 1A). Las razones para BW30270 de tipo salvaje [1 GlcN : 0,9 KDO : 2,2 heptosa] y KPM25 [1,0 GlcN : 1,0 KDO : 2,5 heptosa] eran consistentes con la razón para la especie de LPS predominante (glicoforoma I) elaborada por *E. coli* K-12 [1,0 GlcN : 1,0 KDO : 2,0 heptosa] (véase, *v.g.*, S. Müller-Loennies, *et al.*, J. Biol. Chem. 278, 34090 (2003)). Se detectaron sólo trazas de KDO o heptosa en comparación con KPM22, aunque GlcN estaba aún presente, lo que sugiere que el esqueleto del lípido A estaba intacto.
- 20 El análisis de SDS-PAGE con tinción de plata de muestras de LPS preparadas a partir de lisados de células enteras tratadas con proteinasa K no detectó bandas para KPM22 (véase la Figura 1B; panel superior). Se trataron las membranas transferidas con ácido para escindir el núcleo de sacárido antes de sondear con el anticuerpo mAb A6, que reconocía el esqueleto de disacárido GlcN β-1,6-unido 1,4'-bisfosforilado no glicosilado del lípido A. El anticuerpo reconoció una sola banda de KPM22 que migraba más rápidamente que el patrón de endotoxina Re, pero al mismo nivel que el lípido IVa sintético (Figura 1B, panel central, calles 6 y 16, respectivamente). Sólo las
- 25 muestras de LPS preparadas a partir de KPM22 junto con lípido IVa sintético fueron reconocidas por mAb A6 cuando se omitió la etapa de hidrólisis ácida, lo que confirma que la estructura nativa del lípido A era no glicosilada (Figura 1B, panel inferior).
- 30 Se determinó el quimiotipo del precursor de LPS en KPM22 por espectrometría de masas de ciclotrón de iones con transformación de Fourier con ionización por electronebulización (ESI FT-ICR) en modo de iones negativos usando muestras de LPS purificado (véase la Figura 2, Tabla 3).

Tabla 3. Lista de picos en ESI FT-ICR MS

| Masa obs. ^{a,b} | Masa calc. ^a | Composición química ^c | Marcaje ^c |
|--------------------------|-------------------------|--|----------------------|
| 703,52 | 703,517 | fosfolípido, PE(33:1) (e.g. 1* 16:0 + 1*17:1) | PE |
| 1178,67 | 1178,661 | 2*GlcN, 2*P, 3* (OH)-14:0 | LA _{tri} |
| 1360,83 | 1360,828 | 2*GlcN, 2*P, 3* (OH)-14:0, 1* 12:0 | LA _{tetra} |
| 1404,86 | 1404,854 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0 | Lípido IVa |
| 1527,87 | 1527,863 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0, 1* P-EtN | |
| 1587,02 | 1587,021 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0, 1*12:0 | LA _{penta} |
| 1797,22 | 1797,219 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0, 1*12:0, 1* 14:0 | LA _{hexa} |
| 3813,75 | 3813,734 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 2*P | Glicoforoma I |
| 3893,72 | 3893,700 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P | Glicoforoma I |
| 3915,71 | 3915,699 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P, + 1*Na | Glicoforoma I |
| 3995,63 | 3995,653 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 1*Na | Glicoforoma I |
| 4017,66 | 4017,645 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 2*Na | Glicoforoma I |
| 4038,69 | 4038,697 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 5*P, 1*P-EtN + 1*Na | Glicoforoma I |
| 3927,68 | 3927,689 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 3*P + 1*Na | Glicoforoma IV |
| 4007,67 | 4007,655 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 4*P + 1*Na | Glicoforoma IV |
| 4029,64 | 4029,654 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 4*P + 2*Na | Glicoforoma IV |
| 4050,70 | 4050,698 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 3P+1 *P-EtN, + 1*Na | Glicoforoma IV |
| 4140,67 | 4140,722 | LA _{hexa} 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P, + 2*Na | Glicoforoma II |
| 4198,74 | 4198,735 | LA _{hexa} 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 1*Na | Glicoforoma II |
| 4220,73 | 4220,724 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 2*Na | Glicoforoma II |
| 4300,68 | 4300,698 | LA _{hexa} + 1 *GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 5*P, + 2*Na | Glicoforoma II |
| 4241,81 | 4241,778 | LA _{hexa} 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P, 1*P-EtN + 1*Na | Glicoforoma II |
| 4321,73 | 4321,745 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, 1*P-EtN | Glicoforoma II |

| | | | |
|---------|----------|---|---------------|
| 4343,74 | 4343,734 | + 1*Na LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, 1*P-EtN + 2*Na | Glicoforno II |
|---------|----------|---|---------------|

a. Los números de masa dados se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras que se dedujeron de los espectros de masas ESI FT-ICR de iones negativos de la fracción de LPS tras deconvolución de carga. b. Los picos de tipo negrita están marcados en la Figura 4 en texto. c. Abreviaturas: PE- fosfatidiletanolamina; GlcN- D-glucosamina; P- fosfato; P-EtN- fosfoetanolamina; Gal- D-galactosa; Glc- D-glucosa; Hep- L-glicero-D-mano-heptosa; KDO- 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosoato; Rha- ramnosa; GlcNAc- N-acetil-D-glucosamina; LA_{tri}, tetra, penta, hexa - estado de acilación del lípido A.

Los espectros tanto de BW30270 de tipo salvaje como de KPM25 exhibían patrones de picos similares y heterogeneidad dentro del rango de masa característico [\sim 3.900 a \sim 4.300 u] de los diferentes glicofornos del núcleo de LPS maduro de *E. coli* K-12 (véanse las Fig. 2A,C). Un pico relacionado con LPS en KPM22 tenía una masa molecular de 1.404,86 u, lo cual era consistente con la estructura del lípido A tetraacilado 1,4'- bisfosforilado (lípido IVa, masa calculada 1.404,854 u) (véase la Figura 2B).

El lípido IVa es un intermediario en la ruta del LPS que sirve como aceptor para la adición secuencial de dos residuos de KDO para formar KDO₂-lípido IVa, donde las aciltransferasas tardías LpxL y LpxM transfieren a continuación los ácidos grasos laurato y miristato, respectivamente, a KDO₂-lípido IVa para formar KDO₂-lípido A hexaacilado. Raetz y colaboradores han mostrado que las dos enzimas de *E. coli* exhiben un requerimiento de sustrato absoluto para KDO en el sustrato lipídico para la actividad (véase, v.g., K. A. Brozek, C. R. Raetz, J. Biol. Chem. 265, 15410 (1990)), lo que explica la falta de cadenas de acilo secundarias en el lípido A de KPM22.

Con objeto de abordar la localización subcelular del lípido IVa y de determinar si se transporta a la ME de KPM22, se usó centrifugación con gradiente de sacarosa discontinuo para separar la ME de la membrana interna (MI) (véase la Figura 3). Ambas membranas se resolvieron bien, aunque la ME para KPM22 no migraba tan lejos como la ME5 de tipo salvaje, lo que sugiere una disminución en la densidad flotante. Aparte de un aumento en la cantidad de proteínas porina de la ME (PME) (\sim 35 kDa) que quedaban localizadas en la MI a expensas de la acumulación en la ME, el contenido proteico total global y la constitución, según se analizó por SDS-PAGE, eran similares. Como se ha mostrado que muchas proteínas de la ME dependen de las propiedades de carabina molecular del LPS tanto para su plegamiento como para su función (véanse, v.g., H. de Cock, J. Tommassen, Embo J. 15, 5567 (1996); P. V. Bulieris, *et al.*, J. Biol. Chem. 278, 9092 (2003); K. Sen, H. Nikaido, J. Bacteriol. 173, 926 (1991)), la disminución en las PME puede reflejar una disminución en las velocidades de transporte de las proteínas y/o la eficacia de inserción en la ME de KPM22. Se estudiaron fracciones aisladas de ME en cuanto a la presencia de 3-hidroximiristato (3-OH C14:0), un marcador de ácido graso característico de LPS/lípido IVa. La ME del tipo salvaje y de KPM22 contenía 11,7 y 31,1 μ g de 3-OH C14:0 por mg de membrana seca, respectivamente, lo que sugiere que cantidades substanciales de lípido IVa al menos iguales a la cantidad de LPS en el tipo salvaje están de hecho presentes en la ME de KPM22. Además, la espectrometría de masas ESI FT-ICR reveló picos para el lípido IVa tanto en la ME como en la MI de KPM22, mientras que no se detectaron picos atribuibles al lípido IVa en ninguna de las fracciones de membrana del tipo salvaje. De manera colectiva, esto indica que, mientras que el lípido IVa es transportado a la ME de KPM22, la velocidad de transporte del lípido IVa se ha desacoplado de su velocidad de síntesis.

Las cadenas de acilo secundarias están implicadas en el mantenimiento de un bajo grado de fluidez en la ME mediante el aumento en el número de cadenas de acilo (véase, v.g., H. Nikaido, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 593 (2003)), una condición necesaria para la función. El estrecho empaquetamiento de las cadenas de acilo saturadas induce una red de interacciones hidrofóbicas que mantiene la integridad de la lámina externa de la ME a través de fuerzas de van der Waals. A pesar de contener sólo cuatro cadenas de acilo y ningún núcleo de sacárido interno, el lípido IVa es transportado a la ME y es entonces capaz de soportar su biogénesis en KPM22. La naturaleza sin precedentes de una capa de lípido IVa en la ME de KPM22 redefine la estructura necesaria del LPS para la viabilidad en Enterobacteriaceae.

KDO es normalmente considerado como un componente esencial de una capa de LPS funcional, ya que sólo se han construido hasta la fecha mutantes condicionales de las enzimas biosintéticas de KDO en *E. coli* (véanse, v.g., C. J. Belunis, *et al.*, J. Biol. Chem. 270, 27646 (1995); R. C. Goldman, W. E. Kohlbrenner, J. Bacteriol. 163, 256 (1985); P. D. Rick, M. J. Osborn, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 3756 (1972)). Esto ha sido atribuido al papel de KDO (y argumentablemente en parte a otros azúcares unidos distalmente a KDO) en el mantenimiento de un bajo grado de fluidez en la bicapa lipídica (véase, v.g., H. Nikaido, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 593 (2003)). Se piensa que cationes divalentes, a saber Mg²⁺ y Ca²⁺, forman puentes iónicos con las cargas negativas aportadas por el esqueleto del lípido A fosforilado y el carboxilato de KDO, minimizando la repulsión electrostática y promoviendo fuertes interacciones laterales. Además, la localización de KDO en la superficie de la ME sitúa a KDO en estrecha proximidad a las proteínas de la ME, muchas de las cuales dependen de las propiedades de carabina molecular del LPS que contiene núcleo tanto para su plegamiento como para su función (véanse, v.g., H. de Cock, J. Tommassen, Embo J. 15, 5567 (1996); P. V. Bulieris, *et al.*, J. Biol. Chem. 278, 9092 (2003); K. Sen, H. Nikaido, J. Bacteriol. 173, 926 (1991)).

Para verificar la naturaleza no esencial de KDO en KPM22, se alteraron los genes codificantes de la primera etapa realizada (*kdsA*) y de la última etapa (*waaA*) en la biosíntesis de KDO. Contrariamente a KPM22/KPM25 (Figura 1B, calles 8,9), ni el A5P exógeno ni la API llevada por plásmidos restauraban la síntesis de LPS maduro en KPM31/KPM40 (calles 12, 15) o KPM34/KPM42 (calles 11, 14), respectivamente, lo que es consistente con la capacidad de KPM22 para sobrevivir sin la totalidad de la ruta del KDO.

Se examinó la morfología celular de KPM22 por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En general, la estructura de KPM22 era bastante similar a la cepa parental (Figura 4). No se observaron defectos obvios de división por TEM y las células mantenían la forma normal de bacilo. Se discernían dos membranas claramente distintas para KPM22 (Figura 4D), así como una región entre las dos membranas que representaba el periplasma. El volumen periplásmico estaba uniformemente comprimido en comparación con el tipo salvaje. La inestabilidad de la ME venía sugerida por las pequeñas vesículas de membrana que aparecían en la superficie de KPM22 (Figura 4C). La formación de vesículas en la membrana externa (VME) puede haber estado causada por repulsión electrostática entre los fosfatos de 1,4'-GlcN de las moléculas próximas de lípido IVa que no resultan compensadas por interacciones estabilizadoras del núcleo de sacárido, aumentando la curvatura de la membrana y dando lugar a extrusión de vesículas desde la superficie bacteriana. La repulsión de cargas era particularmente relevante para KPM22 considerando que el análisis ESI-MS no detectó 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa y sólo detectó mínimas modificaciones de fosfoetanolamina, sirviendo ambas cosas para reducir la cantidad de carga negativa neta (véase, v.g., C. R. Raetz, C. Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635 (2002)).

Los mecanismos compensatorios en KPM22 para acomodar la pérdida en la integridad de la ME debido a la truncación extrema del LPS invocaban la estabilización con otros glicolípidos unidos a la ME. En un mutante deficiente en LPS de *N. meningitidis*, se reportó que la síntesis de polisacáridos capsulares se hizo absolutamente necesaria para la viabilidad (véase, v.g., P. van der Ley, L. Steeghs, *J. Endotoxin. Res.* 9, 124 (2003)). *E. coli* K-12 no sintetizaba un polisacárido capsular, pero hay otros dos polisacáridos en la superficie celular además del LPS, a saber, el exopolisacárido del limo inducido por estrés ácido colónico (antígeno M) (véase, v.g., A. Markovitz, en *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell* I. W. Sutherland, Ed. (Academic Press, Inc., New York, N. Y., 1977), vol. I, pp. 415-462) y el antígeno común enterobacteriano (ECA) unido a fosfoglicérido (véase, v.g., H. M. Kuhn, *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.* 4, 195 (1988)). No había diferencia en el nivel de metilpentosa no dializable (Figura 5A), un carbohidrato marcador constituyente del ácido colánico (véase, v.g., S. Gottesman, *et al.*, *J. Bacteriol.* 162, 1111 (1985)). El análisis de inmunotransferencia de lisados celulares reveló que la cantidad de ECA unido a glicerofosfatidilo estaba realmente disminuida en KPM22 (Figura 5B), lo cual es consistente con la desaparición del ECA cíclico que contiene cuatro unidades repetitivas de trisacárido (2429,89 u) del espectro de KPM22 del extracto de fenol (Figura 6). Por lo tanto, además de lípido IVa, la ME de KPM22 contenía niveles traza de ECA y niveles de tipo salvaje comparativamente bajos de ácido colánico. De manera colectiva, la envuelta de KPM22 representa el contenido en glicolípidos de la ME más mínimo reportado en *E. coli* capaz de mantener la viabilidad.

Una función principal de la capa de LPS es actuar como barrera de permeabilidad hacia la difusión tanto de grandes moléculas hidrofóbicas como de defensinas (péptidos policatiónicos) hacia el interior de la célula, así como retener los contenidos del compartimento periplásmico. Las fuertes interacciones laterales entre moléculas de LPS adyacentes en la ME hacen que la capa de LPS esté particularmente bien adaptada para dicha función, además de proporcionar una medida de defensa inespecífica contra las respuestas del huésped. Se consigue la permeación selectiva de pequeñas moléculas hidrofílicas, nutrientes y antibióticos a través de los canales proteicos de las porinas de la membrana externa (PME). Se cribó un panel de antibióticos y detergentes frente a KPM22 para calibrar la efectividad del lípido IVa como barrera de permeabilidad (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades de barrera de permeabilidad de KPM22 Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$)

| Compuesto | PM ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) | XlogP | BW30270 (mg ml^{-1}) | KPM22 (mg ml^{-1}) | Número de veces de diferencia |
|-------------------------------|---------------------------------------|-------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Rifampina | 822,9 | 3,72 | 16 | 0,03 | 512 |
| Ácido fusídico | 516,7 | 3,7 | 512 | 2 | 256 |
| Novobiocina | 612,6 | 2,74 | 256 | 1 | 256 |
| Eritromicina | 733,9 | 1,98 | 128 | 1 | 128 |
| Bacitracina ^a | 1.422,7 | -1,03 | 4.096 | 512 | 8 |
| Vancomicina | 1.449,3 | -0,47 | 256 | 32 | 8 |
| | | | | | |
| Kanamicina | | | 16 | 1 | 16 |
| Cloranfenicol | 323,1 | 1,476 | 8 | 2 | 4 |
| Ampicilina | 349,4 | 0,255 | 4 | 2 | 2 |
| Cefaloridina | 416,5 | 1,73 | 4 | 4 | 1 |
| | | | | | |
| Dodecilsulfato de sodio (SDS) | | | >32.000 | 8 | >4.000 |

| | | | | |
|---|--|--------|------|-----|
| Sales biliares ^b | | 16.000 | 128 | 125 |
| Polimixina E ^c | | 0,25 | 0,06 | 4 |
| ^a . 74.000 unidades/g. mezcla de colato y desoxicolato de sodio. | | | | |
| ^c . Colistina; 20.261 unidades/mg | | | | |

5 KPM22 era supersusceptible a una serie de grandes antibióticos hidrofóbicos que típicamente tienen una eficacia razonable sólo contra bacterias Gram-positivas. Teniendo normalmente denegado el acceso a sus sitios de acción por la ME, estos compuestos accedían a las dianas intracelulares en KPM22. El acceso a la superficie de la membrana no era impedido por el núcleo de sacárido, facilitándose aún más el reparto y la posterior permeación a través de la bicapa lipídica comprometida. Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de pequeños (< 600 Da) compuestos relativamente hidrofílicos que ganan paso a través de la ME primariamente mediante las PME estaba en el mejor de los casos sólo modestamente reducida. Una notable excepción era el aminoglicósido de carga positiva kanamicina. Se ha sugerido que los aminoglicósidos consiguen entrar primariamente gracias a un mecanismo autopromovido de captación que conlleva interacciones de emparejamiento de carga inicial con LPS independiente de las PME (véase, v.g., R. E. Hancock, *et al.*, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35, 1309 (1991)). KPM22 era particularmente sensible a los detergentes, con una disminución mayor de 4.000 veces en la CMI para el dodecilsulfato de sodio. Dado que la concentración de sales biliares (metabolitos del colesterol) en el tracto intestinal humano varía de 4 a 16 mM (~1650-6650 µg/ml) (véase, v.g., B. Borgstrom, *Acta Med. Scand.* 196, 1 (1974)), la ME comprometida de KPM22 ya no sería adecuada para proteger a la célula de su ambiente hospedador. Sorprendentemente, la CMI de la polimixina E (colistina), un péptido catiónico con un mecanismo de acción de tipo detergente, estaba deprimida sólo ~4 veces en KPM22. La acumulación de polimixinas en la superficie de la membrana hasta la concentración crítica de agregados es pertinente para formar lesiones micelares en la bicapa lamelar, que posteriormente actúan como canales para el transporte autopromovido a través de la ME (véase, v.g., A. Wiese *et al.*, *J. Membr. Biol.* 162, 127 (1998)). El lípido IVa tiene una razón reducida de carga a área superficial en comparación con el LPS, lo que resalta el papel de los residuos del núcleo interno de carga negativa en la unión de la polimixina. Como los antibióticos seleccionados tienen diversos mecanismos de acción, los cambios en las CMI entre compuestos hidrofóbicos son probablemente una consecuencia de cambios en la permeabilidad en lugar de un reflejo de la adecuación general o de los mecanismos de eflujo del fármaco. Las propiedades de permeabilidad de KPM22 demuestran el potencial de la inhibición de la biosíntesis de KDO como medio para ampliar el espectro de actividad de antibióticos que ya existen mediante reducción de la resistencia intrínseca de la barrera de la ME.

Las endotoxinas bacterianas son potentes moléculas proinflamatorias que provocan una respuesta inmune innata en humanos incluso cuando están presentes sólo en cantidades traza (véase, v.g., E. S. Van Amersfoort, *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 379 (2003)). El shock séptico inducido por bacterias Gram-negativas se produce como resultado de una respuesta inmune desequilibrada y mal regulada. En parte, esta cascada fisiopatológica se dispara por la activación de macrófagos por el LPS, los cuales a su vez segregan una serie de mediadores inflamatorios. Una de las primeras citoquinas liberadas por los macrófagos es la citoquina pleiotrópica TNF- α (factor de necrosis tumoral). El potencial endotóxico de las preparaciones de LPS fue medido usando un ensayo basado en ELISA para la secreción de hTNF- α por células mononucleares humanas estimuladas (Figura 7). Las preparaciones procedentes de KPM22 eran endotóxicamente inactivas a concentraciones de hasta 1 µg/ml, lo cual es consistente con estudios anteriores que utilizaban lípido IVa cromatográficamente purificado (véase, v.g., D. T. Golenbock, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 19490 (1991)). En *E. coli* y bacterias relacionadas, la inhibición de KDO no sólo aumentaba la susceptibilidad de las bacterias tanto a las respuestas del huésped como a los antibióticos, sino que también tiene el potencial de reducir el riesgo de sepsis al disminuir la carga de endotoxina.

El transportador de ABC de la membrana interna (cassette de unión de ATP) que voltea el LPS del citoplasma a la cara periplásmica de la MI es altamente selectivo para sustratos de LPS/lípido A hexaacilados *in vitro* (véanse, v.g., Zhou Zhou, Z., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273, 12466-12475 (1998); Doerrler, W. T., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277, 36697-36705 (2002)). MsbA fue originalmente identificado como un supresor multicopia de fenotipos sensibles a la temperatura LpxL (HtrB) (véase, v.g., Polissi, A., y Georgopoulos, C. *Mol. Microbiol.* 20, 1221-1233 (1998)). La complementación de la cepa auxotrófica TCM15 con una colección de cósmidos de ADN genómico de KPM22 reveló que MsbA era un supresor multicopia del fenotipo Δ Kdo. Se aislaron diecisiete clones de cósmidos independientes que contenían el locus *msbA*. Un subclón de cósmido (pMMW52), que contenía una inserción de 3,5 kb con sólo una secuencia *msbA* de tipo salvaje intacta idéntica al tipo salvaje era capaz de rescatar directamente TCM15 sin necesidad de desarrollar la(s) mutación(es) supresora(s) supuesta(s), como indican la pérdida de auxotrofia A5P y la restauración de la capacidad de formación de colonias en agar sólido (Tabla 5). El índice de crecimiento de TCM15(pMMW52) es similar a KPM22 (Tablas 2 y 5). Estos resultados indican que, aunque el lípido IVA es un sustrato pobre *in vitro* (véase Doerrler, W. T. y Raetz, C. R., *J. Biol. Chem.* 277, 36697-36705 (2002)), el lípido IVa se convierte en un sustrato para *MsbA in vivo* cuando está presente en grandes concentraciones por simple acción de masa.

Tabla 5. Supresión multicopia de la auxotrofia de TCM15 por MsbA

| Cepa | Unidades formadoras de colonias (ufc) ml ^{-1a} | | Crecimiento en medio LB líquido ^b | |
|-----------------------------|---|-----------------------------|--|-----------------------------|
| | Sólo LB | LB + A5P/G6P ^{c,d} | LB ^d | LB + A5P/G6P ^{c,d} |
| TCM15 | 0 | 8,7 × 10 ⁷ | | +++ (23) |
| TCM15 (pMBL19) ^e | 0 | 2,1 × 10 ⁶ | | +++ (22) |
| TCM15 (pMMW52) ^f | 4,4 × 10 ³ | 3,1 × 10 ⁵ | ++ (33) | +++ (23) |

^aLos valores de ufc corresponden a plaqueo directo (TCM15) o a poselectrotransformación; ^bDonde los tiempos de generación medibles (min.) a 37°C están indicados entre paréntesis; ^cASP 15 μM, G6P 10 μM. ^dSe incluyó Amp (100 μg ml⁻¹) para cepas portadoras de plásmido; ^eVector de clonación; ^fSubclón que contiene *msbA*.

Ejemplo II

5 Este ejemplo describe las cepas bacterianas, los plásmidos y los cebadores usados en los estudios que incluyen KPM22 y TCM15. En la Tabla 6, se indican las cepas bacterianas, los plásmidos y los cebadores usados en los estudios que incluyen KPM22 y TCM1 5.

10 Tabla 6. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores

| Cepa/ plásmido/ cebador | Descripción ^a | Fuente o referencia |
|-------------------------------|---|--|
| BW30270 | <i>E. coli</i> K-12 MG1655; <i>rph+</i> <i>fnr+</i> | <i>E. coli</i> Genetic Stock Center (CGSC#7925) |
| SL3749 | <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium (<i>rfaL446</i> , Ra quimiotipo de LPS) | <i>Salmonella</i> Genetic Stock Center (SGSC#228) |
| SL3750 | <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium (<i>rfaJ417</i> , Rb2 quimiotipo de LPS) | <i>Salmonella</i> Genetic Stock Center (SGSC#229) |
| SL3748 | <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium (<i>rfaI432</i> , Rb3 quimiotipo de LPS) | <i>Salmonella</i> Genetic Stock Center (SGSC#227) |
| SL3769 | <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium (<i>rfaG471</i> , Rdl quimiotipo de LPS) | <i>Salmonella</i> Genetic Stock Center (SGSC#231) |
| SL1102 | <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium (<i>rfaE543</i> , Re quimiotipo de LPS) | <i>Salmonella</i> Genetic Stock Center (SGSC#258) |
| TCM15 | BW30270(Δ <i>gutQ</i> Δ <i>kdsD</i>); A5P auxótrofo | T. C. Meredith y R. W. Woodard. J. Bacteriol, en imprenta, (2005) |
| KPM22 | TCM15 Derivado medio mínimo MOPS | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| KPM25 | KPM22 con pT7 <i>kdsD</i> | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| KPM31 | KPM22(Δ <i>kdsD</i>) | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| KPM34 | KPM31 con pT7 <i>kdsD</i> | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| KPM40 | KPM22(Δ <i>waaA</i>) | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| KPM42 | KPM40 con pT7 <i>kdsD</i> | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| PT7 <i>kdsD</i> | pT7-7 con <i>E. coli</i> K-12 <i>kdsD</i> ; Amp R | Experimentos realizados en el curso de la presente invención |
| P1 | GCTGCATTAATTAATCGACATTTT ACTCAAGATTAAGGCGATCCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO: 9) | T. C. Meredith y R. W. Woodard. J. Biol. Chem., 278, 32771 (2003) Invitrogen |
| P2 | GTCTTAACGCAGAACGCTAATACT TTATTTTCAAGCAAAAAAGAATT CCGGGGATCCGTCGACC (SEQ ID NO: 10) | Invitrogen |
| P3 | ACAGCTAAATACATAGAATCCCC AGCACATCCATAAGTCAGCTATTT ACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO: 11) | MWG Biotech |

P4 TAATGGGATCGAAAAGTACCCGGA
TAAATCGCCCCGTTTTTGCATAACA
ACCCATATGAATATCCTCCTTAG
(SEQ ID NO: 12)

MWG Biotech

^a. Las regiones de homología están subrayadas.

5 Todas las cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani estándar (10 g Triptona, 5 g Extracto de levadura, 10 g NaCl) o medio mínimo MOPS (véase, *v.g.*, F. C. Neidhardt, P. L. Bloch, D. F. Smith, J. Bacteriol. 119, 736 (1974)) con un 0,2% de glicerol como única fuente de carbono. La cepa de *E. coli* KPM22 fue usada como huésped para las alteraciones de los genes *kdsA* y *waaA* cromosómicos empleando el sistema de recombinasa Red del fago λ según el procedimiento de Datsenko y Wanner (véase, *v.g.*, K. A. Datsenko, B. L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6640 (2000)). Se utilizaron kanamicina y ampicilina a 15 μ g/ml y 100 μ g/ml, respectivamente. Se usaron los pares de cebadores P1/P2 con pKD13 (*kan*) o P3/P4 con pKD4 (*kan*) como plantillas para construir cassettes de inserción para KPM31 y KPM40, respectivamente. Se cortaron marcadores de resistencia a los antibióticos usando el sistema de recombinasa FLP como se ha descrito (véase, *v.g.*, K. A. Datsenko, B. L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6640 (2000)), excepto por curar todos los plásmidos a 37°C.

Ejemplo III

15 Este ejemplo describe el crecimiento de KPM22. El crecimiento de KPM22 conllevaba la división exponencial de los cultivos de TCM 15 en medio mínimo MOPS suplementado con 10 μ M de D-glucosa 6-fosfato y 15 μ M de D-arabinosa 5-fosfato a 37°C se diluyeron (1:200 v/v) en el mismo medio carente de los suplementos de azúcar fosfato. Tras un lapso inicial de 24-32 horas, se reanudó el crecimiento y se purificaron las colonias de los cultivos en placas de agar LB.

Ejemplo IV

25 Este ejemplo describe las determinaciones del índice de crecimiento para experimentos que incluían KPM22. Se cultivaron cultivos de una noche a 30°C y se usaron para inocular medio LB precalentado fresco (30°C, 37°C o 42°C) a una DO_{600 nm} igual a 0,05-0,1. Se monitorizó el crecimiento midiendo el cambio en la DO_{600 nm} y se diluyeron los cultivos a medida que la DO se aproximaba a ~0,7 para mantener el crecimiento exponencial. En la Tabla 7 se indican los tiempos de duplicación.

30 Tabla 7. Tiempos de generación en medio LB a diversas temperaturas

| Cepa | 30°C (min.) | 37°C (min.) | 42°C (min.) |
|---------|-------------|-------------|------------------|
| BW30270 | 39 | 24 | 22 |
| KPM22 | 55 | 38 | N/A ^a |
| KPM25 | 40 | 25 | 23 |

^a. Tras 2-3 generaciones, el índice de crecimiento era no exponencial.

Ejemplo V

35 Este ejemplo describe la purificación de LPS para experimentos que implican a KPM22 y TCM15. Se prepararon muestras rutinariamente cultivando 500 ml de cada cepa en medio LB a 37°C con aireación constante a 250 rpm. Se recogieron las células de cultivos en fase estacionaria por centrifugación (10 min., 8.000xg, 4°C), se lavaron en agua destilada y se volvieron a centrifugar. Se deshidrató la biomasa por tratamiento con etanol (95%), acetona y éter dietílico como se ha descrito previamente (véase, *v.g.*, U. Zähringer *et al.*, J. Biol. Chem. 279, 21046 (2004)). Se realizó el aislamiento del LPS por extracción de las células desecadas según el procedimiento de fenol-cloroformo-éter de petróleo (véase, *v.g.*, C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal, Eur. J. Biochem. 9, 245 (1969)). Se dializaron extensamente alícuotas del extracto fenólico bruto que había de ser analizado en cuanto a la composición de carbohidratos (Figura IA) frente a agua destilada (PMCO=1.000 Da) y se recogieron por liofilización. Se purificaron las muestras de LPS para el análisis de espectrometría de masas y la medición de la liberación de la citoquina TNF α humano a partir de la fase fenólica bruta por precipitación mediante adición gota a gota de agua. Se formó un precipitado floculento sólo para BW30270 y KPM25, el cual fue recogido por centrifugación y lavado sucesivamente con fenol al 80% y luego acetona. Se disolvieron los precipitados en agua y se dializaron por separado de su respectivo licor madre de la fase fenólica. Tras la liofilización, se resuspendieron las muestras en tampón (20 mM Tris-HCl, pH=7,5, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) y se trataron con ADNasa I (20 μ g/ml) y ARNasa A (20 μ g/ml) durante 8 horas a 37°C, seguido de proteinasa K (100 μ g/ml) durante 16 horas. Se recogieron las muestras de LPS por ultracentrifugación (SW 41 Ti rotor oscilante, 200.000xg, 2 horas, 15°C), se lavaron tres veces con agua destilada y se dializaron extensamente frente a agua antes de la liofilización. En la Tabla 8 se indican los rendimientos representativos de la purificación del LPS.

Tabla 8. Resumen de purificación del LPS

| Cepa | DO _{600 nm} final | Masa de la célula húmeda (g) | Masa de la célula desecada (g) | Ppt. ^a observado | Soluble en fenol (mg) | Ppt. LPS (mg) | Rendimiento purificado ^b (mg) | % Rendimiento ^c |
|---------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|--|----------------------------|
| BW30270 | 5,27 | 2,50 | 0,56 | + | 7,0 | 13,5 | 12,1 | 2,1 |
| KPM22 | 3,61 | 1,88 | 0,43 | - | 13,3 | N/A | 7,2 | 1,7 |
| KPM25 | 5,75 | 2,58 | 0,65 | + | 9,1 | 15,7 | 13,0 | 2,0 |

^a. Ppt.- precipitado. ^b. Tras tratamiento con ADNasa I/ARNasa A/proteinasa K. ^c. En base a la masa celular seca.

Ejemplo VI

Este ejemplo describe el análisis de la composición de carbohidratos para experimentos que implican a KPM22 y TCM15. El contenido en D-glucosamina (GlcN), 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosoato (KDO) y L-glicero-D-mano-heptosa (heptosa) de muestras de LPS del extracto fenólico bruto fue determinado usando ensayos químicos colorimétricos. Se determinó el contenido en GlcN por hidrólisis de las muestras de LPS (~1 mg) en 500 µl de HCl 4 M a 100°C durante 18 horas. Se cuantificó la GlcN liberada usando el ensayo de acetilaminoazúcares (véase, v.g., J. L. Strominger, J. T. Park, R. E. Thompson, J. Biol. Chem. 234, 3263 (1959)). Se midió el contenido en KDO usando el ensayo de ácido tiobarbitúrico adaptado para LPS (véase, v.g., Y. D. Karkhanis, J. Y. Zeltner, J. J. Jackson, D.J. Carlo, Anal. Biochem. 85, 595 (1978)), mientras que la cantidad de heptosa fue estimada usando el ensayo de cisteína-ácido sulfúrico modificado (véase, v.g., M. J. Osborn, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 50, 499 (1963)).

Ejemplo VII

Este ejemplo describe la electroforesis SDS-PAGE y las inmunotransferencias Lípido A/ECA para experimentos que implican a KPM22 y TCM15. Se analizaron los perfiles de LPS de lisados de células enteras por SDS-PAGE según el método de Hitchcock y Brown (véase, v.g., P. J. Hitchcock, T. M. Brown, J. Bacteriol. 154, 269 (1983)). Resumiendo, se rasparon colonias de cada muestra de placas de agar LB y se suspendieron a turbideces iguales en solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco. Se recogieron las pellas celulares lavadas por centrifugación, se añadió tampón de lisis (50 µl de Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0,002% de azul de bromofenol) y se calentaron las muestras en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Se añadió proteinasa K (25 µg, 10 µl de 2,5 mg/ml) a cada lisado de células enteras y se incubó durante 1 hora a 56°C. Se cargaron volúmenes idénticos en geles de SDS-PAGE al 13% y se trabajaron entonces a corriente constante (15 mA). Se tiñeron los geles con plata para el análisis de LPS (véase, v.g., P. J. Hitchcock, T. M. Brown, J. Bacteriol. 154, 269 (1983)), o se electrotransferieron a voltaje constante (26 V) de los geles a membranas de difluoruro de polivinilideno usando tampón Tris-glicina (20 mM Tris, 150 mM glicina, pH 8,3, 20% metanol) como se ha descrito (véase, v.g., H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 4350 (1979)). Antes de la incubación de las transferencias con mAb A6, que reconoce el esqueleto de disacárido de GlcN β-1,6-unido 1,4'-bisfosforilado no glicosilado del lípido A (véase, v.g., L. Brade, O. Hoist, H. Brade, Infect. Immun. 61, 4514 (1993)), se hirvieron las membranas durante 1 hora en ácido acético al 1% para escindir la unión α-2,6-KDO-GlcN antes de revelar por el procedimiento inmunológico habitual (véase, v.g., R. Pantophlet, L. Brade, H. Brade, J. Endotoxin Res. 4, 89 (1997)). Se usó lípido IVa sintético auténtico (compuesto 406) como patrón (véase, v.g., M. Imoto *et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan 60, 2197 (1987)). Se sondeó la inmunotransferencia del antígeno común enterobacteriano (ECA) usando mAb 898 (véase, v.g., H. Peters *et al.*, Infect. Immun. 50, 459 (1985)). Se incubaron las inmunotransferencias con IgG de cabra antirratón conjugada a fosfatasa alcalina (H+L) y se revelaron en presencia de nitroazul tetrazolio y substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato.

Ejemplo VIII

Este ejemplo describe la Espectrometría de Masas de Ciclotrón de Iones con Transformación de Fourier e Ionización por Electronebulización (ESI FT-ICR MS) usada en experimentos realizados en el curso de la presente invención. Se realizó la ESI FT-ICR MS en el modo de iones negativos utilizando un instrumento APEX II (Bruker Daltonics, Billerica, USA) equipado con un imán activamente blindado de 7 Teslas y una fuente de iones Apollo. Se adquirieron los espectros de masas usando secuencias experimentales estándar proporcionadas por el fabricante. Se disolvieron las muestras a una concentración de ~ 10 ng/µl en una mezcla 50:50:0.001 (v/v/v) de 2-propanol, agua y trietilamina y se pulverizaron a una velocidad de flujo de 2 µl/min. Se fijó el voltaje de la entrada capilar a 3,8 kV y la temperatura del gas seco a 150°C. Se realizó la deconvolución de carga de los espectros y los números de masa dados hacen referencia a masas monoisotópicas neutras. Se interpretaron las asignaciones de picos en base al análisis estructural detallado previamente publicado del LPS de *E. coli* K-12 cepa W3100 (véase, v.g., S. Müller-Loennies, B. Lindner, H. Brade, J. Biol. Chem. 278, 34090 (2003)). Sólo se resumen los iones más abundantes en la Tabla 9, ya que había algunas especies moleculares con picos isotópicos solapantes que no pudieron ser identificadas de manera inequívoca.

Tabla 9. Lista de picos ESI FT-ICR MS

| Masa obs. _{a,b} | Masa calc. _a | Composición química _c | Marcaje _c |
|--------------------------|-------------------------|--|----------------------|
| 703,52 | 703,517 | fosfolípido, PE (33:1) (c.g.1* 16:0 + 1*17: 1) | PE |
| 1178,67 | 1178,661 | 2*GlcN, 2*P, 3* (OH)-14:0 | LA _{tri} |
| 1360,83 | 1360,828 | 2*GlcN, 2*P, 3* (OH)-14:0, 1* 12:0 | LA _{tetra} |
| 1404,86 | 1404,854 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0 | Lípido IVa |
| 1527,87 | 1527,863 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0, 1* <i>P-EtN</i> | |
| 1587,02 | 1587,021 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0, 1* 12:0 | LA _{penta} |
| 1797,22 | 1797,219 | 2*GlcN, 2*P, 4* (OH)-14:0, 1* 12:0, 1* 14:0 | LA _{hexa} |
| 3813,75 | 3813,734 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 2*P | Glicoforno I |
| 3893,72 | 3893,700 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P | Glicoforno I |
| 3915,71 | 3915,699 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P, + 1*Na | Glicoforno I |
| 3995,63 | 3995,653 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 1*Na | Glicoforno I |
| 4017,66 | 4017,645 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 2*Na | Glicoforno I |
| 4038,69 | 4038,697 | LA _{hexa} + 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 5*P, 1* <i>P-EtN</i> + 1*Na | Glicoforno I |
| 3927,68 | 3927,689 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 3*P + 1*Na | Glicoforno IV |
| 4007,67 | 4007,655 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 4*P + 1*Na | Glicoforno IV |
| 4029,64 | 4029,654 | LA _{hexa} 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 4*P + 2*Na | Glicoforno IV |
| 4050,70 | 4050,698 | LA _{hexa} + 1*Gal, 2*Glc, 3*Hep, 1*Rha, 3*KDO, 3P + 1* <i>P-EtN</i> , + 1*Na | Glicoforno IV |
| 4140,67 | 4140,722 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P, +2*Na | Glicoforno II |
| 4198,74 | 4198,735 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 1*Na | Glicoforno II |
| 4220,73 | 4220,724 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, + 2*Na | Glicoforno II |
| 4300,68 | 4300,698 | LA _{hexa} 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 5*P, + 2*Na | Glicoforno II |
| 4241,81 | 4241,778 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 3*P, 1* <i>P-EtN</i> + 1*Na | Glicoforno II |
| 4321,73 | 4321,745 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, 1* <i>P-EtN</i> + 1*Na | Glicoforno II |
| 4343,74 | 4343,734 | LA _{hexa} + 1*GlcNAc, 1*Gal, 3*Glc, 4*Hep, 2*KDO, 4*P, 1* <i>P-EtN</i> + 2*Na | Glicoforno II |

a. Los números de masa dados hacen referencia a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras que se dedujeron de los espectros de masas ESI FT-ICR de iones negativos de la fracción de LPS tras la deconvolución de carga. b. Los picos de tipo negrita están marcados en la Figura 4 en texto. c. Abreviaturas: PE-fosfatidiletanolamina; GlcN- D-glucosamina; P-fosfato; *P-EtN*- fosfoetanolamina; Gal- D-galactosa; Glc- D-glucosa; Hep- *L-glicero-D-mano*-heptosa; KDO- 2-ceto-3-desoxi-*D-mano*-octulosonato; Rha- ramnosa; GlcNAc- *N*-acetil-D-glucosamina; LA_{tri}, tetra, penta, hexa - estado de acilación del lípido A.

Ejemplo IX

5 Este ejemplo describe la cuantificación de ácido colónico en experimentos que implican a KPM22 y TCM15. Se estimó el ácido colónico por medio de una modificación del método descrito por Kang y Markovitz (véase, v.g., S. Kang, A. Markovitz, J. Bacteriol. 93, 584 (1967)). Se rasparon colonias de placas de agar LB y se resuspendieron en 10 ml de agua destilada a turbideces idénticas (DO_{600 nm}), se sumergieron en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos para liberar los polisacáridos extracelulares y se aclararon por centrifugación (10 min., 8.000xg). Se estudió el sobrenadante en cuanto a metilpentosa (L-fucosa), un constituyente del ácido colónico, mediante una reacción colorimétrica específica usando L-fucosa auténtica como patrón (véase, v.g., Z. Dische, L. B. Shettles, J. Biol. Chem. 175, 595 (1948)). Se incluyó un aislado mucoso de BW30270 como control positivo.

Ejemplo X

20 Este ejemplo describe la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) empleada en experimentos realizados en el curso de la presente invención. Se fijaron cultivos de células que crecían en fase log inicial en medio LB a 37°C en tetraóxido de osmio al 2% durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces con agua destilada antes de incubarla con una solución de contraste de acetato de uranilo al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo las células 3 veces con agua destilada y se deshidrataron después con una serie de lavados con etanol a concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 90% y etanol abs. durante 15 min. cada uno a temperatura ambiente). Se bañaron dos veces las células deshidratadas en óxido de propileno durante 15 min. cada una a temperatura ambiente, seguido de impregnación en una mezcla de óxido de propileno/Epon (1:1,

v/v) por incubación durante la noche a 4°C. Se llevó a cabo entonces la polimerización durante la noche a 60°C. Se cortó el bloque en secciones ultrafinas (80-100 nm), se puso en rejillas y se contrastó en una solución de citrato de plomo. Se adquirieron imágenes en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-100 equipado con una pletina digital automatizada y una cámara digital de alta resolución Kodak 1.6 Megaplus.

Ejemplo XI

Este ejemplo describe las determinaciones de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) usadas en experimentos realizados en el curso de la presente invención. Los antibióticos utilizados eran de Sigma, a excepción de la cefaloridina, que fue obtenida de MicroSource Discovery Systems. Se escogieron los antibióticos en base a su modo variable de acción y de entrada en la célula. Se midieron las CMI de todos los antibióticos y fármacos estudiados en medio LB usando el método estándar de microdilución seriada tal como está descrito (véase, v.g., R. Vuorio, M. Vaara, *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 826 (1992)). Se rasparon las colonias de las placas de agar LB y se suspendieron en medio (~10⁴ células por ml) con concentraciones variables de antibióticos. Se incubaron los cultivos con agitación (~200 rpm) a 37°C durante 18 horas, en cuyo momento se puntuó el crecimiento por inspección visual. Se interpretaron los valores de CMI reportados como la concentración más baja de un fármaco que inhibía por completo el crecimiento.

Ejemplo XII

Este ejemplo describe un ensayo de citoquina TNF α humano usado en experimentos realizados en el curso de la presente invención. Se midieron las capacidades de inducción de citoquina factor de necrosis tumoral (TNF) α de las preparaciones de LPS aisladas como se ha descrito anteriormente sobre células mononucleares humanas (CMN) usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se resuspendieron las muestras de LPS en Solución Salina Equilibrada de Hanks mediante agitación vigorosa en vórtice y se envejecieron durante la noche a 4°C antes de someterlas a sonicación/agitación en vórtice inmediatamente antes de su uso. Se mezcló directamente sangre heparinizada extraída de donantes sanos con igual volumen de solución salina equilibrada de Hanks y se aisló por centrifugación en gradiente diferencial usando el sistema Leucosep con medio Lymphoprep de Greiner Bio-One según las instrucciones del fabricante. Se lavaron las CMN dos veces con RPMI 1640 (L-glutamina 3 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomomicina) y se transfirieron a placas de cultivo de 96 pocillos (7,5 x 10⁵ células/pocillo). Se realizó la estimulación de las CMN como se ha descrito previamente (véase, v.g., M. Mueller *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279, 26307 (2004)), y se guardó el sobrenadante a 4°C durante la noche. Se determinó la producción de hTNF α por un ELISA como describen Copeland, *et al.* (véase, v.g., S. Copeland, H. S. Warren, S. F. Lowry, S. E. Calvano, D. Remick, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 60 (2005)). Se recogieron los datos por duplicado en tres experimentos independientes con un conjunto de datos representativo indicado en la Figura 7.

Ejemplo XIII

Este ejemplo describe la construcción de la colección de cósmidos KPM22. Se construyó una colección de cósmidos a partir del ADN genómico de KPM22 por digestión parcial con *Sau3A*, ligación en SuperCos1 y empaquetamiento usando el extracto de empaquetamiento Gigapack III XL como describe el fabricante (Stratagene). Se preparó TCM15 para la infección con fagos por crecimiento en medio LB que contenía un 0,2% (p/v) de maltosa y 10 mM de MgSO₄, así como con un suplemento adicional de A5P y G6P. Se seleccionaron los transformantes para crecimiento en placas de LB carentes de fosfatos de azúcares suplementarios, junto con el marcador de resistencia a antibióticos del vector cósmido (100 μ g ml⁻¹ Amp). Se subclonaron los cósmidos por digestión parcial con *Sau3A*, seguida de ligación en el sitio *Bam*HI del vector de clonación pMBL19 de número medio de copias (véase, v.g., Nakano, Y., *et al.*, *Gene* 162, 157-158 (1995)).

Ejemplo XIV

Este ejemplo describe los materiales usados en experimentos que implican al gen *gutQ*. Los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen. Se compró ADN genómico de *E. coli* K-12 MG1655 a la American Type Culture Collection (ATCC 700926D). Se utilizó el kit de purificación de ADN Wizard de Promega para la purificación de plásmidos. Se usaron *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) y *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) químicamente competentes para albergar la expresión de plásmidos y proteínas, respectivamente. Se obtuvo la cepa BW30270 (*rph+*, *fnr+*), un derivado de *E. coli* K-12 MG1655, del *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC#7925). Se compraron los azúcares y los fosfatos de azúcares a Sigma-Aldrich, excepto para el 6-fosfato de D-glucitol, que fue preparado por reducción con tetraborohidruro de sodio del 6-fosfato de D-glucosa (véase, v.g., Bigham, E. C., *et al.*, (1984) *J Med Chem* 27, 717-26), purificado por cromatografía de intercambio aniónico (AG MP-1, Bio-Rad) y desalado por filtración por gel (Bio-Gel P-2, Bio-Rad). Se determinaron las concentraciones proteicas usando el Reactivo de Ensayo de Proteínas Bio-Rad con BSA como patrón.

Ejemplo XV

Este ejemplo describe la clonación, sobreexpresión y purificación del gen *gutQ*. Se amplificó el gen *gutQ* usando

metodología de PCR estándar con el par de cebadores F-R (Tabla 10), se restringió con *Nde* I y *Bam*H I y se ligó directamente en el vector de expresión pT7-7 linealizado similarmente restringido que había sido tratado con fosfatasa alcalina de ternera.

5

Tabla 10

Secuencias nucleotídicas de los cebadores

| Cebador | Secuencia (5'-3') |
|---------|---|
| F | (SEC. ID. N° 1) GGTGCTAGAAATTCATATGAGTGAAGCACTACTGAACG ^a |
| R | (SEC. ID. N° 2) GAATTCGGATCCAAGTTAAATAATCCCGGCCTGATAGAAATCCTGC ^b |
| GQF | (SEC. ID. N° 3) GATCGATGTGATCATAACCGGAGAGAGCAATGAGTGAAGCGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC |
| GQR | (SEC. ID. N° 4) CGGCTGGCGAAACGTCTGGGATTGAAGGATTAATAATCCATCCGGGGATCCCGT CGACC |
| KDF | (SEC. ID. N° 5) GCGATGTTGACTGGTTATCGCCAATACTCGTTGAATAACTGGAAACGCATTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTCG |
| KDR | (SEC. ID. N° 6) GCGACGCACCTGCTTGTCTCATTGTTGTTTATCCTGAATCTTACACTACGGATAT GAATATCCTCCTTAG |
| GDF | (SEC. ID. N° 7) ATGAATCAGGTTGCCGTTGTG |
| GDR | (SEC. ID. N° 8) CACCAGATTCACCTGTAGCG |

^a Sitio *Nde* I subrayado. ^b Sitio *Bam*H I subrayado.

10 Se usaron las mezclas de ligación para transformar células químicamente competentes de *E. coli* XL1-Blue, y se identificaron los transformantes que albergaban el plásmido pT7-gutQ por análisis de restricción y secuenciación de ADN. Se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con plásmido, se volvieron a comprobar por análisis de restricción y se guardaron a -80°C. Se cultivaron células de *E. coli* BL21 (DE3)/pT7-gutQ en medio YT 2x que contenía ampicilina (100 mg/l) a 37°C con agitación (250 rpm). Una vez que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento

15 medio-logarítmica (DO₆₀₀ ~ 0,7-0,9), se dejó que el cultivo se enfriara hasta 18°C antes de ser inducido con isopropil-β-D-tiogalactósido a una concentración final de 0,4 mM. Después de 16 horas de cultivo a 18°C, se recogieron las células por centrifugación (6.500 x g, 15 min., 4°C). Se suspendió la pella celular en 20 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM; DL-ditiotreitol (DTT) 1 mM; pH=8,0) y se sonicó entonces sobre hielo (5 x 30 segundos; pausas de 2 minutos entre pulsos). Se eliminaron los restos celulares por centrifugación (29.000 x g, 40 min., 4°C) y se filtró el sobrenadante a través de un filtro Millex[®] de 0,22 μM. Se cargó la solución en una columna de flujo rápido Hi Load[™] (16/10) Q Sepharose que había sido preequilibrada con tampón A. Se eluyó la proteína usando un gradiente de 0-900 mM de NaCl en tampón A a lo largo de 120 minutos. Se juntaron las fracciones que contenían primariamente proteína recombinante (~33 kDa) según se determinó por SDS-PAGE. Se añadió lentamente una solución saturada de sulfato de amonio con agitación a temperatura ambiente hasta alcanzar un 15% de saturación. Se aclaró la solución por centrifugación (29.000 x g, 30 min., 22°C) y se llevó el sobrenadante a una saturación del 30%. Se recogió la pella proteica por centrifugación (29.000 x g, 30 min., 22°C), se resuspendió en tampón A y se dializó frente a 2 l de tampón A durante la noche a 4°C. Las preparaciones eran más de ~95% homogéneas, según se juzgó por SDS-PAGE, con un rendimiento de 180 mg de gutQ/l de cultivo celular.

30 **Ejemplo XVI**

Este ejemplo describe los métodos de electroforesis en gel utilizados en experimentos realizados durante el curso de la presente invención. Se llevó a cabo SDS-PAGE sobre muestras proteicas (~5-10 μg) en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 12% y se tñieron con soluciones de azul brillante de Coomassie R250 al 0,25%. Se analizaron las muestras de LPS por tricina-SDS PAGE (concentración 4% T, 3% C; separación 16,5% T, 6% C) (véase, v.g., Lesse, A. J., *et al.*, (1990) J Immunol Methods 126, 109-17), y se visualizaron por tinción de plata (véase, v.g., Hitchcock, P. J. & Brown, T. M. (1983) J Bacteriol 154, 269-77).

40 **Ejemplo XVII**

Este ejemplo describe ensayos enzimáticos usados en experimentos realizados durante el curso de la presente invención. Se determinó la actividad API mediante el ensayo colorimétrico de cisteína-carbazol discontinuo (véase, v.g., Dische, Z., Borenfreund, E. (1951) J Biol Chem 192, 583-587) adaptado a microplacas de 96 pocillos como se ha descrito previamente (véase, v.g., Meredith, T. C. & Woodard, R. W. (2003) J Biol Chem 278, 32771-7). Todas las placas contenían patrones internos Ru5P y controles apropiados de A5P por triplicado. Se define una unidad de actividad enzimática como la conversión de 1 μmol de fosfato de azúcar por minuto a 37°C.

45

Se desarrolló un segundo ensayo acoplado más sensible para determinar la actividad API en extractos celulares

brutos que utilizaba 3-desoxi-D-*mano*-octulosonato 8-fosfato sintasa (*kdsA*) de *Arabidopsis thaliana*. Esta enzima cataliza la condensación estereoespecífica irreversible de A5P y PEP para formar 3-desoxi-D-*mano*-octulosonato 8-fosfato (KDO8P y fosfato inorgánico). Se incubaron mezclas de reacción que contenían 5 μ l de una solución de *kdsA* purificado (3 mg/ml; 10 U/mg), 10 mM de Ru5P5, 6 mM de PEP5 y 1 mM de EDTA en 40 μ l de Tris-HCl 100 mM (pH=8,25) durante 3 minutos a 37°C. Se inició la reacción por adición de 10 μ l de extracto celular. Al cabo de 5 minutos, se detuvieron las reacciones por adición de 50 μ l de ácido tricloroacético al 10% (p/v). Se determinó el KDO8P producido por el ensayo de peryodato-ácido tiobarbitúrico de Aminoff (véase, v.g., Sheflyan, G. Y., *et al.*, (1998) Journal of the American Chemical Society 120, 11027-11032). En estas condiciones, *kdsA* no era limitante de la velocidad en la formación de KDO8P.

Se midió la actividad D-glucitol 6-fosfato deshidrogenasa (*gutD*) usando un ensayo espectrofotométrico continuo monitorizando la formación de NADH a 340 nm. Se preincubaron soluciones de enzima (Tris-HCl 100 mM, pH=8,7, 5 mM de NAD⁺) a 25°C durante 2 minutos antes de iniciar las reacciones por adición de D-glucitol 6-fosfato a una concentración final de 20 mM.

Ejemplo XVIII

Este ejemplo describe la caracterización de *gutQ*. La caracterización de *gutQ* fue realizada de manera similar según los métodos reportados para *kdsD* (véase, v.g., Meredith, T. C. & Woodard, R. W. (2003) J Biol Chem 278, 32771-7). Resumiendo, para la especificidad de sustrato se diluyeron muestras de enzima en tampón Trizma-HCl 100 mM (pH=8,25) y se estudiaron iniciando la reacción con sustrato (*gutQ* 15 nM, azúcar 10 mM, EDTA 1 mM). Después de 10 minutos a 37°C, se detuvieron las reacciones que contenían los sustratos alternativos potenciales D-arabinosa, D-ribosa 5-fosfato, D-glucosa 6-fosfato (G6P), D-glucosa 1-fosfato, D-glucosamina 6-fosfato o D-manosa 6-fosfato y se determinó la presencia de cetosa. Se estudió la aparición de producto para D/L-gliceraldehído 3-fosfato, D-eritrosa 4-fosfato y D-fructosa 6-fosfato por RMN ³¹P. Se determinaron las constantes cinéticas a 37°C usando el ensayo en microplaca discontinuo y se iniciaron por adición de sustrato. Las concentraciones variaban típicamente de 0,2K_m a 10K_m. Después de 2 minutos, se detuvieron las reacciones (Tris-HCl 50 mM a pH=8,25, *gutQ* 5 nM, EDTA 1 mM), en cuyo punto se había consumido aproximadamente menos de un 10% de sustrato. Se determinaron las velocidades iniciales (v₀) por triplicado y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten estándar usando regresión no lineal de mínimos cuadrados para determinar los valores de K_m y k_{cat} tanto para la formación como para la desaparición de Ru5P. Se determinó la constante de equilibrio (K_{eq}) usando RMN ³¹P como se ha descrito para *kdsD* (véase, v.g., Meredith, T. C. & Woodard, R. W. (2003) J Biol Chem 278, 32771-7). Se determinó el pH óptimo de *gutQ* diluyendo la enzima en soluciones tampón BTP de valores de pH variables (pH=6,25 a 10, ajustado a 37°C). Se midió la actividad como se ha señalado anteriormente por triplicado con un tiempo de reacción de 3 minutos (BTP 100 mM, *gutQ* 15 nM, A5P 10 mM, EDTA 1 mM). Se diluyeron muestras de enzimas de *gutQ* según fue aislado en tampón Trizma-HCl 100 mM (pH=8,25) y se incubaron con diversos metales divalentes o EDTA durante 30 minutos a 4°C. Se estudió entonces la actividad que quedaba a 37°C en condiciones de saturación de sustrato por triplicado con un tiempo de reacción de 3 minutos (*gutQ* 15 nM, A5P 10 mM, metal o EDTA 10 μ M).

Ejemplo XIX

Este ejemplo describe las condiciones de construcción y crecimiento de cepas de *E. coli* para experimentos que implican a *gutQ*. Se usó *E. coli* cepa BW30270 como hospedador para las alteraciones de los genes *gutQ* y *kdsD* cromosomales empleando el sistema de recombinasa Red del fago λ según el procedimiento de Datsenko y Wanner (véase, v.g., Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-5). Se usaron kanamicina y cloranfenicol a 50 μ g/ml. Se usaron los pares de cebadores GQF-GQR y KDF-KDR con pKD13(*kan*) o pKD3(*cat*) como plantilla, respectivamente, para construir BW30270(Δ *gutQ::kan*) y B30270(Δ *kdsD::cat*), y se indican en la Tabla 10.

Se cortaron entonces los marcadores de resistencia usando el sistema de recombinasa FLP como se ha descrito (véase, v.g., Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-5). Se construyó BW30270(Δ *gutQ* Δ *kdsD*) de forma similar a partir de BW30270(Δ *kdsD*) utilizando la inserción del producto de PCR GQF-GQR, excepto por suplementar el medio y las placas en todo momento con G6P (10 μ M) y A5P (15 μ M) para las posteriores manipulaciones realizadas tras la electrotransformación. Se purificaron las colonias de todas las cepas empleadas, se estudiaron en cuanto a la pérdida de todas las resistencias a antibióticos y se secuenció el locus relevante para confirmar el sitio esperado de delección.

Se realizaron los cultivos en medio mínimo M9 (26) o en medio mínimo MOPS (véase, v.g., Neidhardt, F. C, Bloch, P. L. & Smith, D. F. (1974) J Bacterid 119, 736-47) suplementado con tiamina (1 μ g/ml) y la(s) fuente(s) de carbono indicada(s) a 37°C con agitación (250 rpm). Se suplementaron adicionalmente los cultivos de BW30270(Δ *gutQ* Δ *kdsD*) con G6P (10 μ M) y A5P (5-50 μ M). Se añadió ampicilina (100 μ g/ml) a aquellas cepas portadoras del plásmido pT7-7 (Amp^R).

Ejemplo XX

Este ejemplo describe la preparación de extractos celulares para los ensayos enzimáticos, el análisis del LPS y la RT-PCR. Se hicieron crecer cultivos de una noche en medio mínimo con glicerol (0,2%) como única fuente de carbono y los suplementos indicados. Se diluyeron los cultivos (1:20 v/v) en medio mínimo fresco y se agitaron durante dos horas a 37°C para dejar que las bacterias volvieran al crecimiento exponencial. Se preindujeron los cultivos de BW30270($\Delta gutQ \Delta kdsD$) durante este período para regular a más el sistema de transporte de la hexosa fosfato (*uhp*) por adición de A5P (5 μ M) y G6P (10 μ M). Se obtuvo una pella de células por centrifugación para eliminar las trazas de G6P (6.500 x g, 5 min., 22°C) y se inocularon entonces en medio fresco. Donde estaba indicado, se añadió D-glucitol 10 mM a los cultivos y se continuó con el crecimiento durante cuatro a seis horas adicionales para permitir la regulación a más del operón *gut*, en cuyo punto todos los cultivos se encontraban en crecimiento log precoz a medio. Se recogieron las células por centrifugación (6.500 x g, 5 min., 4°C). Se lavaron dos veces las fracciones que habían de ser estudiadas en cuanto a actividad API y *gutD* con una solución helada de NaCl al 1% y se resuspendieron luego en tampón (Tris-HCl 20 mM, DTT 1 mM, pH = 8,0). Se rompieron las células por sonicación, se aclararon por centrifugación (29.000 x g, 20 min., 4°C) y se congelaron. Se lavaron dos veces las pellas en tampón de lisis (Tris 200 mM (pH=6,8), 2% de SDS, 4% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol). Se procesaron números iguales de células en base a la $DO_{600\text{ nm}}$ según el método de Hitchcock y Brown (véase, v.g., Hitchcock, P. J. & Brown, T. M. (1983) J Bacterid 154, 269-77). Se resuspendieron rápidamente las pellas celulares para el análisis del ARN en reactivo de Potenciación Bacteriana Máx y se extrajeron usando TRIzol (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se purificaron además las muestras de ARN por digestión con ADNasa libre de ARNasa y se aislaron usando el minikit RNeasy (Qiagen). Se inspeccionó la calidad del ARN por electroforesis en agarosa y se cuantificó por absorbancia UV a 260 nm. Se realizó una RT-PCR cualitativa usando el sistema Superscript II One-Step RT-PCR (Invitrogen) tal como se indica con 1 pg de ARN total purificado como plantilla y cebadores GDF-GDR (0,2 μ M) para amplificar los primeros 342 pares de bases del gen *gutD*.

Ejemplo XXI

Este ejemplo describe la purificación y caracterización de *gutQ*. Se consiguió la purificación hasta alcanzar la homogeneidad en dos etapas usando cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose, seguida de precipitación con sulfato de amonio. La proteína aparecía como una única banda afilada de alto peso molecular por SDS-PAGE (~33 kDa) y la actividad específica era de 329 U/mg. Se determinó que las propiedades bioquímicas de *gutQ* eran similares a las de *kdsD*. Los parámetros cinéticos, los pH óptimos, la ausencia de requerimiento de cofactor y la estructura cuaternaria eran todos ellos comparables. Se estudiaron los monosacáridos que comparten funcionalidades comunes con A5P como substratos alternativos potenciales para *gutQ*. En el ensayo colorimétrico de cisteína-carbazol, las 2-cetohexosas y las 2-cetopentosas forman cromóforos rojo púrpura que absorben la luz a 540 nm (véase, v.g., Dische, Z., Borenfreund, E. (1951) J Biol Chem 192, 583-587). La conversión de aldosa en cetosa puede ser observada midiendo el aumento en la razón de la absorbancia a $A_{540\text{ nm}}$ de la muestra con respecto al control. Ninguno de los azúcares estudiados se convirtió en su respectiva forma de cetosa. Las aldosas fosforiladas de cadena corta D/L-gliceraldehído 3-fosfato y D-eritrosa 4-fosfato, así como la D-fructosa 6-fosfato, servían como substratos alternativos, según se determinó por RMN ^{31}P . Dentro de los límites de detección, se vio que *gutQ* es una aldol-cetol isomerasa de fosfoazúcares específica para A5P y Ru5P.

Ejemplo XXII

Este ejemplo demuestra que *gutQ* es capaz de sustentar la biosíntesis de lipopolisacárido. Con objeto de valorar la capacidad de *gutQ* para funcionar como una API *in vivo*, se construyeron BW30270($\Delta gutQ$) y BW30270 ($\Delta kdsD$) usando el sistema de recombinación homóloga λ Red (γ , β , *exo*) (véase, v.g., Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 6640-5). Ninguna de las mutaciones fue letal, señalizando la presencia de otros genes codificantes de API que pueden proporcionar cantidades suficientes de A5P necesarias para la biosíntesis esencial de LPS. Los geles de LPS indicaban cantidades prácticamente iguales del núcleo de LPS de K-12 de tipo salvaje independientemente de si el operón *gut* estaba inducido (véase la Figura 8A), lo que sugiere que la síntesis de A5P no era limitante de la velocidad en ninguna de las cepas en estas condiciones de crecimiento. Los niveles basales de *gutQ* en BW30270($\Delta kdsD$) eran adecuados para suministrar suficiente A5P para mantener la viabilidad y elaborar una capa funcional de LPS, lo que sugiere firmemente que *gutQ* funciona como una API en el interior de la célula.

Ejemplo XXIII

Este ejemplo describe la biosíntesis de LPS en la cepa Δ API BW30270($\Delta gutQ \Delta kdsD$). Se alteraron los genes *gutQ* y *kdsD* en BW30270 utilizando el transportador de hexosa fosfato inducible por G6P (*uhp*) para suministrar A5P exógeno. A5P es un substrato de gran afinidad, aunque no inducible, del sistema de transporte de la hexosa fosfato (*uhp*) (véanse, v.g., Kadner, R. J., Murphy, G. P. & Stephens, C. M. (1992) J Gen Microbiol 138 (Pt 10), 2007-14; Rick, P. D. & Osborn, M. J. (1972) Proc Natl Acad Sci U S A 69, 3756-60; Eidels, L., Rick, P. D., Stimler, N. P. & Osborn, M. J. (1974) J Bacterid 119, 138-43). Se usó medio mínimo MOPS, que tiene una baja concentración de fosfato inorgánico (1,3 mM), para prevenir la inhibición del transporte mediado por *uhp* por el fosfato inorgánico

(véase, *v.g.*, Shattuck-Eidens, D. M. & Kadner, R. J. (1981) *J Bacteriol* 148, 203-9). Se requería el sustrato natural del transportador *uhp*, G6P, para la inducción y el transporte eficientes de A5P hacia el interior de las células. A5P o G6P solo no era capaz de restaurar el crecimiento, ya que no había ningún crecimiento detectable en el curso temporal del estudio a menos que se incluyeran tanto A5P como G6P en el medio (véase la Figura 9A). Por lo tanto, *gutQ* y *kdsD* eran las únicas fuentes intracelulares de A5P para la síntesis de KDO. Se suplementaron los cultivos con A5P en el medio para permitir la biosíntesis de lipopolisacárido. Usando cultivos de una noche en los que se había agotado el A5P del medio como inoculante y tiempos prolongados de incubación, la cantidad de LPS maduro que se sintetizaba en BW30270($\Delta gutQ \Delta kdsD$) dependía de la cantidad de A5P incluido en el medio (Figura 9B).

10 Ejemplo XXIV

Este ejemplo describe la expresión del operón *gut*. Se cultivaron BW30270, BW30270($\Delta gutQ$) y BW30270(pT7-*gutQ*) en medio mínimo M9 que contenía fuentes dobles de carbono, D-glucosa y D-glucitol. Las tres cepas crecieron todas ellas a ritmos prácticamente idénticos y exhibían el tiempo de retraso diaúxico inusualmente largo característico de aproximadamente 40 minutos tras haberse consumido la D-glucosa del medio (véase, *v.g.*, Lengeler, J. & Lin, E. C. (1972) *J Bacteriol* 112, 840-8). En estas condiciones, la inducción no estaba influenciada por *gutQ*. Se cultivaron las cepas BW30270, BW30270($\Delta gutQ$) y BW30270($\Delta kdsD$) en medio mínimo M9 con glicerol como fuente de carbono. El glicerol es una fuente de carbono de clase B y no causa represión de catabolitos significativa (véase, *v.g.*, Lengeler, J. W. (1986) *Methods Enzymol* 125, 473-85), facilitando la inducción del operón *gut* por el D-glucitol a través de niveles elevados de AMPc. Se midieron las actividades específicas totales de API (*kdsD* y/o *gutQ*) y *gutD* en las tres cepas (Tabla 11).

Tabla 11

25 Actividad específica de *gutD* y API en extractos celulares

| Cepas de <i>E. coli</i> ^a | Glucitol ^b | Actividad <i>gutD</i> ^c | Actividad API ^{c,d} |
|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------|
| WT | - | >1 | 14 ± 3 |
| | + | 242 ± 14 | 48 ± 5 |
| $\Delta gutQ$ | - | >1 | 13 ± 2 |
| | + | 374 ± 13 | 15 ± 2 |
| $\Delta kdsD$ | - | >1 | 2 ± 1 |
| | + | 581 ± 48 | 46 ± 5 |
| pT7- <i>gutQ</i> | - | >1 | 2.573 ± 78 |
| | + | 323 ± 28 | 2.457 ± 117 |

^a Se cultivaron las cepas en medio mínimo M9 con un 0,2% de glicerol como fuente de carbono. ^b Se añadió D-glucitol a 10 mM a los cultivos cuando estuviese indicado (+) 4 horas antes de la recogida. Actividad específica dada en nmoles/min./mg. ^c Los valores incluyen la actividad de *kdsD* y/o *gutQ*.

Los operones *gut* de BW30270($\Delta gutQ$) y BW30270($\Delta kdsD$) permanecían inducibles, con sólo una diferencia del doble en el grado de inducción estimado por la actividad de *gutD* en comparación con la cepa BW30270 parental. Los niveles de actividad API total aumentaron en BW30270 y BW30270($\Delta kdsD$) cuando se añadió D-glucitol al medio, lo que indica que *gutQ* es regulado a más junto con *gutD*. No hubo cambio en los niveles observados de API en BW30270($\Delta gutQ$) al añadir D-glucitol, aunque la cepa sigue siendo capaz de regular a más *gutD*. Una mayoría de la actividad API era atribuible a *kdsD* en medio carente de D-glucitol, lo que confirma la identificación de *kdsD* como la enzima biosintética de LPS constitutivamente expresada. Se usó BW30270(pT7-*gutQ*) para investigar el efecto de los niveles elevados de API sobre el operón *gut* (Tabla 10). Los niveles basales de API estaban aumentados ~250 veces en BW30270(pT7-*gutQ*), aunque no se observó diferencia apreciable en los niveles de *gutD*, ya que el operón permanecía reprimido a menos que aportara D-glucitol al medio.

40 Ejemplo XXV

Este ejemplo muestra que A5P es importante para la regulación a más del operón *gut*. Como no se observó ninguna diferencia en la regulación cuando se alteró un solo gen API, el fallo en observar directamente el fenotipo puede haberse debido a supresión por la segunda copia de API. Se investigó la inducibilidad del operón *gut* en BW30270($\Delta gutQ \Delta kdsD$). Se realizaron cultivos de una noche en medio mínimo MOPS (0,2% de glicerol, A5P 15 μ M, G6P 10 μ M) y se diluyeron en medio fresco (0,2% de glicerol, A5P 5 μ M, G6P 10 μ M) para devolver las células al crecimiento exponencial. Después de 2 horas de agitación, se recogieron las células y se usaron para inocular medio que contenía sólo glicerol y A5P. Dado que las células fueron preinducidas para los genes transportadores *uhp*, no se añadió G6P. Se escogieron dos concentraciones de A5P (5 y 50 μ M), de tal forma que las diferencias en el nivel de LPS y los ritmos de crecimiento fueran mínimas en el curso temporal del estudio. A 50 μ M de A5P, *gutD* permanecía inducible hasta casi los niveles del tipo salvaje (Tabla 12).

Tabla 12

Actividad específica de gutD y gutQ³²¹ en extractos celulares Δ API

| Cepas de <i>E. coli</i> ^a | Glucitol ^b | A5P (μ M) | Actividad gutD ^c | Actividad gutQ ^c |
|---|-----------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Δ gutQ Δ kdsD | - | 50 | >1 | N.D. ^d |
| | + | 50 | 278 \pm 33 | N.D. ^d |
| | - | 5 | >1 | N.D. ^d |
| | + | 5 | 9,8 \pm 1 | N.D. ^d |
| Δ gutQ Δ kdsD pT7-gutQ | - | 5 | >1 | 1.366 \pm 180 |
| | + | 5 | 356 \pm 27 | 976 \pm 101 |

^a Se cultivaron las cepas en medio mínimo MOPS con un 0,2% de glicerol y se preindujeron con 10 μ M de G6P/5 μ M de A5P. ^b Se añadió D-glucitol a 10 mM a los cultivos cuando estuviere indicado (+) 4 horas antes de la recogida. ^c Actividad específica dada en nmoles/min./mg. ^d N.D.= no se detecta actividad.

5 El propio producto proteico gutQ no era necesario para la expresión. Cuando se redujo la concentración de A5P a 5 μ M, se produjo una disminución marcada y reproducible en la actividad gutD en las células cultivadas con D-glucitol. El nivel de LPS, sin embargo, estaba sólo ligeramente reducido en comparación (Figura 9C). Esto indicaba una
10 correlación directa entre los niveles de A5P y la cantidad de gutD, y que la diferencia no se debía a la consecuencia de efectos pleiotrópicos resultantes de una capa de LPS agotada. El análisis del nivel de expresión del gen gutD indicaba que la disminución en la actividad específica medida de gutD guardaba correlación con la cantidad de ARNm (Figura 9D). El operón *gut* permanecía inducible en las mismas condiciones de crecimiento cuando se complementó con un plásmido codificante de gutQ.

15 Ejemplo XXVI

Este ejemplo muestra que el gen *msbA*, cuando se sobreexpresa, permite a las células bacterianas *E. coli* Δ KDO crecer en agar sin suplementación del medio con D-arabinosa 5-fosfato.

20 *MsbA* fue originalmente identificado como un supresor multicopia de fenotipos sensibles a temperatura LpxL (HtrB) (Polissi *et al.*, 1996, Mol. Microbiol. 20: 1221-1233). La complementación de la cepa auxotrófica TCM15 (*E. coli*) con una colección de cósmidos de ADN genómico de KPM22 reveló que *msbA* era un supresor multicopia del fenotipo Δ Kdo. Se aislaron diecisiete clones de cósmidos independientes que contenían el locus *msbA*. Un subclón de cósmido (pMMW52), que contenía una inserción de 3,5 kb con sólo una secuencia *msbA* de tipo salvaje intacta
25 idéntica al tipo salvaje, era capaz de rescatar directamente TCM15, como se juzgó por la pérdida de auxotrofia A5P y por la restauración de la capacidad formadora de colonias en agar sólido. La velocidad de crecimiento de TCM15 (pMMW52) es sorprendentemente similar a la cepa KPM22 de *E. coli* (Meredith *et al.*, 2006, ACS Chem. Biol. 1:33-42).

30 Aunque la invención ha sido descrita en relación a realizaciones preferidas específicas, habría que entender que la invención tal como se reivindica no debería limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas.

Lista de secuencias

35 <110> El Consejo de Rectores de la Universidad de Michigan

<120> Bacterias Gram-negativas viables no tóxicas

<130> UNIG104PEP

40

<140> 07 718 326.7

<141> 19-01-2007

<150> PCT/US 07/001367

45

<151> 19-01-2007

<150> US 60/760.314

<151> 19-01-2006

50

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 589 314 T3

<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 1
ggtgctagaa tcatatgag tgaagcacta ctgaacg 37

10 <210> 2
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

<400> 2
gaattcggat ccaagttaa taatcccggc ctgatagaaa tcttgc 46

20 <210> 3
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

30 <400> 3
gatcgtgtg atcataaccg gagagagcaa tgagtgaagc gtgtaggctg gagctgctc 60

35 <210> 4
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<400> 4
cggctggcga aacgtctggg attgaaggat taaataatcc attccgggga tccgtcgacc 60

45 <210> 5
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintética

<400> 5
gcgatgttgt actggttatc gccaaactc gttgaataac tggaaacgca ttgtgtaggc 60
tggagctgct tcg 73

55 <210> 6
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sintética

ES 2 589 314 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <400> 6 | |
| | gcgagcgacc tgctttgctc attggtgttt atccttgaat ctttacacta cggatatgaa | 60 |
| | tatcctcctt ag | 72 |
| 5 | <210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> Sintética | |
| | <400> 7 atgaatcagg tgccggtgt c 21 | |
| 15 | <210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> Sintética | |
| | <400> 8 caccagattc acctgtagcg 20 | |
| | <210> 9 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> Sintética | |
| 35 | <400> 9 | |
| | gctgcattaa ttaatcgaca ttttactcaa gattaaggcg atcctgtgta ggctggagct | 60 |
| | gcttc | 65 |
| 40 | <210> 10 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> Sintética | |
| | <400> 10 | |
| | gtcttaacgc agaacgctaa tactttatctt ttcaagcaaa aaagaattcc ggggatccgt | 60 |
| | cgacc | 65 |
| 50 | <210> 11 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> Sintética | |
| | <400> 11 | |

ES 2 589 314 T3

| | | |
|----|---|----|
| | acagctaaat acatagaatc cccagcacat ccataagtca gctatttact gtgtaggctg | 60 |
| | gagctgcttc | 70 |
| 5 | <210> 12 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> Sintética | |
| | <400> 12 | |
| | taatgggatc gaaagtacc cggataaatcg cccgtttttg cataacaacc catatgaata | 60 |
| 15 | tcctccttag | 70 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa mutante bacteriana Gram-negativa no condicional viable que puede crecer y dividirse con una ruta biosintética de KDO₂-Lípido IV_A mutada que da lugar a alteración de dicha ruta y a deficiencia en lipopolisacáridos en la membrana externa, donde dicha cepa mutante bacteriana carece de KDO y exhibe Lípido IV_A en la membrana externa.
- 10 2. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, donde dicha alteración en la ruta biosintética de KDO₂-Lípido IV_A está causada por al menos una mutación en un gen seleccionado entre el grupo consistente en *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB* y *waaA*.
- 15 3. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, que tiene una mutación que elimina la asociación entre KDO₂ y el Lípido IV_A.
- 15 4. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, donde dicha alteración en la ruta biosintética de KDO₂-Lípido IV_A está causada por al menos una mutación en un gen seleccionado entre el grupo consistente en *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB* y *waaA*, y dicha cepa tiene además una mutación en un gen seleccionado entre *msbA* o *yjH*D.
- 20 5. La cepa bacteriana de la reivindicación 4, donde dicha cepa tiene además una mutación en un gen *lpxM*.
- 20 6. La cepa bacteriana de la reivindicación 2, que además tiene una mutación en *msbA*.
- 20 7. La cepa bacteriana de la reivindicación 2, que además tiene una mutación en *yjH*D.
- 25 8. La cepa bacteriana de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que además tiene una mutación en un gen *lpxM*.
- 30 9. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, donde dicha cepa es seleccionada entre el grupo consistente en *Escherichia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Legionella spp.*, *Corynebacteria spp.*, *Citrobacterspp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.* y *Vibrio spp.*
- 30 10. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, donde dicha cepa es seleccionada entre *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.* y *Pseudomonas spp.*
- 35 11. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, donde dicha cepa es *E. coli*.
- 40 12. Una composición que incluye la membrana externa de la cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 40 13. Una composición para uso en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto, que incluye la membrana externa de la cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 45 14. Una composición para uso en la inmunización de un sujeto en riesgo de adquirir una afección, que incluye la membrana externa de la cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde dicha afección es
- 45 i) shock séptico, donde dicha bacteria Gram-negativa es *E. coli*, o
- 45 ii) fiebres entéricas, donde dicha bacteria Gram-negativa es una *Salmonella spp.*
- 50 15. Un método de producción de Lípido IV_A, consistente en extraer Lípido IV_A de la cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 50 16. Un método de cribado para un agente antipirogénico, consistente en el uso de una cepa bacteriana según las reivindicaciones 1-11.

FIGURA 1

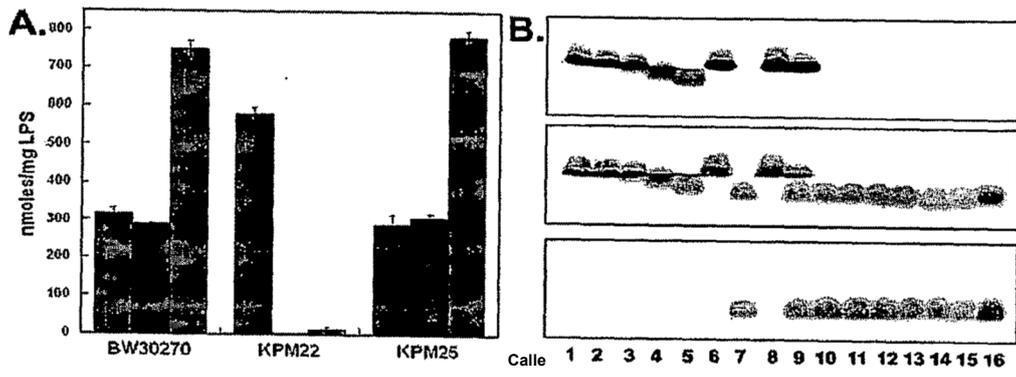


FIGURA 2

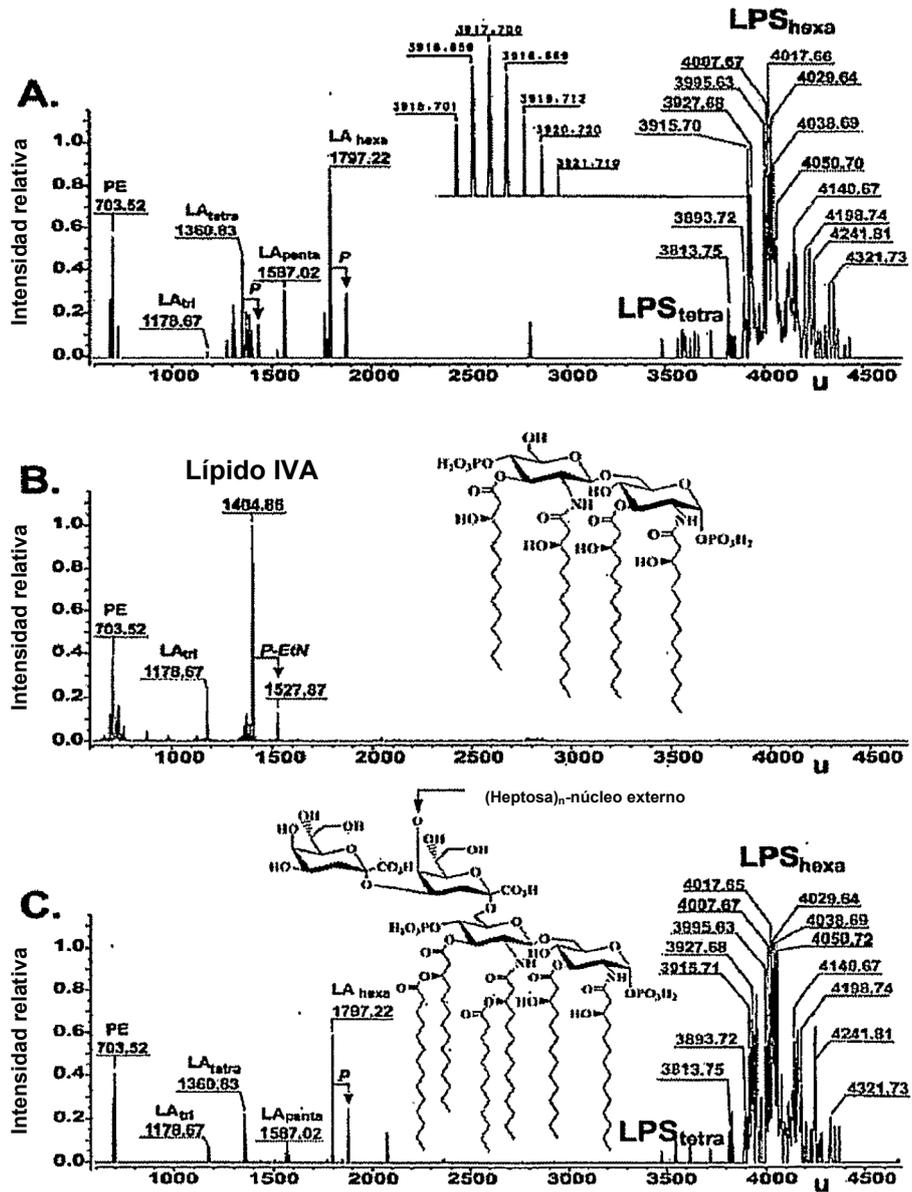


FIGURA 3

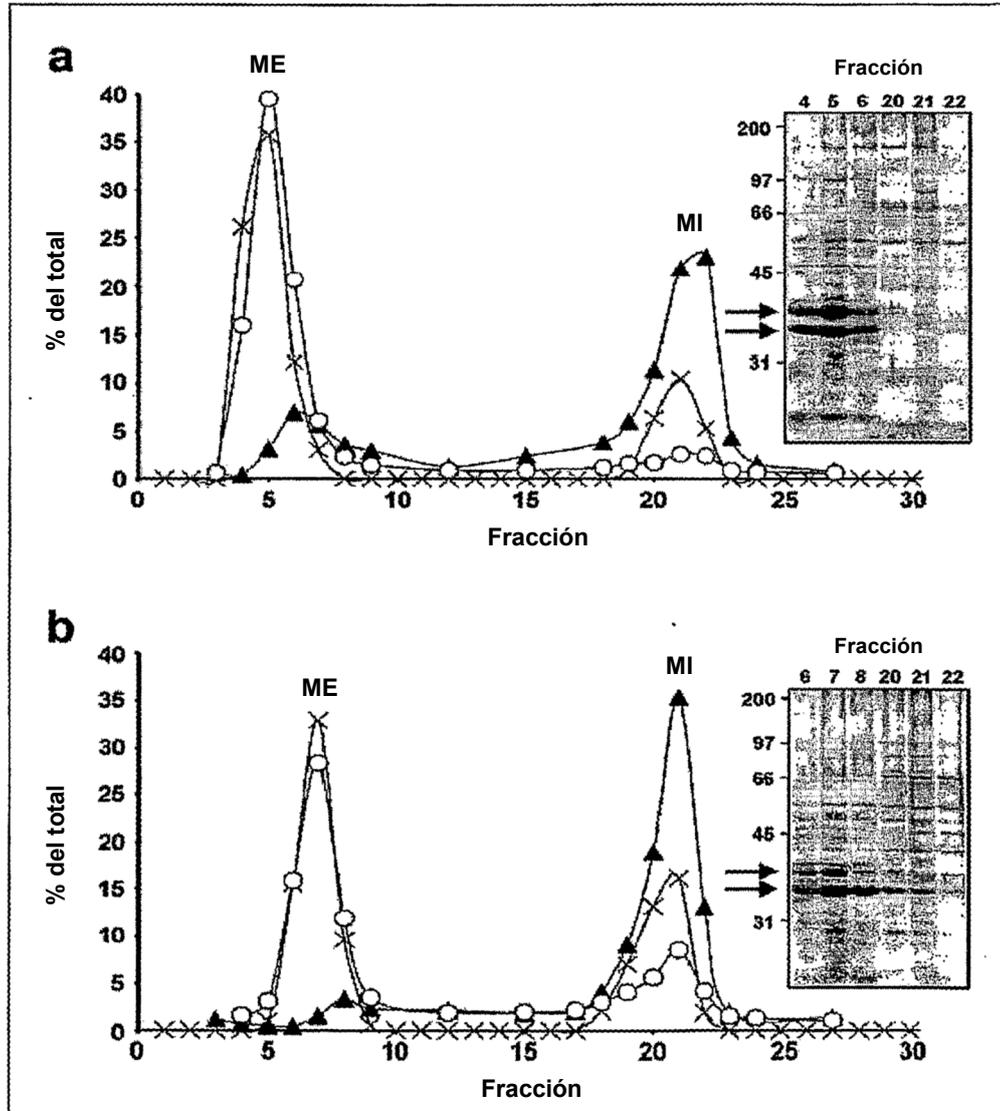


FIGURA 4

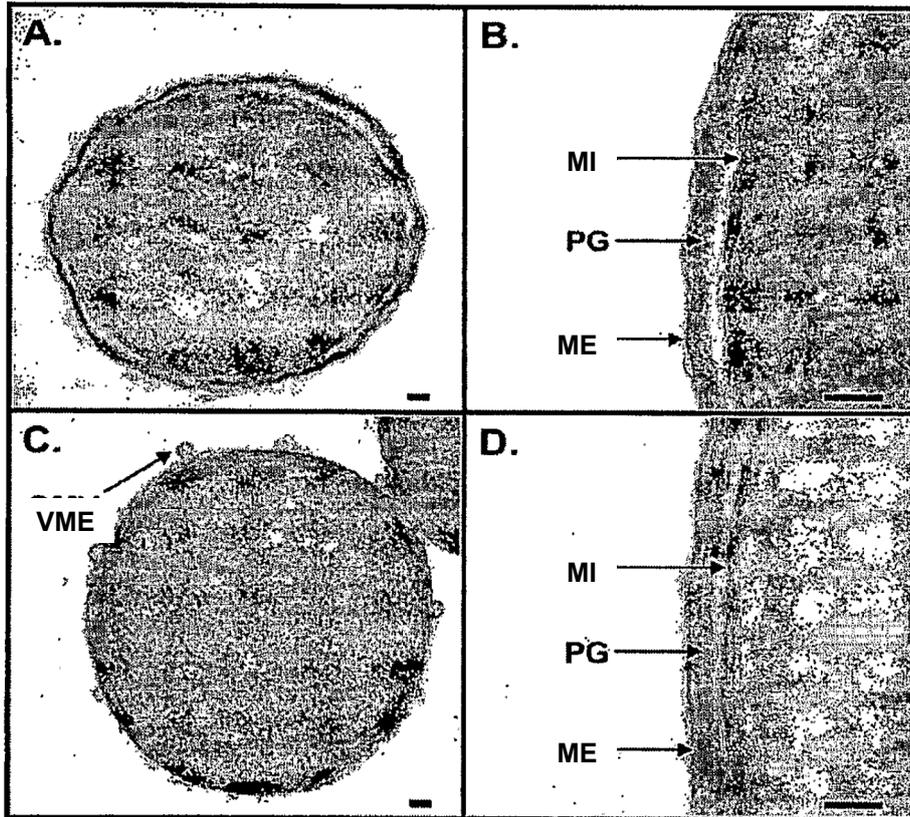


FIGURA 5

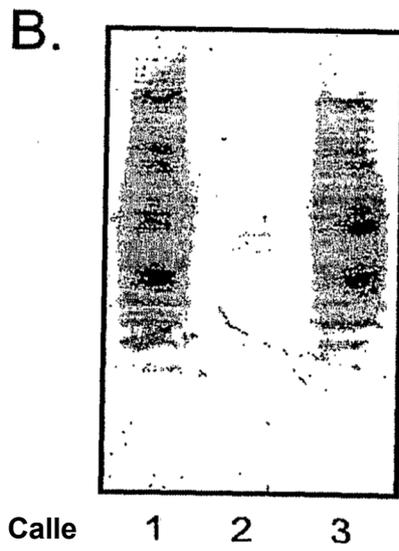
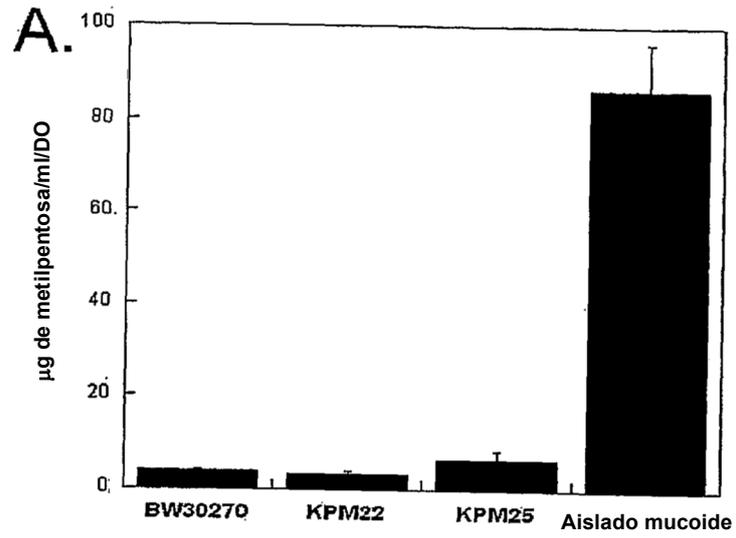


FIGURA 6

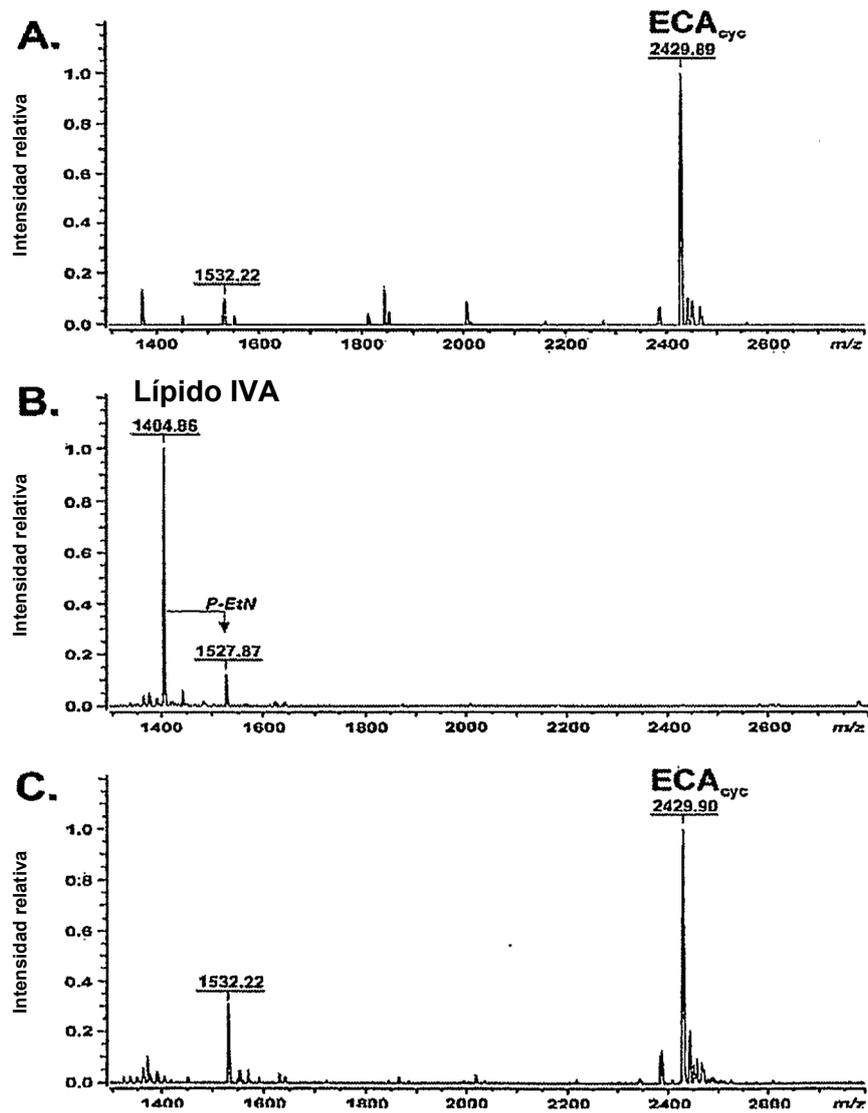


FIGURA 7

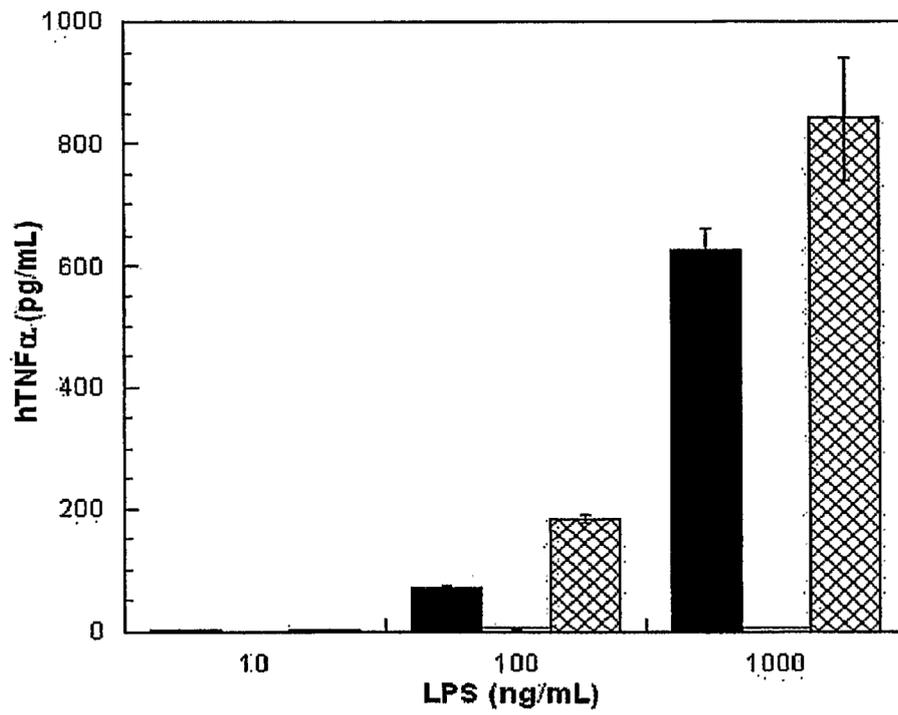
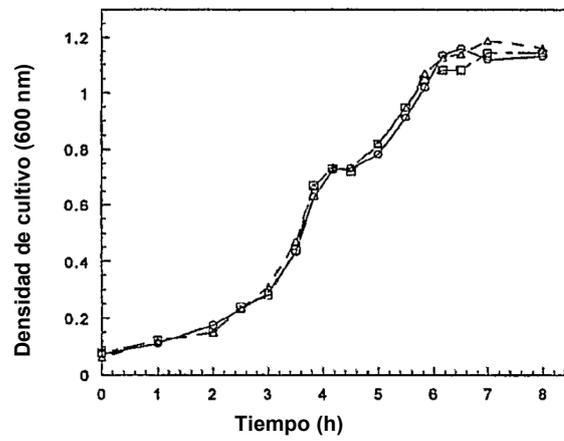


FIGURA 8

A.



B.

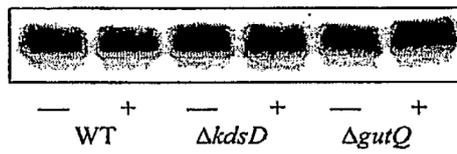


FIGURA 9

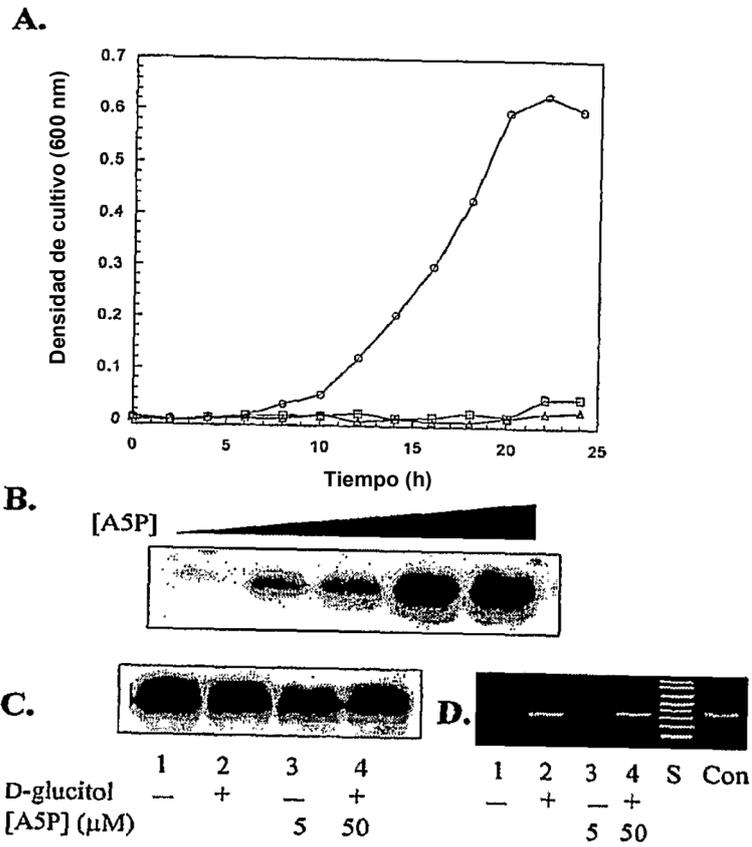


FIGURA 10

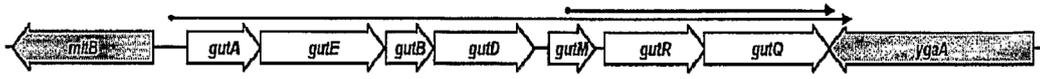


FIGURA 11

