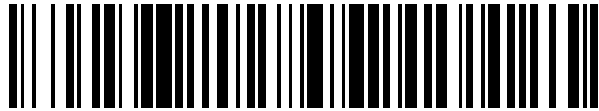


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 833**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011 PCT/US2011/028204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO2011113003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11754213 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2545162**

54 Título: **Bacterias gramnegativas viables que carecen en la membrana externa de agonistas del TLR4/MD-2**

30 Prioridad:

12.03.2010 US 313562 P

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

10.05.2017

73 Titular/es:

**RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES,
INC. (100.0%)**

**6440 N. Swan Road, Suite 200
Tucson, AZ 85718, US**

72 Inventor/es:

**BRAMHILL, DAVID y
MAMAT, UWE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 611 833 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 gramnegativas viables que carecen en la membrana externa de agonistas del TLR4/MD-2

5 **Referencia cruzada**

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. con Número de Serie 61/313.562, presentada el 12 de marzo de 2010.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a bacterias gramnegativas que carecen sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD-2. La presente invención también se refiere a métodos que utilizan dichas bacterias gramnegativas.

15

Antecedentes de la invención

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente asociado a la superficie de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, y está asociado a un conjunto de actividades patológicas y fisiológicas en las respuestas inmunitarias de hospedadores mamíferos. La toxicidad mediada por el LPS causada por estas bacterias generalmente es debida al lípido A, la fracción hidrófoba del LPS, que puede funcionar como un agonista del receptor de tipo Toll 4 (TLR4)/MD-2. El lípido A comprende dos residuos de glucosamina con seis cadenas de acilo unidas.

25 El Kdo (3-desoxi-D-mano-octulosonato) se considera que es un componente esencial del LPS, y se cree que la estructura mínima de LPS necesaria para el crecimiento de *E. coli* es de dos residuos de Kdo unidos al lípido A (Kdo₂-lípido A). La biosíntesis del Kdo comienza con la API (isomerasa del 5-fosfato de D-arabinosa), que convierte el 5-fosfato de D-ribulosa (Ru5P) en A5P (5-fosfato de D-arabinosa). En la *E. coli* K-12, hay dos genes de la API, *kdsD* y *gutQ*. Después, el A5P se condensa con fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 8-fosfato de Kdo (Kdo8P), que a continuación es hidrolizado formando el Kdo. El Kdo es activado a continuación en forma del nucleótido de azúcar CMP-Kdo, que finalmente es transferido al lípido IV_a que forma el Kdo₂-lípido IV_a. Las aciltransferasas dependientes del Kdo, LpxL y LpxM, transfieren laurato y miristato, respectivamente, al Kdo₂-lípido IV_a para formar el Kdo₂-lípido A.

35 La cepa de *E. coli* K-12 TCM15, que tiene deletados ambos genes de la API (*kdsD* y *gutQ*) y por lo tanto carece del Kdo, no es viable salvo que se le suministre A5P exógeno (por ejemplo, véase Meredith y Woodard, Identification of GutQ from *Escherichia coli* as a D-arabinose 5-phosphate isomerase, J Bacteriol 187: 6938, 2005). La presente invención presenta bacterias gramnegativas viables que carecen sustancialmente de un ligando que actúe como un agonista del TLR4/MD-2. Puede encontrarse información adicional relativa al TLR4/MD-2, por ejemplo, en Qureshi *et al.*, J. Exp. Med., Vol. 189, nº 4, 15 de febrero de 1999, páginas 615-625; en Shimazu *et al.*, J. Exp. Med., Volumen 189, número 11, 7 de junio de 1999, páginas 1777-1782; en Poltorak *et al.*, Science 282, 2085 (1998). El ligando puede comprender, por ejemplo, el lípido A o un 6-acil lípido. Las bacterias gramnegativas viables comprenden mutaciones supresoras, que permiten la viabilidad a pesar de carecer del por lo demás esencial Kdo. Mama *et al.* han descrito mutaciones supresoras en los genes *yhjD* y *msbA* no condicionales de derivados de la *E. coli* TCM15 (véase Mol Microbiol 67 (3): 633, 2008). El documento WO2007/084633 describe bacterias gramnegativas viables que carecen sustancialmente de LPS en la membrana externa.

Las ventajas y los aspectos de la presente invención serán evidentes en la siguiente descripción detallada y en las reivindicaciones.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención presenta una bacteria mutante gramnegativa viable no condicional, en la que la bacteria comprende una membrana externa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista de un receptor TLR4/MD2 humano, de forma que el ligando no está presente en la membrana externa o está presente en un nivel que no induce una respuesta superior al 25 % de la señal máxima en un ensayo de HEK-blue cuando se añaden 20 µg de membrana externa a un único pocillo de ensayo, en la que el ligando comprende lípido A, y en la que la bacteria comprende (a) una mutación en al menos uno de los genes seleccionados entre el grupo que consiste en *kdsD*, *kdsA*, *kdsC*, *kdsB*, *gutQ* y *waaA*, que da como resultado una perturbación en la biosíntesis del (Kdo)₂-lípido IV_A, (b) una mutación en cada uno de los genes *pagP* y *eptA*, y (c) una mutación supresora en el gen *msbA* o en el gen *yhjD*. El ligando puede activar la producción de moléculas de la respuesta inmunitaria coestimulantes en un mamífero (por ejemplo, la inducción de los macrófagos para que sinteticen mediadores de inflamación). En algunas realizaciones, la bacteria gramnegativa es una cepa de *Escherichia coli* (por ejemplo, KPM22, KPM22 L1, KPM22 L11, KPM22 L13, KPM22 L14, KPM22 L15, KPM22 L18, KPM22 L20, KPM316, KPM318, KPM334 hasta KPM362) o una cepa de *Pseudomonas*.

65

- La bacteria gramnegativa viable puede comprender una actividad reducida de las isomerasas funcionales de arabinosa-5-fosfato (A5P) KdsD y GutQ. En algunas realizaciones, la actividad remanente de las isomerasas de arabinosa-5-fosfato con actividad reducida es insuficiente para proporcionar un sustrato para la ruta biosintética del Kdo (por ejemplo, ningún sustrato o uno inadecuado para la ruta biosintética del Kdo, como comprendería el experto habitual). En algunas realizaciones, esto se consigue mediante una delección completa de ambos genes. En el presente, las delecciones de KPM318 y algunas tempranas de *lpxL* *lpxM* permiten la total restauración de la síntesis del Kdo (mediante un crecimiento en A5P) mientras que limitan la formación del lípido en lípido IVA, cuando se cultivan en presencia de A5P como suplemento.
- La bacteria gramnegativa viable comprende una o más mutaciones supresoras, por ejemplo, una mutación supresora en un transportador (por ejemplo, MsbA tal como MsbA-P50S, MsbA-P18S, MsbA-T283A, MsbA-R310S o MsbA-L48F), aumentando así la capacidad del transportador para transportar el lípido IVA, una mutación supresora que afecta a la proteína de membrana YhjD (por ejemplo, YhjD-R134C), una mutación supresora que permite el crecimiento a 42 grados Celsius, etc.
- En algunas realizaciones, uno más genes (por ejemplo, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y/o *eptA*) están sustancialmente delecionados y/o una o más enzimas (por ejemplo, LpxL, LpxM, PagP, LpxP y/o EptA) son sustancialmente inactivas. Por ejemplo, la bacteria gramnegativa viable puede comprender una secuencia de cicatriz de una recombinasa específica de sitio en un sitio de una delección parcial o completa de uno o más de los genes (por ejemplo, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP*, *eptA*). Las cepas de *E. coli* pueden incluir, pero no se limitan a: KPM279, KPM280, KPM288, KPM290, KPM296, KPM300, KPM303, KPM310, KPM312, KPM314, KPM316, KPM317, KPM318, KPM334 hasta KPM362. En algunas realizaciones, un gen que codifica una enzima de restricción de ADN y/o una enzima de metilación de ADN y/o un gen que codifica *recA* y/o *endA* está mutado o delecionado.
- La bacteria puede mostrar varias características de crecimiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria puede crecer exponencialmente a 42 grados Celsius. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria muestra un tiempo de duplicación de la fase exponencial de menos de aproximadamente 35 minutos, de menos de aproximadamente 40 minutos o de menos de aproximadamente 45 minutos por encima de 37 grados Celsius. En algunas realizaciones, la bacteria sigue siendo viable a una concentración salina de entre aproximadamente 0,1 M y 0,9 M.
- La bacteria puede comprender un medio para conferir resistencia a un antibiótico. En algunas realizaciones, la bacteria comprende un plásmido F, un plásmido F' o un gen que codifica la producción de pilus F. En algunas realizaciones, la bacteria puede propagar bacteriófagos fd, M13 o bacteriófagos relacionados con fd o con M13. En algunas realizaciones, la bacteria es competente en la captación de ADN extracelular (por ejemplo, electrocompetente).
- La presente divulgación también describe membranas externas derivadas de dichas bacterias gramnegativas, careciendo sustancialmente las membranas externas de un ligando que es un agonista del TLR4/MD2. Por ejemplo, la membrana externa puede derivar de las bacterias gramnegativas descritas en el presente documento. La presente divulgación también describe bacterias gramnegativas viables (por ejemplo, las bacterias gramnegativas descritas en el presente documento, tales como *E. coli* y/o *Pseudomonas*) que carecen de una transferasa de O-acilo que pudiera acilar un lípido A, un precursor de lípido A o un lípido IVA. Algunas transferasas de O-acilo pueden incluir LpxL, LpxM, LpxP y PagP.
- Una bacteria gramnegativa según se describe en el presente documento puede ser una bacteria donante. Por ejemplo, la bacteria gramnegativa donante puede comprender un casete de ADN que comprende un gen (por ejemplo, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP*, *eptA*) que tiene una delección en el marco de lectura abierto y un medio para conferir resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, penicilina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicol o ampicilina), en la que el casete está flanqueado por unos sitios que son un objetivo de una enzima recombinasa específica de sitio.
- La presente divulgación también describe métodos para la selección de bacterias gramnegativas capaces de un crecimiento exponencial a una temperatura por encima de 40 grados Celsius, en los que la bacteria gramnegativa carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2. El método puede comprender el cultivo de una cepa que carece sustancialmente del ligando que actúa como un agonista del receptor TLR4/MD2 y tiene una mutación supresora que permite el crecimiento a entre aproximadamente 30 y 40 grados Celsius (por ejemplo, una cepa descrita en el presente documento); colocar la cepa en una placa con un medio nutriente adecuado; e incubar la cepa de la placa a 42 grados Celsius hasta que parezcan colonias individuales de bacterias.
- La presente divulgación también describe métodos para la construcción de una bacteria que carece sustancialmente de un gen tal como *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y *eptA*. El método comprende la obtención de una bacteria gramnegativa viable que comprende una membrana externa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del receptor TLR4/MD2 (por ejemplo, una cepa descrita en el presente documento). La bacteria gramnegativa viable puede comprender un casete de ADN que comprende un gen modificado (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos modificado), en la que el gen modificado es un gen objetivo modificado que tiene una

delección en el marco de lectura abierto. El casete de ADN puede comprender adicionalmente un medio para conferir resistencia a un antibiótico y/o puede estar flanqueado por los sitios objetivo apropiados para una recombinasa específica de sitio. El método comprende adicionalmente someter la bacteria a una transducción con P1 ν ir y sustituir el gen objetivo por el gen modificado (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos modificado) a través de una recombina-
 5 recombina-
 10 ción homóloga. El método comprende adicionalmente la delección del gen de resistencia a antibióticos mediante la introducción temporal de una recombinasa específica de sitio capaz de actuar sobre las secuencias que flanquean el gen de resistencia a antibióticos, delecionando el gen de resistencia y dejando una cicatriz característica de la recombinasa específica de sitio.

10 La presente invención también presenta un método para la producción de una muestra de ADN sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2, método que comprende:

- (a) la obtención de una bacteria gramnegativa viable no condicional de la invención según se define en el presente documento;
- 15 (b) la introducción de un vector de ADN en la bacteria, y el cultivo de la bacteria transformada con el vector de ADN, de forma que la bacteria funciona para amplificar el vector de ADN; y
- (c) la recolección de una muestra de ADN a partir de la bacteria con el ADN amplificado a través de un protocolo de aislamiento de ADN estándar.

20 Dichos protocolos de aislamiento de ADN son bien conocidos por los expertos habituales en la materia.

La presente invención también presenta un método para la producción de una muestra de proteína sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2, método que comprende:

- 25 (a) la obtención de una bacteria gramnegativa viable no condicional de la invención según se define en el presente documento;
- (b) la introducción de una construcción de un vector de expresión de ADN en la bacteria, vector que comprende tanto un gen que codifica una proteína de interés expresada a partir de un promotor funcional como un gen marcador seleccionable;
- 30 (c) el cultivo de la bacteria transformada con la construcción de expresión del vector de ADN;
- (d) permitir o inducir que la bacteria transformada con la construcción de expresión del vector de ADN exprese la proteína de interés; y
- (e) retirar o tratar la bacteria para que libere la proteína de interés o para que deje la proteína de interés en el medio de cultivo.

35 En algunas realizaciones, la bacteria puede comprender una mutación o una delección en uno o más genes, tales como *lolA*, *lolB* y/o *lpp*.

40 La presente divulgación también describe una colección de bacterias sustancialmente exentas de un ligando que actúa como un agonista del receptor TLR4/MD2 (por ejemplo, una cepa descrita en el presente documento), en la que la colección de bacterias expresa una serie de variantes de una proteína. La colección de bacterias puede ser útil para el cribado de variantes de proteínas para comprobar la actividad en un ensayo basado en células de mamífero. Los miembros de la colección pueden ser generados mediante una expresión in fago o mediante una mutagénesis de un vector de plásmido que expresa un miembro prototipo de la colección.

45 Preferiblemente, las bacterias son capaces de crecer al menos tan rápidamente en medio rico con un suplemento de arabinosa-5-fosfato como crecen en el mismo medio rico que carece de arabinosa-5-fosfato, permitiendo la elección de la composición de la membrana externa dependiendo del arabinosa-5-fosfato, sin que el suplemento dé lugar a una tasa de crecimiento más lenta. El crecimiento con el suplemento debería ser al menos el 95 % de la tasa de crecimiento sin suplemento, y preferentemente una tasa más rápida que la tasa sin suplemento.

50 Las bacterias gramnegativas viables descritas en el presente documento, varios componentes de las mismas, los reactivos y/o los materiales, pueden estar disponibles en forma de un kit. El kit puede comprender una bacteria gramnegativa viable que tiene una membrana externa sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2 (por ejemplo, una cepa descrita en el presente documento), en el que la bacteria es competente para la captación de ADN extracelular.

Definiciones

60 El término "bacterias gramnegativas viables no tóxicas" se refiere a cepas de bacterias gramnegativas viables que comprenden una membrana externa sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2.

65 Los términos "células" y "células hospedadoras" y "células hospedadoras recombinantes", que se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a células que son susceptibles de ser, o que han sido, transformadas con un vector, normalmente un vector de expresión. Las células hospedadoras usadas en el presente

documento pueden ser bacterias gramnegativas. Se entiende que dichos términos no se refieren únicamente a la célula en cuestión en particular, sino también a la progenie o a la potencial progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido tanto a mutaciones como a influencias del entorno, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero todavía está
5 incluida en el ámbito del término según se usa en el presente documento.

Los términos "medio" y "medio de cultivo" están reconocidos en la materia, y generalmente se refieren a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de células vivas.

10 El término "derivado de", según se usa, por ejemplo, en el contexto de derivar el lípido IV_a de una cepa de bacterias gramnegativas, se refiere al lípido IV_a que puede ser obtenido a partir de las bacterias o de las proteínas, y pretende incluir fragmentos o porciones de proteínas.

15 El término "defectuoso", según se usa en el presente documento, con respecto a un gen o a la expresión de un gen, puede significar que el gen no es un gen natural y que el organismo no tiene un genotipo natural y/o un fenotipo natural. El gen, el genotipo o el fenotipo defectuoso pueden ser la consecuencia de una mutación en ese gen, o de un gen que regula la expresión de ese gen (por ejemplo, transcripcional o post-transcripcional), de forma que su expresión normal está disrumpida o extinguida. Se pretende que la "expresión disrumpida del gen" incluya tanto la inhibición completa como la disminución en la expresión del gen (por ejemplo, como en una mutación parcial), por
20 debajo de la expresión del gen natural.

25 El término "bacterias gramnegativas" está reconocido en la materia, y se refiere generalmente a bacterias que no retienen la tinción Gram (por ejemplo, la deposición de un complejo coloreado entre violeta de cristal y yodo). En un ejemplo de tinción de Gram, en primer lugar las células se fijan en un portaobjetos con calor y se tiñen con un colorante básico (por ejemplo, violeta de cristal), que es recogido por todas las bacterias (es decir, tanto por las gramnegativas como por las grampositivas). Después los portaobjetos se tratan con una mezcla de yodo-KI para fijar la tinción, se lavan con acetona o con alcohol, y finalmente se contratiñen con un colorante más pálido de un color diferente (por ejemplo, safranina). Los organismos grampositivos retienen la tinción inicial de violeta, mientras que los organismos gramnegativos son decolorados por el disolvente orgánico, y por lo tanto muestran la
30 contratinción. Algunas bacterias y líneas celulares gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Aeromonas* spp., *Francisella* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp., *Bordetella* spp., *Legionella* spp., *Citrobacter* spp., *Chlamydia* spp., *Brucella* spp., *Pseudomonas* spp., *Helicobacter* spp. y *Vibrio* spp.

35 El término "bacterias gramnegativas mutantes", "bacterias gramnegativas mutantes en el LPS", "bacterias gramnegativas mutantes kdsD y gutQ", "bacterias gramnegativas mutantes en el API" o los términos similares, según se usan en el presente documento, incluyen las bacterias gramnegativas de la invención que han sido mutadas una o más veces, por ejemplo, en uno más de los genes *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA*, *yhjD*, en cualquier otro gen biosintético, de procesado o de transporte, produciendo así una membrana externa que carece
40 sustancialmente de LPS o de otro ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2.

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

45 El término "aislado" aplicado al LPS o a moléculas lipídicas IV_a, se refiere al LPS o al lípido IV_a que ha sido aislado (por ejemplo, un aislamiento parcial o completo) a partir de otros componentes bacterianos, en particular a partir de la membrana externa.

50 Según se usa en el presente documento, el término "porción", cuando se usa en referencia a una secuencia (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína, una secuencia de ácidos nucleicos de un gen) representa cualquier cantidad de la secuencia referenciada (por ejemplo, un 0,001 %, un 0,1 %, un 1 %, un 10 %, un 30 %, un 50 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99,999 % de una secuencia de aminoácidos o de secuencia de ácidos nucleicos).

55 El término "modulación", según se usa en el presente documento, se refiere tanto a la regulación por aumento (es decir, a una activación o a una estimulación, por ejemplo, por un agonismo o por una potenciación), a una regulación por disminución (es decir, a una inhibición o a una supresión, por ejemplo, por un antagonismo, una disminución o una inhibición). El término "inducible" se refiere en particular a la expresión de un gen que no es constitutivo pero que tiene lugar en respuesta a un estímulo (por ejemplo, temperatura, metales pesados u otro aditivo en el medio).

60 El término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos o a oligonucleótidos tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea apropiado, el ácido ribonucleico (ARN). También debería entenderse que el término incluye, como equivalentes, los análogos tanto del ARN como del ADN creados a partir de análogos de nucleótidos y según sea aplicable para la realización que se está describiendo, polinucleótidos individuales (sentido o antisentido) y
65 bicatenarios.

Según se usa en el presente documento, el término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico (por ejemplo, a través de un vector de expresión) en una célula receptora mediante la transferencia de un gen mediada por un ácido nucleico. "Transformación", según se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que el genotipo de una célula es modificado como resultado de la captación celular de un ADN o de un ARN exógeno.

5 En una realización ilustrativa, una célula transformada es aquella que expresa una forma mutante de uno o más de los genes *kdsD* y *gutQ*. Una célula transformada también puede ser aquella que expresa un ácido nucleico que interfiere en la expresión de un gen *gutQ*, *kdsD*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA*, *yhjD* de cualquier otro gen biosintético, de procesado o de transporte.

10 Según se usa en el presente documento, el término "transgen" significa un ácido nucleico (por ejemplo, un gen mutante *kdsD*, *gutQ*, *kdsA*, *kdsB*, *waaA*, *msbA*, *yhjD* de cualquier otro gen biosintético, de procesado o de transporte, o un transcrito antisentido de los mismos) que ha sido introducido en una célula. Un transgen podría ser parcial o completamente heterólogo, por ejemplo, foráneo, al animal o a la célula transgénica en el que es introducido, o puede ser homólogo de un gen endógeno del organismo de la célula en la que es introducido, pero que está diseñado para ser insertado, o es insertado, en el animal o en el genoma de la célula de tal forma que altera el genoma de la célula en el que es insertado. Un transgen también puede estar presente en una célula en forma de un episoma.

20 El término "tratar" un sujeto por una afección o una enfermedad, según se usa en el presente documento, pretende incluir la curación, así como la mejora de al menos un síntoma de la afección o de la enfermedad.

El término "vector" se refiere a una molécula de un ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unida. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se han unido operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión."

25 El término "sistema de expresión", según se usa en el presente documento, se refiere a un vector de expresión bajo unas condiciones en las cuales un ARNm puede ser transcrito y/o un ARNm puede ser traducido en una proteína, en un ARN estructural o en otro componente celular. El sistema de expresión puede ser un sistema de expresión *in vitro*, que está disponible en el mercado o es fácilmente elaborable según las técnicas conocidas en la materia, o puede ser un sistema de expresión *in vivo*, tal como una célula eucariota o procariota que contiene el vector de expresión. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de "plásmidos", que se refieren generalmente a bucles de un ADN circular bicatenario que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan de forma intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector usada con más frecuencia. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión que presentan unas funciones equivalentes y que son bien conocidas en la materia o que se dan a conocer en la materia posteriormente a las mismas (por ejemplo, cósmido, fagémido y vectores bacteriófagos).

40 El término "viable" significa que las células son capaces de crecer y de dividirse exponencialmente durante múltiples generaciones en un medio nutriente adecuado, incluyendo medio rico, y que las células pueden ser almacenadas en unas condiciones de almacenamiento típicas para ese tipo de célula, y posteriormente volverse a cultivar.

Breve descripción de los dibujos

45 La FIG. 1 muestra las curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* KPM22 y las de tipo KPM22 KPM22 L1, KPM22 L11, KPM22 L13, KPM22 L14, KPM22 L15, KPM22 L18 y KPM22 L20. Los tiempos de generación se determinaron en medio LB con agitación a 200 rpm a 37 °C. Se calculó que los tiempos de generación (en estas condiciones) eran como sigue: KPM22 40 min, KPM22 L1 37 min, KPM22L11 39 min, KPM22 L13 59 min, KPM22 L14 44 min, KPM22 L15 40 min, KPM22 L18 36 min y KPM22 L20 55 min.

50 La FIG. 2 muestra las curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* KPM288 (KPM22 L1 Δ *pxL*::Km⁺) y de la cepa KPM290 (KPM22 L11 Δ *pxL*::Km⁺) bien en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C o bien en medio LB complementado con 5-fosfato de D-arabinosa 15 μ M (A5P) y 6-fosfato de D-glucosa 10 μ M (G6P) a 37 °C. Se calculó que los tiempos de generación en medio LB eran como sigue: KPM288 45 min, KPM290 43 min. Los resultados del crecimiento en el medio LB complementado con A5P y G6P eran como sigue: KPM288 dejó de crecer exponencialmente después de 2-3 generaciones, KPM290 46 min.

60 La FIG. 3 muestra las curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* KPM303 (KPM22 L11 Δ *pxL* Δ *pxM*) a 37 °C en medio LB, en medio LB complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M, en medio Super Broth (SB) (que contiene 10 g/l de NaCl) o en medio SB (que contiene 10 g/l de NaCl) complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. El medio SB no mejoró la tasa de crecimiento de KPM303 en comparación con el medio LB. Sin embargo, al contrario que el crecimiento en el medio LB complementado con A5P y G6P, KPM303 continuó creciendo exponencialmente después de 2-3 generaciones cuando se cultivó en SB complementado con A5P y G6P.

65 La FIG. 4 muestra las curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* KPM303 (KPM22 L11 Δ *pxL* Δ *pxM*), KPM312 (KPM22 L11 Δ *pxL* Δ *pxM* Δ *pagP*) y KPM316 (KPM22 L11 Δ *pxL* Δ *pxM* Δ *pagP* Δ *pxP*) a 37 °C bien en

medio SB o bien en SB complementado con A5P 15 μ M y 10 μ M. Los tiempos de generación en medio SB eran como sigue: KPM303 54 min, KPM312 50 min, KPM316 46 min. Los tiempos de generación en medio SB complementado con A5P y G6P eran como sigue: KPM303 39 min, KPM312 42 min, KPM316 42 min.

5 La FIG. 5 muestra las curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* KPM316 a 37 °C bien en medio SB complementado con MgSO_4 10 mM y CaCl_2 2 mM, o bien en medio SB complementado con MgSO_4 10 mM, CaCl_2 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. La KPM316 tuvo un tiempo de generación de 51 min en SB con MgSO_4 10 mM y CaCl_2 2 mM. La KPM316 tuvo un tiempo de generación de 46 minutos en SB con MgSO_4 10 mM, CaCl_2 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M.

10 La FIG. 6 muestra las curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318 cultivadas bien en SB o bien en SB complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M a 37 °C. Los tiempos de duplicación son muy similares en el intervalo de 39-44 min.

15 La FIG. 7 muestra las curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* KPM296-6 y KPM316 a 37 °C bien en medio SB complementado con MgSO_4 10 mM y CaCl_2 2 mM, o bien en medio SB complementado con MgSO_4 10 mM, CaCl_2 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. El índice de crecimiento de la KPM296-6 en medio SB con MgSO_4 10 mM y CaCl_2 2 mM era de 48 min. En SB con MgSO_4 10 mM, CaCl_2 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M, el índice de crecimiento de la KPM296-6 era de 42 min.

20 FIG. 8 Curvas de crecimiento de una serie de cepas clínicas independientes seleccionadas entre KPM296 a 42 °C. El crecimiento era medio SB a 42 °C. Las cepas clínicas individuales están numeradas en el diagrama y codificadas con los símbolos usados para representar su curva de crecimiento. Se observó una considerable variación en el tiempo de generación, pero cada una muestra un crecimiento exponencial.

25 FIG. 9 Análisis de los productos de la PCR producidos por los cebadores que flanquean cada gen para confirmar las delecciones de los genes de la transferasa de O-acilo y la delección del gen *eptA* en KPM318. Se usó la cepa parental BW30270 como control, aparte de KPM318, para cada gen analizado. Se indican los ADN de molde y el gen para el cual se diseñaron los pares de cebadores de la PCR en particular. En cada caso puede observarse que la cepa parental BW30270 da lugar a un producto de la PCR mayor que el observado con KPM318. Únicamente permanece en su sitio la secuencia de cicatrización del gen completo de KPM318.

30 FIG. 10A y 10B Ensayos de HEK-Blue™ de las cepas BW30270, KPM316 y KPM318. (A) Preparaciones de membrana externa de las cepas y (B) células completas. Se indica la cantidad de células añadida a cada pocillo (en forma de ufc - unidades formadoras de colonias) o la masa de la preparación de membrana externa. En paralelo se analizó el LPS de referencia de *E. coli* K-12 suministrado con el kit de ensayo en todos los experimentos, y se muestra para una comparación con los datos de la membrana externa con los que es más directamente comparable sobre una base ponderal.

40 FIG. 11 Espectros de masas de ion ciclótron con transformada de Fourier de ionización por electronebulización con carga descirconvolucionada (ESI FT-ICR) en modo de ion negativo para las moléculas de LPS aisladas a partir de las cepas de *E. coli* KPM316 (A) y KPM318 (B). Las cifras de masa proporcionadas se refieren a los picos monoisotópicos de las moléculas neutras. El pico a 1178,66 u es, lo más probablemente, un producto de degradación triacilado del lípido IVa (1404,86 u) producido durante el aislamiento del LPS, ya que no es coherente con un intermedio conocido de la ruta.

45 FIG. 12a-g La secuencia de *Escherichia coli* KPM316 (*msbA52* Δ *kdsD* Δ *gutQ* Δ *lpxL* Δ *lpxM* Δ *pagP* Δ *lpxP*). *msbA52* sustituye al alelo natural de *msbA*, en el que una C en 965895 está sustituida por una T, dando como resultado una Serina en lugar de una Prolina en el aminoácido 18 de la proteína MsbA. Las siguientes fueron detectadas a partir de la cepa parental: Δ *gutQ* (FIG. 12b), Δ *kdsD* (FIG. 12c), Δ *lpxL* (FIG. 12d), Δ *lpxM* (FIG. 12e), Δ *pagP* (FIG. 12f) y Δ *lpxP* (FIG. 12g).

50 FIG. 13 Hay presentes cambios de nucleótido individual en KPM316 con respecto a la cepa parental MG1655, además de la mutación *mshA52* y de la delección/inserción para inactivar los genes sintéticos del LPS. No se conoce ni se ha predicho que alguno dé como resultado un fenotipo característico.

55 FIG. 14a-h *Escherichia coli* KPM318 (*msbA52* Δ *kdsD* Δ *gutQ* Δ *lpxL* Δ *lpxM* Δ *pagP* Δ *lpxP* Δ *eptA*). *msbA52* sustituye al alelo natural de *msbA*, en el que una C en 965895 está sustituida por una T, dando como resultado una Serina en lugar de una Prolina en el aminoácido 18 de la proteína MsbA. Las siguientes fueron detectadas a partir de la cepa parental: Δ *gutQ* (FIG. 14b), Δ *kdsD* (FIG. 14c), Δ *lpxL* (FIG. 14d), Δ *lpxM* (FIG. 14e), Δ *pagP* (FIG. 14f), Δ *lpxP* (FIG. 14g) y Δ *eptA* (FIG. 14h).

60 FIG. 15 Se secuenciaron las cepas BW30270 y KPM318 en las instalaciones de secuenciación de Scripps Core DNA mediante el uso de una secuenciación Illumina. Se indican todos los polimorfismos de nucleótido individual (SNP) y los polimorfismos de delección/inserción (DIP). Estos SNP y DIP son asignados en base a la comparación de estas cepas con la cepa Blattners MG1655. Sólo se indican aquellas detectadas en un 100 % de las lecturas.

Se identificó el alelo supresor *msbA-P18S* en la cepa original KPM22 L11.

FIG. 16 Se evaluó el crecimiento de los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 cultivados en medio SB a 30 °C.

5 FIG. 17 Se evaluó el crecimiento de los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 cultivados en medio SB complementado con A5PIG6P a 30 °C.

10 FIG. 18 Se evaluó el crecimiento de los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 cultivados en medio SB a 37 °C.

FIG. 19 Se evaluó el crecimiento de los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 cultivados en medio SB complementado con A5PIG6P a 37 °C.

15 FIG. 20 Se evaluó el crecimiento de los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 cultivados en medio SB a 42 °C.

20 FIG. 21 Se evaluó el crecimiento de los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 cultivados en medio SB complementado con A5PIG6P a 42 °C.

25 FIG. 22a-d Se secuenciaron los cuatro derivados de KPM-318 resistentes a la temperatura, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337 en las instalaciones de secuenciación de Scripps Core DNA mediante el uso de una secuenciación Illumina. Se indican todos los polimorfismos de nucleótido individual (SNP) y los polimorfismos de delección/inserción (DIP). Estos SNP y DIP son asignados en base a la comparación de estas cepas con la cepa MG1655 de Blattner. Sólo se indican a aquellas detectadas en un 100 % de las lecturas. Se identificó el alelo supresor *msbA-P18S* en la cepa original KPM22 L11.

30 FIG. 23 Espectro de masas de ESI FT-ICR en modo de ion negativo del lípido IV_a (1404,86 u) aislado a partir de *E. coli* KPM337 cultivada a 42 °C en medio LB. Las cifras de masa proporcionadas se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras. Es probable que el pico correspondiente al lípido A triacilado (1178,67 u) sea un artefacto producido durante el aislamiento y/o la ionización del lípido IV_a ya que no es coherente con un intermedio conocido de la ruta.

35 FIG. 24 Espectro de masas de ESI FT-ICR en modo de ion negativo del LPS aislado a partir de *E. coli* KPM334 cultivada a 42 °C en medio LB complementado con A5P/G6P. Las cifras de masa proporcionadas se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras.

40 FIG. 25 Espectro de masas de ESI FT-ICR en modo de ion negativo del LPS aislado a partir de *E. coli* KPM335 cultivada a 42 °C en medio LB complementado con A5P/G6P. Las cifras de masa proporcionadas se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras.

45 FIG. 26 Espectro de masas de ESI FT-ICR en modo de ion negativo del LPS aislado a partir de *E. coli* KPM337 cultivada a 42 °C en medio LB complementado con A5P/G6P. Las cifras de masa proporcionadas se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras.

50 FIG. 27 Espectro de masas de ESI FT-ICR en modo de ion negativo del LPS aislado a partir de *E. coli* KPM318 cultivada a 37 °C en medio LB complementado con A5P/G6P (control). Las cifras de masa proporcionadas se refieren a las masas monoisotópicas de las moléculas neutras. Las asignaciones de los picos están recogidas en la Tabla 1.

FIG. 28 Detección del LPS en suspensiones de células bacterianas de KPM316 y de KPM318 cultivadas a 37 °C bien en medio LB o bien en medio LB complementado con A5P/G6P. La cepa natural de *E. coli* K-12 BW30270 se usó como control.

55 FIG. 29 Inducción relativa del NF-κB en células HEK-Blue causada por las cepas clínicas de LPS/lípido IV_a a partir de las cepas de *E. coli* BW30270, KPM316, KPM318 y KPM334.

60 FIG. 30 ELISA del TNF-alfa humano para la determinación de la actividad antagonista de las muestras de LPS/lípido IV_a aisladas a partir de las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318. Para los detalles, véase el protocolo en el texto.

65 FIG. 31 Liberación del TNF-alfa en macrófagos humanos causada por las muestras de LPS/lípido IV_a a partir de las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318 en medio que contiene un 4 % de suero AB. El S-LPS de la *E. coli* K-235 se usó como control.

FIG. 32 Liberación del TNF-alfa en macrófagos humanos causada por las muestras de LPS/lípido IVa a partir de las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318 en medio exento de suero. El S-LPS de la *E. coli* K-235 se usó como control.

5 FIG. 33 Liberación de la IL-8 en células HEK293 hTLR4/MD2 #33 estimuladas con las muestras de LPS/lípido IVa a partir de las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318. El S-LPS de la *E. coli* K-235 se usó como control.

FIG. 34 Liberación de la IL-8 en células HEK293 hTLR2 #2 estimuladas con las muestras de LPS/lípido IVa a partir de las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318. El S-LPS de la *E. coli* K-235 se usó como control.

10 FIG. 35 Mapas de los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 para la expresión citoplasmática (panel superior) y periplasmática de MalE-LacZ α (panel inferior).

15 FIG. 36 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (10 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (10 μ l de cada uno). Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de un tiempo de inducción de 3 h. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células cultivadas en unas condiciones de inducción con IPTG durante una noche. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

20 FIG. 37 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (10 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (10 μ l de cada uno). Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de un tiempo de inducción de 3 h. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células cultivadas en unas condiciones de inducción con IPTG durante una noche. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Orange - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

30 FIG. 38 Análisis mediante una SDS-PAGE (panel superior) de los extractos de proteínas (8 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (10 μ l de cada uno). Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de una inducción durante una noche. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células cultivadas en unas condiciones de inducción con IPTG durante una noche. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Para los inmunotransferidos (panel inferior), se sometieron 8 μ g de cada extracto de proteínas y 2,5 μ l de cada sobrenadante del cultivo a una SDS-PAGE. Las membranas transferidas se sondearon con anticuerpos anti-MalE y anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (H + L) y se desarrollaron en presencia de sustrato de nitroblue tetrazolio (NBT) y de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP). Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

40 FIG. 39 Análisis mediante una SDS-PAGE (panel superior) de los extractos de proteínas (8 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (10 μ l de cada uno). Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de una inducción durante una noche. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células cultivadas en unas condiciones de inducción con IPTG durante una noche. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Para los inmunotransferidos (panel inferior), se sometieron 8 μ g de cada extracto de proteínas y 2,5 μ l de cada sobrenadante del cultivo a una SDS-PAGE. Las membranas transferidas se sondearon con anticuerpos anti-MalE y anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (H + L) y se desarrollaron en presencia de sustrato de nitroblue tetrazolio (NBT) y de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP). Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

50 FIG. 40 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (8 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (2,5 μ l de cada uno). Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de un tiempo de inducción de 3 h. Los medios de cultivo eran a partir de células cultivadas en unas condiciones de inducción con IPTG durante 3 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpos anti-MalE y anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (H + L) y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP.

60 FIG. 41 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (8 μ l de cada uno) de las cepas pMAL-p2. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Los medios de cultivo eran a partir de células después de la inducción de 3 h, 6 h, 12 h y 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - BioRad) se analizaron en los carriles M.

65 FIG. 42 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (6 μ g de cada uno) y de los medios de cultivo (10 μ l de cada uno) de las cepas pMAL-p2. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no

inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Los medios de cultivo eran a partir de células después de la inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpos anti-MalE y anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (H + L) y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP.

FIG. 43 Mapas de los plásmidos pJexpress404:51149 y pJexpress404:51150 para la expresión citoplasmática (panel superior) y periplasmática de ApoA1 (panel inferior).

FIG. 44 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 µg de cada uno) preparados a partir de la cepas BW30270/pJexpress404:51149 y KPM318/pJexpress404:51149. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M. La flecha indica la proteína ApoA1.

FIG. 45 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 µg de cada uno) preparados a partir de la cepas KPM334/pJexpress404:51149 y KPM335/pJexpress404:51149. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Rage - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M. La flecha indica la proteína ApoA1.

FIG. 46 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 µg de cada uno) preparados a partir de la cepa KPM336/pJexpress404:51149. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

FIG. 47 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 µg de cada uno) preparados a partir de la cepas BW30270/pJexpress404:51150 y KPM318/pJexpress404:51150. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

FIG. 48 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 µg de cada uno) preparados a partir de la cepas KPM334/pJexpress404:51150 y KPM335/pJexpress404:51150. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

FIG. 49 Análisis mediante una SDS-PAGE de los extractos de proteínas (6 µg de cada uno) preparados a partir de la cepa KPM336/pJexpress404:51150. Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

FIG. 50 Se evaluó la densidad celular óptica (DO_{600}) frente al número de células viables (ufc/ml) de la cepa KPM335/pJexpress404:51150 durante el periodo de la expresión inducida de ApoA1.

FIG. 51 Análisis mediante una SDS-PAGE de los medios de cultivo procedentes de las cepas BW30270/pJexpress404:51150 y KPM318/pJexpress404:51150. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Para las cantidades de muestras cargadas, véanse las Tablas 7 - 11.

FIG. 52 Análisis mediante una SDS-PAGE de los medios de cultivo procedentes de las cepas KPM334/pJexpress404:51150 y KPM335/pJexpress404:51150. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Para las cantidades de muestras cargadas, véanse las Tablas 7 - 11.

FIG. 53 Análisis mediante una SDS-PAGE de los medios de cultivo de KPM336/pJexpress404:51150. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de

inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Para las cantidades de muestras cargadas, véanse las Tablas 7-11. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M.

5

FIG. 54 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (3 µg de cada uno) de las cepas BW30270/pJexpress404:51149 y KPM318/pJexpress404:51149. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M y se marcaron después del transferido.

10

15

FIG. 55 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (3 µg de cada uno) de las cepas KPM334/pJexpress404:51149 y KPM335/pJexpress404:51149. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M y se marcaron después del transferido.

20

25

FIG. 56 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (3 µg de cada uno) de la KPM336/pJexpress404:51149. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 10 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M y se marcaron después del transferido.

30

35

FIG. 57 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (3 µg de cada uno) de las cepas BW30270/pJexpress404:51150 y KPM318/pJexpress404:51150. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M y se marcaron después del transferido.

40

45

FIG. 58 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (3 µg de cada uno) de las cepas KPM334/pJexpress404:51150 y KPM335/pJexpress404:51150. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M y se marcaron después del transferido.

50

55

FIG. 59 Análisis de inmunotransferencia de los extractos de proteínas (3 µg de cada uno) de la KPM336/pJexpress404:51150. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Los marcadores de la masa molecular de la proteína (Broad Range - Bio-Rad) se analizaron en los carriles M y se marcaron después del transferido.

60

FIG. 60 Análisis de inmunotransferencia de los medios de cultivo procedentes de las cepas BW30270/pJexpress404:51150 y KPM318/pJexpress404:51150. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poliacrilamida al 12 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron durante una noche en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Para las cantidades de muestras cargadas, véanse las Tablas 7 - 11.

65

FIG. 61 Análisis de inmunotransferencia de los medios de cultivo procedentes de las cepas KPM334/pJexpress404:51150 y KPM335/pJexpress404:51150. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poli(acrilamida) al 12 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron durante una noche en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Para las cantidades de muestras cargadas, véanse las Tablas 7-11.

FIG. 62 Análisis de inmunotransferencia de los medios de cultivo de la KPM336/pJexpress404:51150. Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de células no inducidas y de células después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Las muestras se resolvieron mediante el uso de geles de poli(acrilamida) al 12 %, seguido del transferido y el sondeo de las membranas con anticuerpo Penta-His y anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (H + L), y se desarrollaron durante una noche en presencia de sustrato de NBT y de BCIP. Para las cantidades de muestras cargadas, véanse las Tablas 7-11.

FIG. 63 Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos pMAL-c2 aislados a partir de cuatro transformantes seleccionados aleatoriamente de las cepas de *E. coli* BW30270/pMAL-c2, KPM318 (LB)/pMAL-c2 y KPM318 (LB A5P/G6P)/pMAL-c2. Las muestras se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % en tampón de TBE. Carril 1, pMAL-c2 control; carril 2, BW30270/pMAL-c2 (1); carril 3, BW30270/pMAL-c2 (2); carril 4, BW30270/pMAL-c2 (3); carril 5, BW30270/pMAL-c2 (4); carril 6, KPM318 (LB)/pMAL-c2 (1); carril 7, KPM318 (LB)/pMAL-c2 (2); carril 8, KPM318 (LB)/pMAL-c2 (3); carril 9, KPM318 (LB)/pMAL-c2 (4); carril 10, KPM318 (LB A5P/G6P)/pMAL-c2 (1); carril 11, KPM318 (LB A5P/G6P)/pMAL-c2 (2); carril 12, KPM318 (LB A5P/G6P)/pMAL-c2 (3); carril 13, KPM318 (LB A5P/G6P)/pMAL-c2 (4); carril M, 1-kb más una escalera de ADN (Invitrogen).

FIG. 64 Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 aislados a partir de dos transformantes seleccionados aleatoriamente de las cepas de *E. coli* KPM334/pMAL-c2, KPM334/pMAL-p2, KPM335/pMAL-c2 y KPM335/pMAL-p2. Carril 1, pMAL-c2 control; carril 2, KPM334/pMAL-c2 (1); carril 3, KPM334/pMAL-c2 (2); carril 4, KPM335/pMAL-c2 (1); carril 5, KPM335/pMAL-c2 (2); carril 6, pMAL-p2 control; carril 7, KPM334/pMAL-p2 (1); carril 8, KPM334/pMAL-p2 (2); carril 9, KPM335/pMAL-p2 (1); carril 10, KPM335/pMAL-p2 (2); carriles M, 1-kb más una escalera de ADN (Invitrogen).

FIG. 65 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de una PCR obtenidos mediante el uso del par de cebadores 5EClpxPctrl/3EClpxPctrl para distinguir entre la presencia del gen natural *lpxP* y la mutación de inactivación $\Delta lpxP$ en cepas KPM. Se usaron las biomásas de una potencial cepa BW30270 (F⁺121 Tn 10) (carril 1) y ocho transconjugantes resistentes a la tetraciclina KPM318 (F⁺121 Tn 10) (carriles 2 - 9) como moldes. El 1-kb más una escalera de ADN (Invitrogen) se muestra en el carril M.

FIG. 66 Mapa del plásmido colaborador pMAK705 Km^R CATMUT.

FIG. 67 las cepas de *E. coli* TOP10 y XL1-Blue se transformaron con el plásmido pMAK705 Km^R CATMUT. Las cepas resultantes TOP10/pMAK705 Km^R CATGUT y XL1-Blue/pMAK705 Km^R CATMUT se sembraron por estrías en placas con caldo LB + 30 µg/ml de kanamicina, y en LB + 30 µg/ml de kanamicina + 15 µg/ml de cloranfenicol.

La FIG. 68 muestra la TABLA 1, que proporciona ejemplos de las cepas de *E. coli* construidas.

La FIG. 69 muestra la TABLA 2, que recoge la lista de picos de las glicofomas detectadas en *E. coli* KPM318 mediante el uso de ESI FT-ICR MS (FIGURA 27).

La FIG. 70 muestra la TABLA 3, que proporciona la densidad óptica y el número de células de las suspensiones bacterianas inmediatamente antes de la inducción con IPTG.

La FIG. 71 muestra la TABLA 4, que proporciona la densidad óptica y el número de células de las suspensiones bacterianas después de una inducción de 3 h con IPTG.

La FIG. 72 muestra la TABLA 5, que proporciona la densidad óptica y el número de células de las suspensiones bacterianas después de una inducción de 6 h con IPTG.

La FIG. 73 muestra la TABLA 6, que proporciona la densidad óptica y el número de células de las suspensiones bacterianas después de una inducción de 12 h con IPTG.

La FIG. 74 muestra la TABLA 7, que proporciona la densidad óptica y el número de células de las suspensiones bacterianas después de una inducción de 24 h con IPTG.

La FIG. 75 muestra la TABLA 8, que muestra proceso para la determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células inmediatamente antes de la inducción con IPTG.

- La FIG 76 muestra la TABLA 9, que muestra proceso para la determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de una inducción de 3 h.
- 5 La FIG. 77 muestra la TABLA 10, que muestra proceso para la determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de una inducción de 6 h.
- La FIG. 78 muestra la TABLA 11, que muestra proceso para la determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de una inducción de 12 h.
- 10 La FIG. 79 muestra la TABLA 12, que muestra proceso para la determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de una inducción de 24 h.
- La FIG. 80 muestra la TABLA 13, que proporciona el número de células competentes.
- 15 La FIG. 81 muestra la TABLA 14, que proporciona las eficacias de transformación para las cepas de *E. coli* BW30270, KPM318 (LB) y KPM318 (LB A5P/G6P).
- La FIG. 82 muestra la TABLA 15, que proporciona las eficacias de transformación para las cepas de *E. coli* KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337.
- 20 La FIG. 83 muestra la TABLA 16, que proporciona los rendimientos de los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 aislados a partir de las cepas de *E. coli* BW30270, KPM318, KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337.
- La FIG. 84 muestra la TABLA 17, que describe el cálculo de la cantidad del receptor (BW30270 y KPM318) que se debe añadir a 500 µl del donante (JC19022 F'121 Tn10).
- 25 La FIG. 85 muestra la TABLA 18, que describe el cálculo de la cantidad del receptor (KPM334, KPM335, KPM336 y KPM337) que se debe añadir a 500 µl del donante (JC19022F-121 Tn10).
- 30 La FIG. 86 muestra la TABLA 19, que proporciona las densidades ópticas (DO₆₀₀) de las cepas inmediatamente antes de la infección con M13KO7.
- La FIG. 87 muestra la TABLA 20, que proporciona el número de colonias resistentes a la kanamicina después de la infección de potenciales transconjugantes F'121 Tn10 con el fago colaborador M13KO7.
- 35 La FIG. 88 muestra la TABLA 21, que proporciona las secuencias mencionadas en esta solicitud
- Las FIG. 89, 90 y 91 muestran la ruta de construcción de cada de *E. Coli*.
- 40 Las FIG. 92A y 92B muestran un protocolo para los ensayos HEK-Blue.

Descripción de las realizaciones preferidas

45 El lípido A, un componente del lipopolisacárido (LPS) que comprende dos residuos de glucosamina al que se han unido seis cadenas de acilo, funciona como un agonista del receptor de tipo Toll 4 (TLR4/MD-2). El TLR4/MD-2 está presente en numerosas células del sistema inmunitario, por ejemplo, en macrófagos, monocitos y células dendríticas. La activación del TLR4/MD-2 a través del LPS/Lípido A puede dar lugar a la activación de los componentes y de las moléculas coestimulantes de la respuesta inmunitaria, causando finalmente una endotoxicidad. Por ejemplo, cuando el LPS se une al TLR4/MD-2 (en los seres humanos), puede activarse la

50 producción de citocinas, puede activarse el complemento y puede activarse la coagulación. Las citocinas pueden incluir la interleucina IL-1, IL-6, IL-8, el factor necrosis de tumoral (TNF) (por ejemplo, el TNF α) y el factor de activación de las plaquetas. Dichas citocinas pueden estimular la producción de los mediadores de la inflamación y el choque séptico (por ejemplo, prostaglandinas, leucotrienos). El Complemento C3a y C5a puede provocar la liberación de histamina, que da lugar a una vasodilatación y/o afecta a la quimiotaxia de los neutrófilos. El factor de

55 coagulación sanguíneo Factor XII puede activar varias respuestas que dan como resultado una trombosis, una activación de la plasmina (fibrinólisis, hemorragia), y similares.

Las bacterias gramnegativas comprenden normalmente una mayoría de 6-acil LPS en sus membranas externas. La presente invención presenta bacterias gramnegativas viables que comprenden una membrana externa que carece

60 sustancialmente de componentes (por ejemplo, ligandos) que actúan como agonistas del receptor de tipo Toll 4 (TLR4)/MD-2. Los componentes (por ejemplo, ligandos) pueden comprender el lípido A, un 6-acil lípido (por ejemplo, 6-acil LPS), y similares, o una combinación de los mismos. Al contrario que el LPS normal (o el lípido A, el 6-acil lípido), el lípido IV_A, o 4-acil LPS, se une menos fuertemente al TLR4/MD-2 humano y actúa como un antagonista suave del TLR-4/MD2 en lugar de como un agonista. En algunas realizaciones, el ligando que carece

65 sustancialmente en la membrana externa comprende un Lípido IV_A, o derivados del lípido IV_A.

Según se usa en el presente documento, el término "carece sustancialmente" significa que la membrana externa tiene desde aproximadamente cero del ligando agonista hasta un nivel de dicho ligando que no induce una respuesta por encima de aproximadamente el 25 % de la señal máxima en el ensayo de HEK-blue cuando se añaden 20 µg de la membrana externa a un único pocillo de ensayo. En algunas realizaciones, un ensayo de HEK-Blue que puede usarse según la presente invención puede obtenerse en InvivoGen, 3950 Sorrento Valley Blvd., Suite 100, San Diego, CA 92121 (EE.UU.), nº de catálogo # hkb-htlr4, y el protocolo del ensayo está indicado en la FIG. 92. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la membrana externa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del receptor de tipo Toll 4 (TLR4/MD-2) significa que la membrana externa no tiene ningún ligando. En algunas realizaciones, la membrana externa puede tener una baja cantidad de agonista del TLR4/MD-2 presente a un nivel que está por debajo del límite de detección en un ensayo basado en células HEK-blue cuando se ensaya en forma de un extracto de membrana a hasta 20 µg por pocillo. La línea celular humana HEK-blue está diseñada para que sea muy sensible a la señalización por el TLR4/MD-2, y este ensayo proporcionará una señal muy fuerte cuando haya presente únicamente 20 pg del LPS por pocillo. En algunas realizaciones, se observa una señal muy baja (por ejemplo, menor de aproximadamente el 25 % del valor máximo) incluso a un nivel de 20 µg de membrana externa por pocillo.

Algunas bacterias gramnegativas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*. Por ejemplo, algunas especies gramnegativas lejanamente relacionadas, tales como especies de *Pseudomonas* también pueden ser modificadas para que crezcan careciendo del agonista TLR4/MD2 como componente de su membrana externa. En algunas realizaciones la limitación de *Escherichia* es K-12, W3110, MG1655, B/r, BL21, O157:h7, O42, 101-1,1180, 1357, 1412, 1520, 1827-70, 2362-75, 3431, 53638, 83972, 929-78, 98NK2, ABU 83972, B, B088, B171, B185, B354, B646, B7A, C, c7122, CFT073, DH1, DH5α, E110019, E128010, E74/68, E851/71, EAEC 042, EPECa11, EPECa12, EPECa14, ETEC, H10407, F11, F18+, FVEC1302, FVEC1412, GEMS_EPEC1, HB101, HT115, KO11, LF82, LT-41, LT-62, LT-68, MS 107-1, MS 119-7, MS 124-1, MS 145-7, MS 79-2, MS 85-1, NCTC 86, Nissle 1917, NT:H19, NT:H40, NU14, O103:H2, O103:HNM, O103:K+, O104:H12, O108:H25, O109:H9, O111:H-O111:H19, O111:H2, O111:H21, O111:NM, O115:H-, O115:HMN, O115:K+, O119:H6, O119:UT, O124:H40, O127a:H6, O127:H6, O128:H2, O131:H25, O136:H-, O139:H28 (cepa E24377A / ETEC), O13:H11, O142:H6, O145:H-, O153:H21, O153:H7, O154:H9, O157:12, O157:H-, O157:H12, O157:H43, O157:H45 O157:H7 EDL933, O157:NM O15:NM, O177:H11, > O17:K52:H18 (cepa UMN026 / ExPEC), O180:H- O1:K1 / APEC, O26, O26:H-, O26:H11, O26:H11:K60, O26:NM, O41:H-, O45:K1 (cepa S88 / ExPEC), O51:H-, O55:H51, O55:H6, O55:H7, O5:H-, O6, O63:H6, O63:HNM, O6:K15:H31 (cepa 536 / UPEC), O7:K1 (cepa IAI39 / ExPEC), O8 (cepa IAI1), O81 (cepa ED1a), O84:H-, O86a:H34, O86a:H40, O90:H8, O91:H21 O9:H4 (cepa HS), O9:H51, ONT:H-, ONT:H25, OP50, Orough:H12, Orough:H19, Orough:H34, Orough:H37, Orough:H9, OUT:H12, OUT:H45, OUT:H6, OUT:H7, OUT:HNM, OUT:NM, RN587/1, RS218, 55989 / EAEC, B / BL21,B / BL21-DE3, SE11, SMS-3-5 / SECEC, UTI89 / UPEC, TA004, TA155, TX1999 o Vir68.

En algunas realizaciones, las bacterias gramnegativas viables de la presente invención tienen una actividad reducida de las isomerasas funcionales (API) de D-arabinosa-5-fosfato (A5P) KdsD y GutQ. La reducida actividad de las API funcionales KdsD y GutQ puede ser el resultado de una inactivación sustancial de las API, por ejemplo, un agente químico que funciona inactivando sustancialmente las API, una proteína negativa dominante que funciona inactivando sustancialmente las API, un anticuerpo de fragmento del mismo que se une y funciona inactivando sustancialmente las API, o similares. En algunas realizaciones, la reducida actividad de las API funcionales KdsD y GutQ puede ser el resultado de una delección o de una mutación parcial o sustancial en los genes que codifican las API (por ejemplo, *kdsD*, *gutQ*). Las bacterias pueden incluir las *E. coli* K-12 TCM15, BL21, BL21 (DE3), W3110.

MUTACIONES SUPRESORAS

Las bacterias gramnegativas viables de la presente invención comprenden una mutación supresora que permite el crecimiento a pesar de carecer de agonistas del TLR4 en la membrana. Por ejemplo, las bacterias gramnegativas viables pueden derivar de *E. coli* K-12 TCM15, que carece de los dos genes de API (por lo tanto carece del Kdo) y no es viable salvo que se le suministre A5P exógeno. Las bacterias gramnegativas viables pueden comprender una mutación supresora que permita que las bacterias sean viables a pesar de carecer de ambos genes de API (y del Kdo). Las mutaciones supresoras pueden incluir mutaciones supresoras de ganancia de función, así como mutaciones supresoras de pérdida de función. La mutación supresora incluye una mutación en un gen que codifica el transportador MsbA codificado por *msbA* o la proteína de membrana YhjD codificada por *yhjD*. La mutación supresora puede proporcionar al transportador o a la proteína de membrana un aumento en la capacidad para transportar el lípido IV_A. La mutación supresora puede incluir una sustitución de un aminoácido, por ejemplo, una mutación en la posición del aminoácido 18, o en la posición 50, o en la posición 283, o en la posición 310, o en la posición 448 del MsbA o una mutación en la posición del aminoácido 134 de YhjD. En algunas realizaciones, la mutación supresora da como resultado una expresión regulada por aumento de un transportador (por ejemplo, MsbA), aumentando la capacidad de las bacterias para transportar el lípido IV_A. La mutación supresora no se limita a los ejemplos mencionados anteriormente. Algunas bacterias pueden incluir las *E. coli* K-12 KPM22, KPM22 L1, KPM22 L11. En algunas realizaciones, las bacterias incluyen *E. coli* K-12 KPM22 L13, KPM22 L14, KPM22 L15, KPM22 L18, KPM22 L20. En algunas realizaciones, pueden usarse los alelos supresores del gen *msbA* de *E. coli* en especies de bacterias gramnegativas lejanamente relacionadas (tales como *Pseudomonas*) a pesar de que el propio gen natural *msbA* de *E. coli* no puede sustituir al gen *msbA* nativo.

CEPAS NO REVERSIBLES

En las bacterias gramnegativas naturales, las transferasas de O-acilo LpxL y LpxM añaden lípidos unidos por O al Kdo2-Lípido IV_a para formar un 6-acil lípido que funciona como un agonista del TLR4/MD-2. En ausencia del Kdo, las transferasas de O-acilo LpxL y LpxM no consiguen usar el Lípido IV_a como sustrato y no añaden los lípidos unidos por O. Sin embargo, es posible que mutaciones en la *lpxL* (que codifica LpxL) o en la *lpxM* (que codifica LpxM) puedan alterar la especificidad de las enzimas, permitiendo que las transferasas usen el lípido IV_a como sustrato, y generando así un 6-acil lípido que funciona como un agonista del TLR4/MD-2. O pueden aparecer mutaciones en promotores o en reguladores de *lpxP* o de *pagP*, activando la expresión de estas transferasas normalmente ausentes o con muy poca abundancia. O pueden aparecer mutaciones en promotores o en reguladores de *lpxL* o de *lpxM*, que pueden activar su sobreexpresión.

Para ayudar a evitar estas situaciones, las bacterias de la presente invención pueden comprender adicionalmente una deleción (por ejemplo, una deleción parcial, una deleción sustancial, etc.) en uno o más de los siguientes genes: *lpxL*, *lpxM*, *pagP* y *lpxP*. O, en algunas realizaciones, una o más enzimas (por ejemplo, LpxL, LpxM, PagP, LpxP) están sustancialmente inactivadas en las bacterias. En algunas realizaciones, el gen *eptA* que codifica la transferasa de fosfoetanolamina del lípido A está parcialmente o sustancialmente delecionado. En algunas realizaciones, la bacteria es *E. coli* K-12 KPM279 (KPM22 $\Delta lpxL::Km^+$), KPM 280 (KPM22 $\Delta lpxM::Km^+$), KPM 288 (KPM22 L1 $\Delta lpxL::Km^+$), KPM 290 (KPM22 L11 $\Delta lpxL::Km^+$), KPM 296 (KPM22 L11 $\Delta lpxL$), KPM 300 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM::Km^+$), KPM 303 (KPM22 L11 $\Delta lpxL MpxM$), KPM310 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP::Km^+$), KPM312 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP$), KPM314 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP::Km^+$), KPM316 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$), KPM317 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP \Delta eptA::Km^+$) o KPM 318 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP \Delta eptA$) o derivados adicionales de estas cepas.

HERRAMIENTAS DE LABORATORIO

La presente divulgación también describe herramientas de laboratorio, reactivos, cepas (por ejemplo, cepas de base, cepas donantes), y similares, derivadas de las bacterias gramnegativas viables según se describe. Por ejemplo, las bacterias de la presente invención pueden ser competentes para la captación de ADN extracelular. Las bacterias pueden ser electrocompetentes. Las bacterias pueden comprender un medio para conferir resistencia a un antibiótico (por ejemplo, a kanamicina, penicilina, neomicina, ampicilina, etc.). Las bacterias pueden comprender un medio para expresar proteínas para el cribado de alto rendimiento con células. Las bacterias pueden comprender un medio para expresar proteínas recombinantes para investigación y/o para un uso terapéutico y/o diagnóstico.

Las bacterias pueden comprender al menos una mutación supresora adicional que permite el crecimiento por encima de 37 grados Celsius (por ejemplo, a 42 grados Celsius). Las mutaciones supresoras adicionales pueden estabilizar, por ejemplo, la membrana externa de las bacterias o mejorar el transporte de un precursor tóxico lejos de la membrana interna. En algunas realizaciones, las bacterias pueden crecer exponencialmente por encima de 37 grados Celsius, por ejemplo, a aproximadamente 38 grados Celsius, a aproximadamente 39 grados Celsius, a aproximadamente 40 grados Celsius, a aproximadamente 41 grados Celsius, a aproximadamente 42 grados Celsius.

En algunas realizaciones, las bacterias muestran un tiempo de duplicación de la fase exponencial de menos de aproximadamente 30 minutos por encima de 37 grados Celsius. O las bacterias pueden mostrar un tiempo de duplicación de la fase exponencial de menos de 35 minutos o de menos de 40 minutos o de menos de aproximadamente 45 minutos por encima de 37 grados Celsius. En algunas realizaciones, las bacterias muestran un tiempo de duplicación de la fase exponencial de menos de aproximadamente 30 minutos (o de menos de aproximadamente 35 minutos o de menos de aproximadamente 40 minutos o de menos de aproximadamente 45 minutos) por encima de 40 grados Celsius. En algunas realizaciones, las bacterias muestran un tiempo de duplicación de la fase exponencial de menos de aproximadamente 30 minutos (o de menos de aproximadamente 35 minutos o de menos de aproximadamente 40 minutos o de menos de aproximadamente 45 minutos) a 42 grados Celsius. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana es *E. coli* K-12 KPM296-6.

En algunas realizaciones, las mutaciones supresoras adicionales pueden alterar (por ejemplo, mejorar) la capacidad de las bacterias de crecer en varias concentraciones salinas. En algunas realizaciones, las bacterias gramnegativas viables son viables a una concentración salina (NaCl) de entre aproximadamente 0,1 M y 0,9 M.

Las cepas donantes pueden proporcionar la capacidad para construir rápidamente nuevas variantes de cepas. Las cepas donantes pueden comprender una o más de las modificaciones de genes mencionadas anteriormente, por ejemplo, deleciones parciales o sustanciales en uno de los siguientes genes: *lpxL*, *lpxM*, *lpxP*, *pagG*, *eptA*, *kdsD*, *gutQ*, etc. Cada construcción por deleción donante tiene un casete de un gen marcador seleccionable que sustituye a la secuencia de ADN delecionada, y el casete está flanqueado por sitios de deleción específicos de sitio en una orientación y una disposición tales que pueden ser usados posteriormente para delecionar el casete del gen marcador seleccionable cuando la correspondiente recombinasa es introducida de forma transitoria o temporal en la cepa.

En algunas realizaciones, las bacterias comprenden adicionalmente un plásmido F, un plásmido F' o genes que codifican la producción de pilus F. En algunas realizaciones, las bacterias pueden propagar bacteriófagos fd, M13, o bacteriófagos relacionados con fd o con M13. En algunas realizaciones, un gen que codifica para una enzima de restricción del ADN o para la enzima de metilación del ADN está mutado o deleciónado. Esto puede permitir un aumento en la transformación y/o en la clonación de ADN sin modificar o de ADN amplificado mediante una PCR. En algunas realizaciones un gen que codifica *recA* o *endA* está mutado, parcialmente deleciónado o sustancialmente deleciónado. Dicha inactivación o deleción de *recA* da como resultado un hospedador que produce predominantemente plásmidos de ADN monomérico después de la transformación con un plásmido. La inactivación de *endA* da lugar a un aumento en los rendimientos del ADN superenrollado de un plásmido introducido en dicha cepa.

La presente divulgación también describe una membrana externa de una bacteria gramnegativa que carece sustancialmente de un ligando que es un agonista de un receptor TLR4/MD2.

Las bacterias de la presente invención pueden usarse como cepas donantes. En algunas realizaciones, las cepas donantes pueden comprender una membrana externa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2. En algunas realizaciones, las cepas donantes comprenden un casete de ADN que comprende un gen que tiene una deleción en el marco abierto de lectura. Por ejemplo, el gen puede seleccionarse entre el grupo que consiste en *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y *eptA*. El casete de ADN puede comprender adicionalmente un medio para conferir resistencia a un antibiótico y/o un componente de recombinasa.

Las bacterias de la presente invención pueden conservar secuencias "cicatriz" de ADN en el (los) sitio(s) de las deleciones génicas modificadas, particularmente en uno o más de los genes seleccionados entre el grupo que consiste en *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y *eptA*. La "cicatriz" se produce tras la deleción del casete seleccionable mediante una recombinación específica de sitio. La recombinasa puede ser una seleccionada entre el grupo que consiste en FLP, Cre, Int/Xis, Hin, Gin o similares. La cicatriz producida puede ser activa para una posterior recombinación por parte de la misma recombinasa, o como alternativa, la cicatriz puede ser inactiva para acontecimientos de recombinación adicionales por parte de la misma recombinasa. La deleción del ADN del casete seleccionable da como resultado una cepa que puede ser usada de nuevo como receptora para una posterior transferencia de una deleción génica adicional mediante el uso de un casete seleccionable similar, facilitando así la construcción de múltiples deleciones génicas en una única cepa.

MÉTODOS

La presente divulgación también describe métodos de selección de una bacteria gramnegativa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2, en los que la bacteria es capaz de un crecimiento exponencial a una temperatura por encima de 40 grados Celsius. El método puede comprender el cultivo de la bacteria que carece sustancialmente del ligando que actúa como un agonista del receptor TLR4/MD2 (por ejemplo, el lípido A, el 6-*acil* lípido, etc.) y que tiene una mutación supresora que permite el crecimiento a entre aproximadamente 30 y 40 grados Celsius. Después las bacterias pueden colocarse en placas con un medio nutriente adecuado e incubarse a 42 grados Celsius. Las colonias individuales que aparecen en dichas condiciones representan las bacterias que carecen sustancialmente del ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2 y son capaces de un crecimiento exponencial a 42 grados Celsius.

La presente divulgación también describe métodos de construcción de bacterias que carecen sustancialmente de un gen seleccionado entre el grupo que consiste en *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y *eptA*. El método comprende la obtención de una bacteria gramnegativa viable que comprende (i) una membrana externa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2 y (ii) un casete de ADN que comprende un gen modificado, siendo el gen modificado un gen objetivo modificado que tiene una deleción en el marco de lectura abierto, comprendiendo adicionalmente el casete de ADN un medio para conferir resistencia a un antibiótico, y estando adicionalmente flanqueado por los sitios objetivo apropiados para una recombinasa específica de sitio. El método comprende adicionalmente someter las bacterias a una transducción con P1*vir* y la sustitución del gen objetivo por el gen del casete de resistencia modificado a través de una recombinación homóloga. Posteriormente, se introduce en las células una enzima recombinasa dirigida al sitio o el ADN que codifica la enzima, y esta enzima actúa sobre los correspondientes sitios de reconocimiento que flaquean el casete para catalizar la recombinación, dejando una secuencia de cicatriz únicamente en el cromosoma (véase el siguiente Ejemplo 3). Alternativamente, el casete de deleción génica descrito anteriormente puede ser introducido en el cromosoma de la cepa directamente mediante el uso de una forma lineal amplificada mediante una PCR del casete a través del método de recombinación homóloga "red-gam" (véase BMC Molecular Biology 2008, 9:20). Como anteriormente, el gen de resistencia es posteriormente deleciónado mediante el uso de una etapa de recombinación específica de sitio, dejando de nuevo una secuencia de "cicatriz". La transducción con P1*vir*, la recombinación red-gam mediante el uso de un ADN lineal y la recombinación dirigida al sitio son todas técnicas bien conocidas por el experto habitual en la materia.

Las bacterias, por ejemplo, las bacterias gramnegativas tales como *E. coli*, se usan habitualmente como sistemas de expresión para la amplificación de ADN o para la expresión de proteínas de interés. En algunos casos, el ADN o la proteína recogidos obtenidos a partir de las bacterias pueden estar contaminados por los componentes de la

bacteria, por ejemplo, ligandos que actúan como agonistas del TLR4/MD- 2 (por ejemplo, el lípido A, el LPS). La contaminación puede tener efectos perjudiciales sobre experimentos y procedimientos posteriores, tales como una transfección transitoria de líneas celulares hospedadoras de mamífero, el tratamiento de células de mamífero cultivadas que sirven como líneas indicadoras en ensayos de cribado basados en células.

5 La presente invención también presenta métodos para la producción de muestras de ADN sustancialmente exentas de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD-2. El método puede comprender la obtención de bacterias gramnegativas que comprenden una membrana externa que carece sustancialmente del ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD-2. Las bacterias son generalmente competentes para la captación de ADN extracelular. 10 Puede introducirse un vector de ADN en las bacterias a través de los métodos estándar bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Las bacterias funcionan amplificando el vector de ADN, y las bacterias pueden cultivarse en un medio apropiado. La muestra de ADN amplificada puede recogerse a partir de las bacterias a través de un protocolo de aislamiento de ADN estándar bien conocido por los expertos habituales en la materia. Debido a que las bacterias usadas para la amplificación del ADN carecen sustancialmente del ligando que actúa como un 15 agonista del TLR4/MD-2, la muestra de ADN también carece sustancialmente del ligando. El ADN aislado a partir de estas bacterias es de particular uso en la transfección transitoria de células de mamífero para la expresión de las proteínas codificadas por el plásmido. El LPS de la *E. coli* normal empleada como hospedador del plásmido puede afectar negativamente a la productividad y al rendimiento de la proteína de los procedimientos de transfección transitoria.

20 La presente invención también presenta métodos de producción de muestras de proteínas sustancialmente exentas de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2. El método puede comprender la obtención de bacterias gramnegativas que comprenden una membrana externa que carece sustancialmente del ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2 (las bacterias son competentes para la captación de ADN extracelular) y la introducción de 25 una construcción de un vector de expresión de ADN en las bacterias a través de los protocolos estándar bien conocidos para los expertos habituales en la materia. La construcción del vector de expresión de ADN comprende tanto un gen que codifica una proteína de interés expresada a partir de un promotor funcional, como un gen marcador seleccionable. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden mutaciones en o deleciones de al menos uno de los siguientes genes: *lola*, *loiB* o *lpp*.

30 Las bacterias transformadas con las construcciones de vectores de expresión de ADN pueden cultivarse a continuación (por ejemplo, a través de los métodos estándar) de forma que se permita que las bacterias expresen la proteína de interés. En algunas realizaciones, las bacterias son inducidas para que expresen la proteína de interés. Después la proteína de interés puede recogerse a partir de las bacterias a través de los métodos habituales. En 35 algunas realizaciones, las bacterias se retiran del medio de cultivo para dejar atrás la proteína de interés en el medio. Debido a que las bacterias usadas para la expresión de la proteína carecen del ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD-2, la muestra proteica también carecerá sustancialmente del ligando.

40 Las colecciones son herramientas extremadamente útiles para el cribado de diversas variantes de proteínas. La presente divulgación también describe una colección de bacterias, estando las bacterias sustancialmente exentas de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2. La colección de bacterias puede expresar una serie de variantes de una proteína. La colección de bacterias puede usarse para el cribado de variantes de proteínas para comprobar su actividad en un ensayo basado en células de mamífero, sin embargo, la presente divulgación no está limitada a los ensayos basados en células de mamífero. Los miembros de la colección pueden ser generados a 45 través de la expresión en fagos, a través de la mutagénesis de un vector de plásmido que expresa un miembro prototipo de la colección, o a través de otros métodos estándar.

Pueden proporcionarse diversos reactivos, cepas, y similares (o combinarse con otros reactivos, cepas, y similares) en forma de un kit. Por ejemplo, el kit puede comprender una bacteria gramnegativa viable que tiene una membrana externa sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2, en el que la bacteria es 50 competente para la captación de ADN extracelular.

Ejemplos

55 Los ejemplos proporcionados a continuación son meramente ejemplos para clarificar adicionalmente la presente invención, y no limitan el ámbito de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1: determinación de las tasas de crecimiento

60 Los siguientes ejemplos describen las mediciones de las tasas de crecimiento de varias cepas según la presente invención. La presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos. Las tasas de crecimiento de las cepas pueden ser determinadas mediante la monitorización de las densidades celulares a 600 nm de los cultivos en crecimiento exponencial. Los cultivos recientes de una noche pueden diluirse a 1:50 en medio precalentado para continuar el crecimiento de las bacterias hasta la fase de crecimiento exponencial intermedio (DO₆₀₀ de entre 0,5 y 65 0,6). Después, los cultivos pueden diluirse de nuevo hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,005 en medio precalentado para mantener las células creciendo exponencialmente para la determinación de los tiempos de

generación. El medio puede comprender medio Luria-Bertani (LB) y puede comprender adicionalmente 10 g/l de NaCl. Según se muestra en la FIG. 1, todas las KPM22 L1, KPM22 L11, KPM22 L13, KPM22 L18 y KPM22 L20 se cultivaron a 37 grados Celsius. La KPM22 L1, la KPM22 L11 y la KPM22 L18 tuvieron unos tiempos de generación de entre aproximadamente 36 y 44 minutos.

Según se muestra en la FIG. 2, la cepa de *E. coli* KPM288 (KPM22 L1 $\Delta lpxL::Km^+$) y la cepa KPM290 (KPM22 L11 $\Delta lpxL::Km^+$) se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37 grados Celsius o en medio LB complementado con 5-fosfato de D-arabinosa 15 μ M (A5P) y 6-fosfato de D-glucosa 10 μ M (G6P) a 37 °C. Se calculó que los tiempos de generación en medio LB eran como sigue: KPM288 45 min, KPM290 43 min. Los resultados del crecimiento en medio LB complementado con A5P y G6P eran como sigue: la KPM288 dejó de crecer exponencialmente después de 2-3 generaciones, KPM290 46 min.

Según se muestra en la FIG. 3, la cepa de *E. coli* KPM303 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM$) se cultivó a 37 °C en medio LB, en medio LB complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M, en medio Super Broth (SB) (que contiene 10 g/l de NaCl) o en medio SB (que contiene 10 g/l de NaCl) complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. El medio SB no mejora la tasa de crecimiento de KPM303 en comparación con el medio LB. Sin embargo, al contrario que el cultivo en el medio LB complementado con A5P y G6P, la KPM303 continuó creciendo exponencialmente después de 2-3 generaciones cuando se cultivó en SB complementado con A5P y G6P.

Según se muestra en la FIG. 4, las cepas de *E. coli* KPM303 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM$), KPM312 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP$) y KPM316 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$) se cultivaron a 37 °C en medio SB o en SB complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. Los tiempos de generación en medio SB eran como sigue: KPM303 54 min, KPM312 50 min, KPM316 46 min. Los tiempos de generación en medio SB complementado con A5P y G6P eran como sigue: KPM303 39 min, KPM312 42 min, KPM316 42 min.

Según se muestra en la FIG. 5, la cepa de *E. coli* KPM316 se cultivó a 37 °C en medio SB complementado con $MgSO_4$ 10 mM y $CaCl_2$ 2 mM o en medio SB complementado con $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. La KPM316 tuvo un tiempo de generación de 51 min en SB con $MgSO_4$ 10 mM y $CaCl_2$ 2 mM. La KPM316 tuvo un tiempo de generación de 46 minutos en SB con $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M.

Según se muestra en la FIG. 6, las cepas de *E. coli* KPM316 y KPM318 se cultivaron a 37 °C en medio SB o en medio SB complementado con A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. Las KPM316 y KPM318 mostraron unos tiempos de generación de 39-44 min en estos medios.

Ejemplo 2: generación de cepas resistentes a la temperatura

El siguiente ejemplo describe la generación de un derivado resistente a la temperatura de la KPM296. La presente invención no está limitada al siguiente ejemplo. Los cultivos recientes de una noche de KPM296 cultivada en medio LB a 37 °C pueden colocarse en placas de agar LB e incubarse a 42 °C. La incubación a 42 °C puede continuar durante varios días, por ejemplo, entre cuatro y cinco días. Pueden aparecer clones con capacidad de formación de colonias a 42 °C (que representan los derivados resistentes a 42 °C de la KPM296). Las cepas resistentes a 42 °C pueden ser confirmadas mediante el cultivo durante una noche en placas de agar LB a 42 °C. La KPM296-6 es un derivado resistente a 42 °C de la KPM296.

Según se muestra en la FIG. 7, las cepas de *E. coli* KPM296-6 y KPM316 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$) se cultivaron a 37 °C en SB con $MgSO_4$ 10 mM y $CaCl_2$ 2 mM, o en SB con $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M. La tasa de crecimiento de la KPM296-6 en medio SB con $MgSO_4$ 10 mM y $CaCl_2$ 2 mM era de 48 min. En SB con $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, A5P 15 μ M y G6P 10 μ M, la tasa de crecimiento de la KPM296-6 era de 42 min.

Según se muestra en la FIG. 8, se cultivó una serie de cepas de *E. coli* aisladas independientemente a partir de selecciones paralelas a 42 °C a partir de KPM296 en medio SB a 42 °C. Prácticamente todas las cepas clínicas ensayadas, incluyendo la KPM296-6, mostraron un crecimiento exponencial a 42 °C, con una amplia variación en los tiempos de duplicación. La cepa parental, KPM296, fue incapaz de crecer en LB ni en medio SB a 42 °C.

La KPM316 y la KPM318 también se han usado con éxito en la selección de una serie de cepas clínicas independientes capaces de crecer a 42 °C mediante este método.

Ejemplo 3: construcción de la cepa

El siguiente ejemplo describe la construcción de varias de las cepas mencionadas anteriormente. La presente invención no está limitada a estos ejemplos. Pueden generarse casetes de resistencia a la kanamicina dirigidos a los genes *lpxI*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y/o *eptA* en cepas donantes mediante el uso del procedimiento de la recombinasa del fago λ Red y transferirse después a una cepa KPM mediante una transducción con P1vir. La escisión del gen de resistencia a la kanamicina puede llevarse a cabo en presencia de la recombinasa FLP y puede eliminarse el plásmido colaborador sensible a la temperatura pCP20. La transducción con P1vir y otras técnicas similares son

bien conocidas por los expertos habituales en la materia.

Por ejemplo, puede generarse el casete $\Delta lpxL::Km^+$ en KPM22 para producir la cepa KPM279 (KPM22 $\Delta lpxL::Km^+$). La KPM279 puede usarse como donante para la transferencia del casete $\Delta lpxL::Km^+$ a la KPM22 L1 a través de una transducción con P1vir para producir la cepa KPM288 (KPM22 L1 $\Delta lpxL::Km^+$) o a KPM22 L11 a través de la transducción con P1vir para producir la cepa KPM290 (KPM22 L1 $\Delta lpxL::Km^+$).

Además, la cepa KPM316 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$) puede obtenerse a través de delecciones sucesivas de las transferasas de acilo (en el siguiente orden) mediante el uso de la KPM280 (KPM22 $\Delta lpxM::Km^+$), de BW30270 $\Delta lpxP::Km^+$ y de BW30270 $\Delta pagP::Km^+$ como cepas donantes de los casetes de direccionamiento, respectivamente: KPM 290 (KPM22 L11 $\Delta lpxL::Km^+$) > KPM 296 (KPM22 L11 $\Delta lpxL$) > KPM 300 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM::Km^+$) > KPM 303 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM$) > KPM310 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP::Km^+$) > KPM312 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP$) > KPM314 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP::Km^+$) > KPM316 (KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$).

La KPM318 derivaba de la KPM316 mediante una transducción con P1vir de la $\Delta eptA::Km^+$ creada mediante el procedimiento de la recombinasa λ Red en la BW30270 $\Delta eptA::Km^+$ para dar la KPM317 (KPM316 $\Delta eptA::Km^+$) que a continuación se curó del casete Km mediante una expresión transitoria de la recombinasa FLP. Se usó una amplificación mediante una PCR mediante el uso de cebadores que flanquean cada delección para confirmar las delecciones frente al ADN de control con respecto a la parental BW30270 (FIG 9). En cada caso, la cepa parental muestra un producto de la PCR mayor con los cebadores que flanquean el gen delecionado en la KPM318.

Ejemplo 4: otros reactivos y métodos

El siguiente ejemplo describe otros reactivos y métodos que pueden usarse según la presente invención. La presente invención no está limitada a estos ejemplos.

La presencia de una endotoxina (por ejemplo, el LPS) puede ser detectada a través de ensayos estándar. Por ejemplo, pueden usarse los kits de detección de LPS de HEK-Blue™ (invivogen, San Diego, CA). En este ensayo, las células HEK-Blue™-4 son extremadamente sensibles al LPS (lípidos A) y pueden usarse para detectar unas concentraciones de LPS (lípidos A) tan bajas como de 0,3 ng/ml. El ensayo puede llevarse a cabo según el protocolo del fabricante.

Con el kit detección de LPS de HEK-Blue™ se ensayaron células completas y también extractos de la membrana de las células. Se prepararon células y membranas externas naturales de control a partir de la BW30270 parental y se ensayaron con muestras de células y extractos de KPM316 y de KPM318. Los resultados, mostrados en la FIG. 10, demuestran que el ensayo de LPS HEK-Blue™ es extremadamente sensible a la endotoxina LPS, respondiendo a tan poco como 2 pg de LPS. Las señales en cualquiera de las muestras preparadas a partir de KPM316 o de KPM318 estaban esencialmente en los niveles de fondo, incluso con la adición de 20 microgramos de membrana externa en el ensayo, 9 órdenes de magnitud menos potente para la señalización TLR4/MD2. Las células completas de KPM316 o de KPM318 también eran incapaces de desencadenar una señal significativa con el mayor nivel ensayado, al contrario que las células completas de BW30270, que proporcionaron una respuesta significativa a unos niveles 4 órdenes de magnitud menores.

El análisis de los espectros de masas con ESI de los extractos de la membrana externa de KPM316 muestra las esperadas masas prominentes para el lípido IVA y el lípido IVA-Etanolamina (FIG. 11 panel A). La ESI-MS de las membranas externas de KPM318 mostraron únicamente el lípido IVA (FIG. 10 panel A), según se esperaba, dado que la transferasa de etanolamina había sido delecionada de esta cepa.

La transducción con P1vir es un método estándar usado para mover genes/alelos desde una cepa donante hasta una cepa receptora a través del P1vir, un bacteriófago mutante que entra en la fase lítica tras la infección. El P1 (P1vir) puede empaquetar aproximadamente 90 kb de ADN, por lo que generalmente se usa con un marcador seleccionable. Para llevar a cabo dichos experimentos, se cultivan las cepas donantes (y las cepas receptoras). Después puede añadirse el P1vir al cultivo de la cepa donante y monitorizarse hasta que el cultivo se haya lisado completamente. Después se recoge el lisado y se añade al cultivo de las células receptoras. Después de la incubación de las células receptoras con el lisado, las células receptoras se colocan en placas con medio selectivo para seleccionar las colonias con el marcador seleccionable (y por lo tanto, el gen de interés).

La secuencia completa de la cepa de *E. coli* K-12 se proporciona en Blattner FR *et al.* (Science, 5 de septiembre de 1997; 277 (5331): 1453-62) y en Riley M *et al.* (Nucleic Acids Res., 5 de enero de 2006; 34 (1): 1-9. Impresión de 2006). La generación de la cepa KPM316 se detalla en la Figura 12. El *msbA52* sustituye al alelo natural de *msbA*, en el que una C en 965895 es sustituida por una T, dando como resultado una Serina en lugar de una Prolina en el aminoácido 18 de la proteína MsbA (Figura 12a). Los siguientes fueron delecionados de la cepa parental: $\Delta gutQ$ (Figura 12b), $\Delta kdsD$ (Figura 12c), $\Delta lpxL$ (Figura 12d), $\Delta lpxM$ (Figura 12e), $\Delta pagP$ (Figura 12f) y $\Delta lpxP$ (Figura 12g). Se comparó la secuencia de la KPM316 con la de la cepa natural MG1655 (Figura 13). Las funciones de estas mutaciones son desconocidas.

La generación de la cepa KPM318 se detalla en la Figura 14. El *msbA52* sustituye al alelo natural de *msbA*, en el que una C en 965895 es sustituida por una T, dando como resultado una Serina en lugar de una Prolina en el aminoácido 18 de la proteína *MsbA* (Figura 14a). Los siguientes fueron deletados de la cepa parental: *ΔgutQ* (Figura 14b), *ΔkdsD* (Figura 14c), *ΔpxL* (Figura 14d), *ΔpxM* (Figura 14e), *ΔpagP* (Figura 14f), *ΔpxP* (Figura 14 g) y *ΔeptA* (Figura 14f). Algunos ejemplos de las cepas generadas se proporcionan en la Tabla 1.

Las cepas KPM318 y BW30270 se secuenciaron en las instalaciones de secuenciación Scripps Core DNA mediante el uso de un secuenciador de ADN Illumina. Las secuencias se generaron mediante el uso de lecturas de extremos apareados de 40 o 60 bases. Se prepararon muestras de ADN a partir de cada cepa y se usaron para generar colecciones con etiquetas terminales. Se analizaron hasta seis colecciones por carril, junto con un carril de referencia. Los otros carriles se usaron para lecturas adicionales de un ADN no relacionado, que servía como control interno adicional. Los polimorfismos de nucleótido individual (SNP) se refieren a todos los cambios de bases individuales definidos como 100 % mutantes por los programas de análisis Scripps cuando se comparan con el genoma de referencia, la cepa Blattners MG1655. Los polimorfismos de delección/inserción (DIP) se refieren a todas las delecciones o inserciones (de hasta 6 pb) definidas por los programas de análisis Scripps, de nuevo mediante el uso de MG1655 como referencia. Únicamente se proporcionan aquellas seleccionadas con unas lecturas del 100 %. Las delecciones génicas completas fueron confirmadas independientemente mediante alineaciones de la secuencia por separado. La secuencia de la KPM318 se comparó con la de la cepa natural BW30270 (Figura 15). La secuenciación identificó el alelo supresor *msbA-P18S*, que previamente se había establecido que existía en la cepa original KPM (Figuras 14 y 15). Se determinó que todos los cambios conocidos introducidos mediante la modificación de la cepa están presentes con una frecuencia del 100 %. Esto era cierto para todas las delecciones y mutaciones puntuales diseñadas.

Los derivados resistentes la temperatura de la KPM318 se aislaron en un intento de identificar cepas más robustas. Los cultivos de una noche de la KPM318 cultivados en medio LB a 37 °C se colocaron en placas de LB-agar y se incubaron a 42 °C. Únicamente después de una incubación continua de las placas a 42 °C durante entre cuatro y cinco días, se obtuvo un número de clones que recuperó su capacidad formadora de colonias a la elevada temperatura. El fenotipo resistente a 42 °C de clones seleccionados aleatoriamente se confirmó mediante un cultivo durante una noche en placas de LB-agar a 42 °C. Se identificó una serie de derivados resistentes a 42 °C independientes no clonales de la KPM318. De entre un total de 24 derivados de la KPM318 resistentes a la temperatura, las cepas KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 mostraron las mejores características de crecimiento, siendo capaces de crecer exponencialmente a unas temperaturas de 30 °C, de 37 °C y de 42 °C tanto en medio SB (Figuras 16, 18 y 20) como en unas condiciones de restauración de la biosíntesis del LPS en medio SB complementado con 5-fosfato de D-arabinosa 15 μM (A5P) y con 6-fosfato de D-glucosa 10 μM (G6P) (Figuras 17, 19 y 21). Por lo tanto, estas cepas resistentes la temperatura mostraron unas características de crecimiento robusto a lo largo de un intervalo de temperaturas.

Las cepas KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 se secuenciaron en las instalaciones de secuenciación Scripps Core DNA mediante el uso de un secuenciador de ADN Illumina (Figura 22). Se identificaron mutaciones específicas responsables de la viabilidad de las cepas a 42 °C. Las cepas KPM318-9 y KPM318-10 expresan una mutación *frr-D61Y* que altera el factor de reciclado ribosómico (Figuras 22a y 22b). La cepa KPM318-19 tiene una mutación del marco de lectura en *efp*, que codifica el factor de elongación P (Figura 22c). La cepa KPM318-23 tiene una delección de P146 y de L147 en *dcd*, que codifica el gen de la desaminasa de desoxicitidina (Figura 22d). Las funciones específicas de estas mutaciones son desconocidas.

Se analizó la composición de LPS/lípido IVA de las cepas KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23. Los cultivos (2,5 l de cada uno) se cultivaron a 42 °C hasta la fase estacionaria bien en medio LB o bien en medio LB complementado con A5P/G6P. El LPS/lípido IVA se extrajo a partir de la biomasa seca de cada cepa mediante el uso del procedimiento original de fenol-cloroformo-éter de petróleo (PCP) para las cepas cultivadas en medio LB con A5P/G6P, o con un protocolo de PCP modificado para las cepas cultivadas únicamente en medio LB. Después, los extractos se sometieron a una espectrometría de masas ESI FT-ICR. La cepa KPM318-23 cultivada en medio LB expresa predominantemente el lípido IVa (pico a 1404,86 u) a 42 °C (Figura 23). Cuando los derivados de KPM318 resistentes a 42 °C se cultivaron en medio LB complementado con A5P/G6P, se restauró la biosíntesis del oligosacárido del núcleo de *E. coli* K-12. Se produjo la expresión de una mezcla similar de diferentes glicofomas en todas las cepas, a pesar de estar unidas al precursor tetraacilado del lípido IV_a (Figuras 24-26). El LPS aislado a partir de la cepa parental KPM318 cultivada a 37 °C en medio LB complementado con A5P/G6P se usó como control para todos los experimentos (Figura 27). Varias de las masas moleculares de las diferentes glicofomas expresadas por la KPM318 pudieron ser asignadas, y se proporcionan en la Tabla 2. Tomada conjuntamente, la composición global de LPS/lípido IVA de los derivados de KPM318 resistentes a 42 °C no mostró ninguna peculiaridad con respecto a la composición típica del oligosacárido heterogéneo del núcleo de K-12. Ninguna de las preparaciones de membrana externa de estas cepas mostró lípido A; únicamente contenían el lípido IVa.

Se analizó la actividad biológica tanto de las células bacterianas como del LPS/lípido IVA aislado a partir de diversas cepas de KPM cultivadas en medio LB/SB o en medio LB/SB complementado con A5P/G6P mediante el uso del ensayo de detección de LPS de HEK-Blue (InvivoGen). Para la preparación de las células bacterianas para este ensayo de detección, se sedimentó 1 ml de un cultivo de una noche de cada cepa mediante una centrifugación y se

lavó con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS). Para destruir las células bacterianas, el sedimento se resuspendió posteriormente en 1 ml de una solución en DPBS a una concentración de 10 x de penicilina-estreptomina (Pen-Estrep) en. La mezcla se incubó a la temperatura ambiente durante 2 h y se almacenó a 4 °C durante una noche. Al mismo tiempo se prepararon direcciones sucesivas de los cultivos de una noche para el cálculo del número de células (ufc/ml) de los cultivos de una noche / células destruidas por la Pen-Estrep. Las suspensiones en Pen-Estrep de las cepas se diluyeron a 10⁸ ufc/ml en una solución en DPBS a una concentración de 10 x de Pen-Estrep, y después se prepararon diluciones sucesivas de las suspensiones en una solución en DPBS a una concentración de 10 x de Pen-Estrep para producir suspensiones de células bacterianas de 10⁷, de 10⁶, de 10⁵, de 10⁴, de 10³, de 10² y de 10¹ ufc/ml. En la Figura 28 se muestra un ensayo de detección de LPS de HEK-Blue típico mediante el uso de las diluciones sucesivas de las suspensiones de las células bacterianas de las cepas BW30270, KPM316 y KPM318. Hay entre poca y ninguna actividad de LPS en las suspensiones de células bacterianas de las cepas KPM316 y KPM318 cultivadas en medio LB, en comparación con la cepa de control BW30270. Hay un ligero aumento en la actividad para las cepas KPM316 y KPM318 cultivadas en medio complementado con A5P/G6P. Hay entre poca y ninguna activación del NFκB inducida por las diluciones sucesivas de las muestras de LPS/lípido IVa aisladas a partir de las cepas KPM316 y KPM318 (Figura 29).

Se compara la actividad biológica del LPS/lípido IVa aislado a partir de la cepa resistente a la temperatura KPM318-9 cultivada a 42 °C únicamente en medio LB y en medio LB complementado con A5P/G6P con la capacidad de las muestras de LPS/lípido IVa procedentes de BW30270, de KPM316 y de KPM318 para inducir la activación del NFκB en las células HEK-Blue. La cepa BW30270 se cultivó a 37 °C en medio LB, mientras que las cepas KPM316 y KPM318 se cultivaron a 37 °C en medio LB o en medio LB que contiene A5P/G6P. Para analizar la potencial actividad antagonista de la KPM318-9, se mezclaron unas cantidades constantes del LPS/lípido IVa aislado a partir de la KPM318-9 (256 pg) con cantidades de crecientes de LPS derivado de la BW30270. El LPS/lípido IVa procedente de la LPM318-9 es un potente antagonista de la actividad del LPS, según se demuestra por la capacidad de BW30270 de competir con este antagonista cuando está presente a elevadas concentraciones (Figura 29, carriles 9-12).

Se llevó a cabo un ELISA del TNF-alfa humano con muestras de LPS/lípido IVa aisladas a partir de las cepas KPM316 y KPM318 cultivadas a 37 °C en medio LB o en medio LB que contiene A5P/G6P (Figuras 30-32). El S-LPS aislado a partir de la *E. coli* K-235 se usó como control positivo. La sangre se separó mediante el uso de Biocoll (densidad: 1,077 g/ml). Los linfocitos mononucleares (MNC) se aislaron y se lavaron dos veces con Hank y una vez con VLE RPMI. Los monocitos se diferenciaron en macrófagos mediante su incubación en bolsas de Teflón con M-CSF. Los macrófagos se recogieron después de 7 días. Se determinó el número de células. Los macrófagos se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos a 1 x 10⁵ células/pocillo en VLE RPMI + 100 U de penicilina + 100 µg/ml de estreptomina + L-glutamina 2 mM + 4 % de suero AB (y sin suero). Las muestras de LPS/lípido IVa se aislaron a partir de las cepas KPM316 y KPM318 y se preincubaron a 37 °C y con un 5 % de CO₂ durante 30 min. Se añadió S-LPS K-235 a las muestras durante 4 h. Los sobrenadantes se retiraron y se almacenaron durante una noche a 4 °C. Se llevó a cabo un ELISA para evaluar la actividad del TNF-alfa (BD Biosciences #555212). Se prepararon diluciones sucesivas de las muestras de LPS en VLE RPMI sin suero AB. Se preparó LPS LBAG de KPM318 LPS LB, de KPM316 LPS LB, de KPM 318 LPS LBAG y de KPM 316 a 1 mg/ml en HEPES 20 mM, a pH 7,0. Después se prepararon diluciones sucesivas desde 100 µg/ml hasta 1 ng/ml. Las placas se recubrieron con el anticuerpo de captura, que se diluyó a 1:250 en tampón de recubrimiento (PBS). La placa se agitó durante una noche y después se lavó tres veces con tampón de lavado. La placa se bloqueó con 180 µl del diluyente del ensayo/pocillo y se agitó a la temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado.

Las muestras se diluyeron con el diluyente del ensayo y se prepararon diluciones sucesivas del patrón como sigue:

1:212 = 500 pg/ml
 1:2 = 250 pg/ml
 1:2 = 125 pg/ml
 1:2 = 62,5 pg/ml
 1:2 = 31,25 pg/ml
 1:2 = 15,6 pg/ml
 1:2 = 7,8 pg/ml
 1:2 = 3,9 pg/ml

Las placas se agitaron con el patrón, las muestras y un blanco a la temperatura ambiente durante 2 h. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado. Se añadieron la solución de detección y el anticuerpo de detección (anti-TNF-alfa humano biotinilado) a la placa a 1:1.000. Se añadió el reactivo enzimático (conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante) a 1:250. La placa se agitó a la temperatura ambiente durante 1 h y después se lavó tres veces con tampón de lavado. La placa se agitó en la oscuridad con TMB (1:20) en tampón de sustrato. La placa se incubó durante un mínimo de 30 min hasta que los pocillos se volvieron de color azul. La reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de H₂SO₄. Se midió la absorbancia a 450 nm. El LPS/lípido IVa aislado a partir del control positivo K-235 aumentó potentemente la actividad del TNF-alfa a todas las concentraciones ensayadas (Figura 30). El LPS/lípido IVa procedente de las cepas KPM316 y KPM318 era capaz de inhibir la inducción del TNF-alfa por parte LPS del derivado de la K-235 a todas las concentraciones ensayadas (Figura 30); por lo tanto, el LPS/lípido IVa aislado a

partir de las cepas KPM316 y KPM318 es un potente antagonista de la actividad del LPS. El LPS/lípido IVa procedente de las cepas KPM316 y KPM318 cultivadas en un medio que contiene un 4 % de suero AB era capaz de inhibir la liberación del TNF-alfa por parte de los macrófagos (Figura 31). El LPS/lípido IVa procedente de las cepas KPM316 y KPM318 cultivadas en medio exento de suero era capaz de inhibir la liberación del TNF-alfa por parte de los macrófagos (Figura 32). Por lo tanto, el LPS/lípido IVa aislado a partir de las cepas KPM316 y KPM318 es un potente inhibidor de la actividad del TNF-alfa.

Se sabe que el LPS ejerce sus funciones antiinflamatorias a través de la activación del receptor TLR4 en las células humanas. Se evaluó la actividad biológica del LPS/lípido IVa procedente de las cepas KPM316 y KPM318 mediante la valoración de la liberación de cepas IL-8 a partir de HEK293 hTLR4/MD2 #33 (Figura 33) y de HEK293 hTLR24 #2 células (Figura 34). Las células hTLR4/MD2 #33 respondieron a la unión del LPS generando una señal, mientras que las células HEK293 hTLR4 #2 respondieron al peptidoglicano, pero no al LPS. Por lo tanto, la última línea celular puede usarse para evaluar la especificidad del LPS. El S-LPS procedente de la cepa K-235 se usó como control positivo en estos ensayos. El medio de las células HEK293 hTLR4/MD2 #33 era DMEM (Biocrom) complementado con Pen/Estrep/Glu y un 10 % de FCS. Había 50.000 células HEK293 hTLR4/MD2 #33/pocillo sembradas en los pocillos. Las células fueron estimuladas en presencia de las muestras de LPS/lípido IVa durante un periodo de 24 h, seguido de la medición de la liberación de la IL-8 humana (BD Biosciences #555244). El LPS/lípido IVa procedente de las cepas KPM316 y KPM318 era capaz de bloquear la liberación de IL-8 por parte de las células HEK293 hTLR4/MD2 #33 (Figura 33). Los extractos de LPS/lípido IVa procedentes de las cepas eran extractos en bruto, ya que eran capaces de promover la liberación de la IL-8 por parte de las células HEK293 hTLR2 #2 (Figura 34). El TLR2 es un receptor para el peptidoglicano, otro componente bacteriano que puede provocar la señalización de las citocinas. La abundancia del peptidoglicano libre es normalmente bastante menor que los niveles de LPS, por lo que habitualmente es un componente menor. Aquí se usa para demostrar que los extractos contienen de hecho material derivado de la membrana externa-periplasma de las células, dado que aquí es donde se ubica el peptidoglicano. Las células HEK que sobreexpresan el TLR4/MD2 (la línea celular #33) respondieron a la unión del LPS, es decir, liberaron IL-8 (Figura 33), mientras que las células HEK que sobreexpresan el TLR2 (la línea celular #2), que responden al peptidoglicano, no responden al LPS (Figura 34). Por lo tanto, este control confirma que de hecho se había añadido algo de los extractos de la membrana externa a los ensayos en ambos casos.

Se evaluó la capacidad de las cepas KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 para sobreexpresar los genes heterólogos. Se usó la proteína de fusión MalE-LacZ α como modelo de proteína para investigar la capacidad de estas cepas de expresar las variantes citoplasmática y periplásmica de la proteína MalE en grandes cantidades en unas condiciones de crecimiento estándar y con inducción. Cada una de las cepas BW30270, KPM318, KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 fue transformada con los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 para la expresión citoplasmática (Figura 35, panel superior) y con MalE-LacZ α para la periplásmica (Figura 35, panel inferior), respectivamente. Se obtuvieron las siguientes cepas:

BW30270/pMAL-c2 (control)
 KPM318/pMAL-c2
 KPM318-9/pMAL-c2
 KPM318-10/pMAL-c2
 KPM318-19/pMAL-c2
 KPM318-23/pMAL-c2
 BW30270/pMAL-p2 (control)
 KPM318/pMAL-p2
 KPM318-9/pMAL-p2
 KPM318-10/pMAL-p2
 KPM318-19/pMAL-p2
 KPM318-23/pMAL-p2

Para inducir la expresión de MalE-LacZ α se añadió isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0,4 mM cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial intermedio a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. Para las cepas portadoras del plásmido pMAL-c2, las células se recogieron antes de la inducción (no inducidas), 3 h después de la inducción, así como después de una inducción durante una noche. Para las cepas con el plásmido pMAL-p2, las muestras se tomaron de las células no inducidas y después de unos tiempos de inducción de 3 h, de 6 h, de 12 h y de 24 h. Adicionalmente se analizó la capacidad de secretar la proteína MalE-LacZ α en el medio para las cepas portadoras del plásmido pMAL-p2, usando las cepas pMAL-c2 como controles. Se prepararon extractos de proteínas mediante el uso del reactivo de BugBuster según las recomendaciones del fabricante (Novagen). Se llevaron a cabo análisis de inmunotransferencia Western mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra la MalE (NEB) para detectar la expresión de la MalE-LacZ α .

Los niveles de expresión de la MalE-LacZ α eran los más altos en las 3 h posteriores a la inducción en las cepas pMAL-c2, y en las 3 h y 6 h posteriores a la inducción a las cepas pMAL-p2 (Figuras 36-42). La expresión de la MalE-LacZ α era coherentemente la más alta en las cepas KPM318, KPM318-9 y KPM318-10, mostrando unos niveles de expresión prácticamente idénticos a los de los controles naturales BW30270 (Figuras 36-42). Como se

esperaba, ni los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie ni los inmunotransferidos detectaron la MalE-LacZ α en los medios de cultivo de las cepas portadoras del plásmido pMAL-c2 para la expresión citoplasmática de la proteína (Figuras 36-42). Por el contrario, la abundancia de la proteína MalE-LacZ α en los medios de cultivo de las cepas pMAL-p2 aparentemente aumentó al aumentar la duración de la inducción con IPTG. Esto no sólo era aplicable a todos los mutantes KPM, sino también a la cepa natural BW30270 (Figuras 36-42). No se sabe si la presencia de la MalE-LacZ α en el medio de cultivo es el resultado de la secreción de la proteína como resultado de una membrana externa comprometida en las cepas KPM, o simplemente por una lisis celular debida a la sobreexpresión periplásmica de la proteína en las condiciones experimentales usadas en este estudio. Se sabe que la MBP es muy expresada en *E. coli*. Los derivados de KPM18 resistentes a la temperatura mostraron unos niveles de expresión de la proteína similares a los de la cepa de control natural BW30270. Estas cepas secretan o pierden MBP más fácilmente que la cepa natural, lo que permite la recolección de la proteína en ausencia de una lisis celular.

Se investigó la capacidad de KPM318 y de sus derivados resistentes a la temperatura para producir la proteína ApoA1 humana. Se sintetizó el gen *apoA1* con el uso de codones optimizados para *E. coli* y se clonó bajo el control del promotor Tn5 en pJexpress404 por la compañía DNA 2.0. Para la expresión periplásmica de la ApoA1, el gen se fusionó con la secuencia líder del *ompA* para la principal proteína de la membrana externa A de *E. coli*. Además, tanto la versión citoplasmática como la periplásmica del gen *apoA1* se fusionaron C-terminalmente con una secuencia codificante de 6x His:tag. Las cepas fueron transformadas con pJexpress404:51149 y pJexpress404:51150 para la expresión citoplasmática (Figura 43, panel superior) y periplásmica de la ApoA1 (Figura 43, panel inferior), respectivamente. A pesar de los diversos intentos, la cepa KPM318-23 no pudo ser transformada con los vectores de expresión pJexpress404:51149 y pJexpress404:51150. Se obtuvieron las siguientes cepas:

1. BW30270/pJexpress404:51149 (control)
2. KPM318/pJexpress404:51149
3. KPM318-9/pJexpress404:51149
4. KPM318-10/pJexpress404:51149
5. KPM318-19/pJexpress404:51149
6. BW30270/pJexpress404:51150 (control)
7. KPM318/pJexpress404:51150
8. KPM318-9/pJexpress404:51150
9. KPM318-10/pJexpress404:51150
10. KPM318-19/pJexpress404:51150

Los cultivos se cultivaron durante una noche a 37 °C en 5 ml de medio SB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina. Los cultivos de una noche (1:50) se diluyeron en 40 ml de medio SB precalentado que contiene 100 μ g/ml de ampicilina. Los cultivos se cultivaron a 37 °C y se agitaron a 250 rpm hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. Se determinó el número de células (ufc/ml) para cada cepa (Tabla 3). Los cultivos no inducidos se centrifugaron durante 10 min a 6.000 rpm (4 °C). Se obtuvo una alícuota de 1 ml de cada sobrenadante de cultivo que expresa el pJexpress404:51150 para un análisis adicional. Los sobrenadantes de cultivo de 1 ml y los sedimentos celulares se congelaron y se almacenaron a -80 °C. Se añadió IPTG a los cultivos (a una concentración final de 0,4 mM). Las células se incubaron a 37 °C y se agitaron a 250 rpm durante 3 h. Se evaluó el número de células (ufc/ml) para cada cepa (Tabla 4). Después de una inducción de 3 h, se retiraron 5 ml de cada cultivo:

1. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
2. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
3. KPM318-42C 9/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
4. KPM318-42C 10/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
5. KPM318-42C 19/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
6. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (3 h)
7. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (3 h)
8. KPM318-42C 9/pJexpress404:51150 - inducido (3 h)
9. KPM318-42C 10/pJexpress404:51150 - inducido (3 h)
10. KPM318-42C 19/pJexpress404:51150 - inducido (3 h)

Los cultivos inducidos se centrifugaron durante 10 min a 6.000 rpm (4 °C). Se obtuvo una alícuota de 1 ml de cada sobrenadante de cultivo de pJexpress404:51150 para un análisis adicional. Los sobrenadantes de cultivo de 1 ml y los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C. La inducción se continuó a 37 °C y a 250 rpm. Se determinó el número de células (ufc/ml) para cada cultivo de cepa después de una inducción de 6 h (Tabla 5). Se retiró una alícuota de 3 ml de cada cultivo después de una inducción de 6 h:

1. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
2. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
3. KPM318-42C 9/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
4. KPM318-42C 10/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
5. KPM318-42C 19/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)

6. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
7. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
8. KPM318-42C 9/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318-42C 10/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
- 5 10. KPM318-42C 19/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)

Los cultivos inducidos se centrifugaron durante 10 min a 6.000 rpm (4 °C)

- Se extrajo una alícuota de 1 ml de cada sobrenadante de cultivo de pJexpress404:51150 para un análisis adicional. Los sobrenadantes de cultivo de 1 ml y los sedimentos celulares se congelaron y se almacenaron a -80 °C. La inducción se continuó a 37 °C y a 250 rpm). Se determinó el número de células (ufc/ml) para cada cepa después de una inducción de 12 h (Tabla 6). Se retiró una alícuota de 2 ml de cada cultivo después de la inducción de 12 h:

1. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
2. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
- 15 3. KPM318-42C 9/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
4. KPM318-42C 10/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. KPM318-42C 19/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
6. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
7. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
- 20 8. KPM318-42C 9/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
9. KPM318-42C 10/pJexpress404:51150-inducido (12 h)
10. KPM318-42C 19/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)

- Los cultivos inducidos se centrifugaron durante 10 min a 6.000 rpm (4 °C). Se obtuvo 1 ml de cada sobrenadante de cultivo de pJexpress404:51150 para un análisis adicional. Los sobrenadantes de cultivo de 1 ml y los sedimentos celulares se congelaron y se almacenaron a -80 °C. La inducción se continuó a 37 °C y a 250 rpm. Se determinó el número de células (ufc/ml) para cada cepa después de una inducción de 24 h (Tabla 7). Se retiró una alícuota de 1 ml de cada cultivo después de la inducción de 24 h:

- 30 1. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
2. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
3. KPM318-42C 9/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
4. KPM318-42C 10/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
5. KPM318-42C 19/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
- 35 6. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
7. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
8. KPM318-42C 9/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
9. KPM318-42C 10/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
- 40 10. KPM318-42C 19/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

- Los cultivos fueron inducidos durante 10 min a 6.000 rpm (4 °C). Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo de pJexpress404:51150 para un análisis adicional. Los sobrenadantes de cultivo de 1 ml y los sedimentos celulares se congelaron y se almacenaron a -80 °C. Las células no inducidas y las inducidas se descongelaron, y todos los sedimentos celulares se resuspendieron en 300 µl de BugBuster 1 x. Se añadieron a las muestras 3 µl de una solución de lisozima de 20 mg/ml y 0,5 µl de benzonasa. Las muestras se incubaron a la temperatura ambiente durante 20 min con agitación. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min (4 °C). El Bug Buster 1 x contiene:

- 1 ml de BugBuster 10 x conc.
- 50 200 µl de Tris-HCl 1 M, a pH 7,5 (Tris-HCl 20 mM, a pH 7,5)
- 3,5 µl de 2-mercaptoEtOH (2-mercaptoEtOH 5 mM)

- Tanto la versión citoplasmática como la periplásmica de la proteína ApoA1 humana, según se analizó mediante una SDS-PAGE al 12 %, eran expresadas en las cepas de *E coli* BW30270, KPM318, KPM318-9 y KPM318-10, pero no en la KPM318-19 (Figuras 44- 49). La masa molecular relativa aparente de la banda de 29 kDa estaba de acuerdo con la masa calculada de la proteína (29,4 kDa) fusionada con la etiqueta de histidina C terminal. Sorprendentemente, la ApoA1 expresada periplásmicamente migró en forma de dos bandas con unas masas moleculares relativas aparentes de 29 kDa y de 31 kDa, siendo la última coherente con la masa calculada de la ApoA1 no procesada de 31,4 kDa (Figuras 47 y 48). Previamente se había demostrado que la ApoA1 es expresada en el citoplasma de *E. coli* en forma de una mezcla de proteína soluble e insoluble, lo que sugiere que la supuesta forma no procesada de la ApoA1 constituye la fracción insoluble de la proteína que no es accesible al transporte a su destino final en el periplasma ni a su procesado. Sin embargo, actualmente no podemos descartar la posibilidad de que la aparición de la banda de migración más lenta sea el resultado de una preparación de la muestra a 95 °C durante 2 min antes de la SDS-PAGE. En cualquier caso, los resultados indican que la tasa de expresión de la ApoA1 en las cepas KPM era al menos tan alta como en la BW30270, lo que muestra un nivel estacionario durante al menos 6 h.

Al contrario que los experimentos realizados con la MalE-LacZ α , el volumen del medio de cultivo para los análisis de SDS-PAGE se ajustó con respecto a la densidad óptica (DO₆₀₀) de las células portadoras del pJexpress404:51150, de forma que la cantidad de sobrenadante de cultivo cargado en el gel de poliacrilamida procediera de un único y el mismo valor de DO₆₀₀ (Tablas 8 - 12). Notablemente suficiente, y según se presenta para la cepa KPM318-10/pJexpress404:51150 en la Figura 50, las densidades ópticas celulares de todas las cepas resistentes la temperatura aumentaron, mientras que el número de células viables disminuyó a lo largo de todo el periodo de inducción con IPTG (Tablas 3 - 7). Según se muestra en las Figuras 51 - 53, las cepas portadoras del plásmido pJexpress404:51150 no eran capaces de secretar la ApoA1 en el medio de cultivo. Las bandas débilmente teñidas con Coomassie se parecían más al patrón de bandas de proteínas de los extractos celulares, y por lo tanto, lo más probablemente procedían de la lisis celular. Mediante el uso de inmunotransferidos con un anticuerpo de Penta-His (QIAGEN), pudimos corroborar todos los hallazgos de los análisis de la SDS-PAGE (Figuras 54 - 62). Tomados conjuntamente, nuestros datos sugieren que los derivados de la KPM318 resistentes a 42 °C KPM318-9 y KPM318-10 son los hospedadores adecuados para la expresión de proteínas. La optimización de las condiciones para el crecimiento bacteriano, la inducción y la preparación de las muestras deberían mejorar adicionalmente la tasa de expresión y el rendimiento de las proteínas de interés.

Se evaluó la capacidad de transformación del ADN de las células. Para la preparación de células electrocompetentes, los cultivos se cultivaron hasta una fase de crecimiento exponencial intermedio (DO₆₀₀ = 0,5 - 0,7) a 37 °C con agitación vigorosa (220 rpm). Posteriormente, las células se lavaron tres veces con agua enfriada en hielo y dos veces con glicerol al 10 % enfriado en hielo. Finalmente, los sedimentos celulares se resuspendieron en un pequeño volumen de glicerol al 10 % enfriado en hielo, y se prepararon alícuotas de 50 μ l para su almacenamiento a -80 °C. En primer lugar analizamos la influencia de la restauración de la biosíntesis de los oligosacáridos del núcleo K-12 sobre la transformación de KPM318 con pMAL-c2. La cepa BW30270 se cultivó en medio LB como control, mientras que la KPM318 se cultivó en medio LB y en medio LB que contiene A5P/G6P. Las células se recogieron para la preparación de células electrocompetentes cuando las cepas BW30270, KPM318 (LB) y KPM318 (LB A5P/G6P) alcanzaron a una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,621, de 0,613 y de 0,519, respectivamente. Con objeto de usar una y el mismo número de células electrocompetentes para la transformación, determinamos el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de las células competentes de cada cepa (Tabla 13).

Las células electrocompetentes de KPM318 (LB) y de KPM318 (LB A5P/G6P) se diluyeron a $7,3 \times 10^8$ ufc/ml con glicerol al 10 % enfriado en hielo ($3,65 \times 10^7$ ufc/50 μ l) y cada una se transformó con 25 ng del plásmido pMAL-c2 (Fig. 35). Las mezclas de transformación se diluyeron sucesivamente, se colocaron en placas de agar LB que contienen 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C. Los resultados de la Tabla 14 demuestran que las cepas BW30270, KPM318 (LB) y KPM318 (LB A5P/G6P) se habían transformado con una eficacia similar. Los datos muestran adicionalmente que la KPM318 que expresa predominantemente el lípido IVa en la membrana externa cuando se cultiva únicamente en medio LB (Figura 11) no era transformada con una eficacia tan alta como la BW30270 o la KPM318 en las condiciones de restauración de la biosíntesis de los oligosacáridos del núcleo.

Se aisló el plásmido pMAL-c2 a partir de cuatro transformantes seleccionados aleatoriamente de cada cepa a partir de 5 ml de cultivos de una noche en medio LB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina a 37 °C y 200 rpm. Los plásmidos se aislaron mediante el uso del sistema de purificación de ADN Wizard *Plus* Minipreps System (Promega). Posteriormente, las muestras de 1 μ l se analizaron en un gel de agarosa al 0,8 % en tampón de TBE (Figura 63). Los resultados de la electroforesis indicaron que el rendimiento del plásmido pMAL-c2 era aparentemente casi idéntico para las cepas de *E. coli* BW30270/pMAL-c2, KPM318 (LB)/pMAL-c2 y KPM318 (LB A5P/G6P)/pMAL-c2.

Como siguiente etapa, se transformó cada derivado de KPM318 resistente a 42 °C KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 con los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 (Figura 35). Las células se cultivaron en medio SB a 37 °C y se recogieron para la preparación de células electrocompetentes cuando las KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 alcanzaron una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,618, de 0,596, de 0,491 y de 0,702, respectivamente. Cada una de las células electrocompetentes se transformó con 25 ng de pMAL-c2 y con 25 ng de pMAL-p2. Después se colocaron diluciones sucesivas de las mezclas de transformación en placas de agar LB con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C. Las eficacias de transformación para las cepas de KPM318 resistentes a 42 °C se resumen en la Tabla 15. Mientras que las cepas KPM318-9, KPM318-10 y KPM318-19 fueron transformadas con una elevada eficacia, la capacidad de KPM318-23 para captar los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 únicamente era marginal. De hecho, el último resultado era coherente con el fracaso en la transformación de KPM318-23 con los plásmidos pJexpress404:51149 y pJexpress404:51150.

Los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 se aislaron a partir 5 ml de cultivos de una noche de dos transformantes seleccionados aleatoriamente de KPM318-9/pMAL-c2, KPM318-9/pMAL-p2, KPM318-10/pMAL-c2 y KPM318-10/pMAL-p2, mediante el uso del sistema de purificación de ADN Wizard *Plus* Minipreps según las recomendaciones del fabricante (Promega). Las muestras (1 μ l de cada una) se analizaron en gel de agarosa al 0,8 % en tampón de TBE (Figura 64). Finalmente, se determinaron los rendimientos de los plásmidos aislados para aquellas cepas que habían sido usadas subsiguientemente en los estudios de expresión de proteínas descritos anteriormente (Tabla 16). Tomados conjuntamente, tanto la elevada eficacia de transformación como el aceptable rendimiento del ADN del plásmido obtenidos a partir de un cultivo estándar de miniprep sugieren que la KPM318-9 y la KPM318-10 son las "cepas de base" adecuadas para el desarrollo de cepas de producción de ADN de plásmido.

Para desarrollar una "cepa de base" KPM dedicada el cribado de proteínas derivadas de colecciones de expresión en fago, la cepa debería tener un plásmido F' para permitir la infección con el fago M13. Hemos usado *E. coli* JC19022 (F'121 Tn 10) como cepa donante para la transferencia del plásmido F'121 Tn 10 a BW30270, KPM318, KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23 mediante un protocolo de apareamiento en tubo. Los cultivos se cultivaron durante una noche en 5 ml de medio a 37 °C con agitación vigorosa (220 rpm). Se usó medio LB que contiene 10 µg/ml de tetraciclina para JC19022 (F'121 Tn 10), medio LB para BW30270, y medio LB complementado con A5P/G6P para KPM318 y sus derivados resistentes a la temperatura. Se establecieron las siguientes diluciones de los cultivos de una noche mediante el uso del mismo medio al usado para el cultivo de una noche:

	25 µl → 5 ml
Donante:	50 µl → 5 ml
	100 µl → 5 ml
	200 µl → 5 ml
	25 µl → 5 ml
Receptores:	50 µl → 5 ml
	100 µl → 5 ml
	200 µl → 5 ml

Las muestras se agitaron vigorosamente (220 rpm) a 37 °C durante entre aproximadamente 2 y 3 h. Se registró la densidad óptica (DO₆₀₀) de las suspensiones (1 ml). El intervalo óptimo de la DO₆₀₀ es de entre 0,08 y 0,2; debe usarse la dilución la DO₆₀₀ más cercana 0,1 si hay opciones disponibles (esto es cierto para los cultivos donante y receptor). Con objeto de eliminar la tetraciclina del medio de la cepa donante, el cultivo debe ser centrifugado, y el sedimento celular debe ser resuspendido en 4 ml de medio LB. Se usa una proporción de 1:1 de donante:receptor para la transferencia. Se determina la dilución de la dilución donante y se multiplica por 500. Este valor se divide por la DO₆₀₀ del receptor para obtener la cantidad de receptor en µl que se debe añadir a 500 µl del donante. El cultivo donante (500 µl) se incuba con las cantidades apropiadas de los cultivos receptores (Tablas 17 y 18). Los cultivos de apareamiento se incuban a 37 °C durante 2 h sin agitación. Después los cultivos se incuban durante otras 2 h a 37 °C y se agitan a 220 rpm. Las muestras se agitaron vorticialmente vigorosamente para disrumpir los pares de apareamiento. Se prepararon diluciones a 10⁻¹, a 10⁻², a 10⁻³ y a 10⁻⁴ en PBS (precalentadas a la temperatura ambiente) para cada apareamiento, y se añadieron 100 µl de cada cultivo de apareamiento no diluido y diluido a placas de agar M9 que contienen 1 µg/ml de tiamina y 10 µg/ml de tetraciclina. Los cultivos se incubaron a 37 °C. Los potenciales transconjugantes se sembraron por estrías en placas de agar M9 que contienen 1 µg/ml de tiamina y 10 µg/ml de tetraciclina y se incubaron a 37 °C. Los experimentos de apareamiento en tubo produjeron varios potenciales transconjugantes para todas las cepas receptoras. Posteriormente se analizó un subconjunto de potenciales transconjugantes mediante una PCR para evaluar la presencia de la mutación inactivadora $\Delta lpxP$ para distinguir entre los clones falsos positivos y las cepas de KPM resistentes a la tetraciclina. Según se muestra en la Figura 65, todos los ensayados transconjugantes de KPM318 resistentes a la tetraciclina contenían la mutación inactivadora $\Delta lpxP$, lo que indicaba la transferencia con éxito del plásmido F'121 Tn10 a la cepa KPM. Mediante el uso de una PCR de *lpxP*, también pudimos identificar varios potenciales transconjugantes F'121 Tn10 de KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23, que contenían la requerida mutación inactivadora $\Delta lpxP$.

Para proporcionar pruebas de la presencia del plásmido F'121 Tn10 en la KPM318 y sus derivados resistentes a 42 °C, así como para demostrar que los transconjugantes son susceptibles a una infección por el M13, se usó el fago colaborador M13KO7 para infectar cuatro transconjugantes seleccionados aleatoriamente de cada cepa. Como el M13KO7 contiene el origen de replicación de P15A y el gen de resistencia a la kanamicina de Tn903 insertados en el origen de replicación de M13, el desarrollo de clones resistentes a la kanamicina después de la infección es una indicación de la susceptibilidad de una cepa dada al M13KO7. Se realizaron cultivos de una noche de *E. coli* JC19022 (F'121 Tn10) y de BW30270 (F'121 Tn 10) en medio LB que contiene 10 µg/ml de tetraciclina, y de KPM318 (F'121 Tn10) y derivados de la KPM318 resistentes a 42 °C (F'121 Tn10) en medio LB con 10 µg/ml de tetraciclina y A5P/G6P. Las cepas BW30270 y KPM318 se cultivaron en medio LB y en medio LB complementado con A5P/G6P, respectivamente, como controles. Los cultivos se agitaron vigorosamente (220 rpm) a 37 °C. Se cultivaron las siguientes cepas y los potenciales transconjugantes:

1. BW30270 (control)
2. KPM318 (control)
3. JC19022 (F'121 Tn10) (control)
4. BW30270 (F'121 Tn10)-1
5. BW30270 (F'121 Tn 10)-2
6. BW30270 (F'121 Tn10)-3
7. BW30270 (F'121 Tn 10)-4
8. KPM318 (F'121 Tn 10)-4
9. KPM318 (F'121 Tn 10)-6
10. KPM318 (F'121 Tn 10)-7
11. KPM318(F'121 Tn 10)-8
12. KPM318-9 (F'121 Tn10)-1
13. KPM318-9 (F'121 Tn 10)-2

14. KPM318-9 (F'121 Tn10)-3
 15. KPM318-9 (F'121 Tn 10)-4
 16. KPM318-10 (F'121 Tn10)-1
 17. KPM318-10 (F'121 Tn10)-3
 5 18. KPM318-10 (F'121 Tn10)-4
 19. KPM318-10 (F'121 Tn 10)-5
 20. KPM318-19 (F'121 Tn10)-3
 21. KPM318-19 (F'121 Tn10)-4
 10 22. KPM318-19 (F'121 Tn 10)-5
 23. KPM318-19 (F'121 Tn10)-6
 24. KPM318-23 (F'121 Tn10)-1
 25. KPM318-23 (F'121 Tn 10)-2
 26. KPM318-23 (F'121 Tn10)-3
 15 27. KPM318-23 (F'121 Tn 10)-5

Los cultivos de una noche de BW30270 y de JC19022 (F'121 Tn10) se cultivaron en 3 ml de medio LB (1:100), y la KPM318 y los potenciales transconjugantes se cultivaron en 3 ml de medio LB complementado con A5P/G6P (1:50). Los cultivos se cultivaron hasta una fase de crecimiento exponencial temprano a 37 °C con agitación vigorosa (280 rpm). Se retiró una alícuota de 1 ml para la determinación de la DO₆₀₀ de la suspensión (Tabla 19)

Los experimentos de infección con M13K07 dieron como resultado colonias resistentes a la kanamicina en todos los potenciales transconjugantes de KPM318 y sus derivados resistentes a la temperatura (Tabla 20). Aunque el número de colonias resistentes a la kanamicina variaba significativamente entre las cepas, los resultados sugieren que: (i) la transferencia por conjugación del plásmido F'121 Tn10 a las cepas de KPM tuvo éxito, y (ii) las cepas se hicieron susceptibles a una infección por el M13. Esto debería proporcionar una base fundamental para la generación de colecciones de expresión en fago en derivados resistentes la temperatura de KPM318.

Se transfirió el gen supE44 de *E. coli* XL1-Blue a BW30270, a KPM318 y a sus derivados resistentes a 42 °C. Para facilitar la selección de supE44 en BW30270, en KPM318 y en sus derivados, se construyó el plásmido colaborador pMAK705 KmR CATMUT (Figura 66). En primer lugar, se amplificó el gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4 mediante el uso de los cebadores 5BamHIKmR y 3HindIIIKmR, seguido de una digestión del producto de la PCR con BamHI y HindIII. En segundo lugar, se clonó el producto de la PCR digerido con BamHI/HindIII en los sitios de BamHI/HindIII del plásmido sensible a la temperatura pMAK705 para producir pMAK705 KmR. Finalmente, se sustituyó el codón ACC de la posición 10 por un codón sin sentido TAG (amber) mediante el uso de los celadores CATamber y CATwtreverse en una mutagénesis dirigida con el sistema de mutagénesis Change-IT (USB).

(SEQID1) 5BamHIKmR: ATATGGATCCTTACATGGCGATAGCTAGACTGG
 (SEQID2) 3HindIIIKmR: ATATAAGCTTGAAGAACTCCAGCATGAGATCC
 40 (SEQID3) CATamber: GAGAAAAAATCACTGGATATACCTAGGTTGATATATCCCAATGGCA
 (SEQID4) CATwtreverse: CAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATC

Para verificar la introducción del codón sin sentido amber en el gen cat, se transformaron las cepas de *E. coli* TOP10 y XLI-Blue con el plásmido pMAK705 KmR CATMUT. Las cepas resultantes TOP10/pMAK705 KmR CATMUT y XLI-Blue/pMAK705 KmR CATMUT se sembraron por estrías tanto en placas de LB + 30 µg/ml de kanamicina como en LB + 30 µg/ml de kanamicina + 15 µg/ml de cloranfenicol (Figura 67). Al contrario que TOP10/pMAK705 KmR CATMUT portador del alelo natural de glnV, la cepa XLI-Blue/pMAK705 KmR CATMUT era capaz de crecer en placas con LB + 30 µg/ml de kanamicina + 15 µg/ml de cloranfenicol, lo que indica la supresión de la mutación sin sentido por parte de supE44 (Figura 67).

Ejemplo 5: construcción de las cepas derivadas de KPM ΔendA ΔrecA

Las cepas ΔrecA::KmR de KPM348, KPM349, KPM350, KPM351 y KPM352, derivaban de cada una de las correspondientes cepas ΔendA de KPM343, KPM344, KPM345, KPM346 y KPM347. Δ, según se usa en este ejemplo, significa una deleción. Se transfirió el casete de direccionamiento ΔrecA::KmR a KPM343, KPM344, KPM345, KPM346 y KPM347 mediante una transducción con P1vir esencialmente según se ha descrito para la construcción de otras mutaciones inactivadoras:

1. Se usó la cepa de *E. coli* BW26547 portadora de la mutación ΔrecA::KmR como donante para la transducción. La cepa se obtuvo en el *E. coli* Genetic Stock Center.
2. Se propagó el fago P1vir en BW26547 cultivado a 37 °C en medio LB con 30 µg/ml de kanamicina para obtener un lisado de transducción de ΔrecA::KmR.
- 65 3. Para la transducción se cultivaron las cepas receptoras de ΔendA KPM343, KPM344, KPM345, KPM346 y KPM347 a 37 °C en medio LB complementado con A5P/G6P.

4. La transducción se llevó a cabo según los protocolos estándar, con la selección de los potenciales transductantes a 37° en placas de LB-agar que contienen 30 µg/ml de kanamicina.

5. La distancia entre *recA* y *gutQ* es únicamente de aproximadamente 6 kb (tasa teórica de co-transducción: aproximadamente un 82 %), por lo que los potenciales transductantes resistentes a la kanamicina se ensayaron mediante una PCR para analizar la presencia tanto del casete $\Delta recA::KmR$ como del gen deleciónado *gutQ* en las cepas de KPM.

cebadores de control de *gutQ*: 5'*gutQ*ctrl1 - GTCGATAAGCTGATTACCGACGC 3'*gutQ*ctrl2 - GTGAAACTATTCGT- CAGGCACTGG
 cebadores de control de *recA*: 5'*recA*ctrl - CTA CTACTGCGTATGCATTGCAG 3'*recA*ctrl - TCGTAATCTTCTGCCGTAGC

6. Como resultado se obtuvieron las cepas KPM348, KPM349, KPM350, KPM351 y KPM352, que contienen $\Delta recA::KmR$ y la mutación original $\Delta gutQ$.

7. El gen de resistencia a la kanamicina se elimina mediante el uso de una transformación transitoria con pCP20 para obtener las cepas KPM353, KPM354, KPM355, KPM356 y KPM357.

8. Los anteriores cebadores de *recA* sirven para la identificación de la eliminación del inserto de KanR en las cepas finales $\Delta recA$.

Ejemplo 6: denominaciones de los nombres de las cepas de *E. coli*:

Cepa	Descripción
KPM22 L11	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ</i>)
KPM290	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL::Km⁺</i>)
KPM296	Derivado de KPM22 L11 $\Delta lpxL$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL</i>)
KPM300	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM::Km⁺</i>)
KPM303	Derivado de KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM</i>)
KPM310	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP::Km⁺</i>)
KPM312	Derivado de KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP</i>)
KPM314	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP::Km⁺</i>)
KPM316	Derivado de KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP</i>)
KPM317	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA::Km⁺</i>)
KPM318	Derivado de KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP \Delta eptA$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA</i>)
KPM334	Derivado de KPM318 resistente a la temperatura KPM318-42C 9 (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA frr181</i>)
KPM335	Derivado de KPM318 resistente a la temperatura KPM318-42C 10 (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA frr181</i>)
KPM336	Derivado de KPM318 resistente a la temperatura KPM318-42C 19 (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA efp</i>)
KPM337	Derivado de KPM318 resistente a la temperatura KPM318-42C 23 (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA dcd</i>)
KPM338	Derivado de KPM334 resistente a la temperatura (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA frr181 ΔendA::Km⁺</i>)
KPM339	Derivado de KPM335 resistente a la temperatura (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA frr181 ΔendA::Km⁺</i>)
KPM340	Derivado de KPM336 resistente a la temperatura (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA efp ΔendA::Km⁺</i>)
KPM341	Derivado de KPM337 resistente a la temperatura (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA dcd' ΔendA::Km⁺</i>)
KPM342	(<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA ΔendA::km⁺</i>)
KPM343	Derivado de KPM334 resistente a la temperatura $\Delta endA$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA frr181 ΔendA</i>)
KPM344	Derivado de KPM335 resistente a la temperatura $\Delta endA$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA frr181 ΔendA</i>)
KPM345	Derivado de KPM336 resistente a la temperatura $\Delta endA$ (<i>msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA efp' ΔendA</i>)

Cepa	Descripción
KPM346	Derivado de KPM337 resistente a la temperatura $\Delta endA$ (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ dcd $\Delta endA$)</i>
KPM347	Derivado de KPM318 resistente a la temperatura (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ $\Delta endA$)</i>
KPM348	Derivado de KPM343 resistente a la temperatura (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>frr181</i>$\Delta endA$ $\Delta recA::Km^+$)</i>
KPM349	Derivado de KPM344 resistente a la temperatura (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>frr181</i>$\Delta endA$ $\Delta recA::Km^+$)</i>
KPM350	Derivado de KPM345 resistente a la temperatura (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>efp'</i> $\Delta endA$ $\Delta recA::Km^+$)</i>
KPM351	Derivado de KPM346 resistente a la temperatura (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ dcd $\Delta endA$ $\Delta recA::Km^+$)</i>
KPM352	(<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ $\Delta endA$ $\Delta recA::Km^+$)</i>
KPM353	Derivado de KPM334 resistente a la temperatura $\Delta endA$ $\Delta recA$ (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>frr181</i>$\Delta endA$ $\Delta recA$)</i>
KPM354	Derivado de KPM335 resistente a la temperatura $\Delta endA$ $\Delta recA$ (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>frr181</i>$\Delta endA$ $\Delta recA$)</i>
KPM355	Derivado de KPM336 resistente a la temperatura $\Delta endA$ $\Delta renA$ (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>efp'</i> $\Delta endA$ $\Delta recA$)</i>
KPM356	Derivado de KPM337 resistente a la temperatura $\Delta endA$ $\Delta recA$ (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ dcd $\Delta endA$ $\Delta recA$)</i>
KPM357	Derivado de KPM318 $\Delta endA$ Area (<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ $\Delta endA$ $\Delta recA$)</i>
KPM358	Derivado de KPM334 resistente a la temperatura portador del plásmido F'121 Tn10 [<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>frr181</i> (F'121 Tn 10)]</i>
KPM359	Derivado de KPM335 resistente a la temperatura portador del plásmido F'121 Tn10 [<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>frr181</i> (F'121 Tn10)]</i>
KPM360	Derivado de KPM336 resistente a la temperatura portador del plásmido F'121 Tn10 [<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ <i>efp'</i> (F'121 Tn10)]</i>
KPM361	Derivado de KPM337 resistente a la temperatura portador del plásmido F'121 Tn10 [<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ dcd' (F'121 Tn10)]</i>
KPM362	Derivado de KPM318 portador del plásmido F'121 Tn10 [<i>msbA52 $\Delta kdsD$ $\Delta gutQ$ $\Delta lpxL$ $\Delta lpxM$ $\Delta pagP$ $\Delta lpxP$ $\Delta septA$ (F'121 Tn10)]</i>

Aunque en el presente documento se ha mostrado y descrito la realización preferida de la presente invención, será fácilmente apreciable por los expertos en la materia que pueden realizarse modificaciones en la misma que no exceden el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, en la que la bacteria comprende una membrana externa que carece sustancialmente de un ligando que actúa como un agonista de un receptor TLR4/MD2 humano, de forma que el ligando no está presente en la membrana externa o está presente a un nivel que no induce una respuesta por encima del 25 % de la señal máxima en un ensayo de HEK-blue cuando se añaden 20 µg de membrana externa a un único pocillo de ensayo, en la que el ligando comprende el lípido A, y en la que la bacteria comprende (a) una mutación en al menos uno de los genes seleccionados entre el grupo que consiste en *kdsD*, *kdsA*, *kdsC*, *kdsb*, *gutQ* y *waaA*, dando como resultado una perturbación en la biosíntesis del (Kdo)₂-lípido IV_A, (b) una mutación en cada uno de los genes *pagP* y *eptA*, y (c) una mutación supresora en el gen *msbA* o en el gen *yhjD*.
2. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de la reivindicación 1, derivada de *Escherichia coli* o de *Pseudomonas*.
3. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de la reivindicación 1 o 2, derivada de una cepa de *Escherichia coli* seleccionada entre el grupo que consiste en una cepa K12, W3110, MG1655, B/r, BL21, O157:h7, O42, 101-1,1180, 1357, 1412, 1520, 1827-70, 2362-75, 3431, 53638, 83972, 929-78, 98NK2, ABU 83972, B, B088, B171, B185, B354, B646, B7A, C, c7122, CFT073, DH1, DH5α, E110019, E128010, E74/68, E851/71, EAEC 042, EPECa11, EPECa12, EPECa14, ETEC, H10407, F11, F18+, FVEC1302, FVEC1412, GEMS_EPEC1, HB101, HT115, KO11, LF82, LT- 41, LT-62, LT-68, MS 107-1, MS 119-7, MS 124-1, MS 145-7, MS 79-2, MS 85-1, NCTC 86, Nissle 1917, NT:H19, NT:H40, NU14, O103:H2, O103:HNM, O103:K+, O104:H12, O108:H25, O109:H9, O111:H-, O111:H19, O111:H2, O111:H21, O111:NM, O115:H-, O115:HNM, O115:K+, O119:H6, O119:UT, O124:H40, O127a:H6, O127:H6, O128:H2, O131:H25, O136:H-, O139:H28 (cepa E24377A/ETEC), O13:H11, O142:H6, O145:H-, O153:H21, O153:H7, O154:H9, O157:12, O157:H-, O157:H12, O157:H43, O157:H45, O157:H7 EDL933, O157:NM, O15:NM, O177:H11, O17:K52:H18 (cepa UMN026/ExPEC), O180:H-, O1:K1/APEC, O26, O26:H-, O26:H11, O26:H11:K60, O26:NM, O41:H-, O45:K1 (cepa S88/ExPEC), O51:H-, O55:H51, O55:H6, O55:H7, O5:H-, O6, O6:H6, O6:HNM, O6:K15:H31 (cepa 536/UPEC), O7:K1 (cepa IA139/ExPEC), O8 (cepa IA1), O81 (cepa ED1a), O84:H-, O86a:H34, O86a:H40, O90:H8, O91:H21, O9:H4 (cepa HS), O9:H51, ONT:H-, ONT:H25, OP50, Orough:H12, Orough:H19, Orough:H34, Orough:H37, Orough:H9, OUT:H12, OUT:H45, OUT:H6, OUT:H7, OUT:HNM, OUT:NM, RN587/1, RS218, 55989/EAEC, B/BL21,B/BL21-DE3, SE11, SMS-3-5/SECEC, UTI89/UPEC, TA004, TA155, TX1999 y Vir68.
4. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una mutación en el gen *lpxL*.
5. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una mutación en el gen *lpxM*.
6. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una mutación en el gen *lpxP*.
7. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una mutación en cada uno de los genes *lpxL*, *lpxM* y *lpxP*.
8. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los genes *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP* y *eptA* están disrumpidos en la bacteria.
9. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mutación *msbA* da como resultado la sustitución de un aminoácido en comparación con la secuencia de proteínas de MsbA de la cepa natural de *Escherichia coli* K-12 seleccionada entre el grupo que consiste en MsbA-P18S, MsbA-L48F, MsbA-P50S, MsbA-T283A y MsbA-R310S.
10. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de la reivindicación 9, en la que la bacteria comprende una mutación en el gen *msbA* que da como resultado una sustitución de aminoácido P18S en la proteína MsbA.
11. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mutación en *yhjD* da como resultado la sustitución del aminoácido YhjD-R134C en comparación con la secuencia de la proteína natural de YhjD de la cepa de *Escherichia coli* K-12.
12. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la bacteria comprende adicionalmente al menos una mutación adicional que le permite el crecimiento a 42 °C.
13. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que un gen que codifica RecA o EndA está mutado o deletado.

14. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un plásmido F, un plásmido F' o un gen que codifica la producción de pilus F.
- 5 15. La bacteria mutante gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la bacteria puede propagar bacteriófagos fd, M13, o bacteriófagos relacionados con fd o con M13.
16. La bacteria gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la bacteria es competente para la captación de ADN extracelular.
- 10 17. La bacteria gramnegativa viable, no condicional, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la bacteria comprende adicionalmente una mutación en el gen *lpp*.
18. Un método para la producción de una muestra de ADN sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2, método que comprende:
- 15 (a) la obtención de una bacteria gramnegativa según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;
(b) la introducción de un vector de ADN en la bacteria, y el cultivo de la bacteria transformada con el vector de ADN de forma que la bacteria funcione amplificando el vector de ADN; y
20 (c) la recolección de una muestra de ADN a partir de la bacteria con el ADN amplificado través de un protocolo de aislamiento de ADN estándar.
19. Un método para la producción de una muestra de proteína sustancialmente exenta de un ligando que actúa como un agonista del TLR4/MD2, método que comprende:
- 25 (a) la obtención de una bacteria gramnegativa según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;
(b) la introducción de una construcción de un vector de expresión de ADN en la bacteria, vector que comprende tanto un gen que codifica una proteína de interés expresada a partir de un promotor funcional, como un gen marcador seleccionable;
30 (c) el cultivo de la bacteria transformada con la construcción del vector de expresión de ADN;
(d) permitir o inducir que la bacteria transformada con la construcción del vector de expresión de ADN exprese la proteína de interés; y
(e) retirar la bacteria para que libere la proteína de interés.
- 35 20. El método de la reivindicación 18 o 19, en el que la bacteria se cultiva en un medio de fermentación que tiene una concentración de NaCl en el intervalo de 0,1 M - 0,9 M.

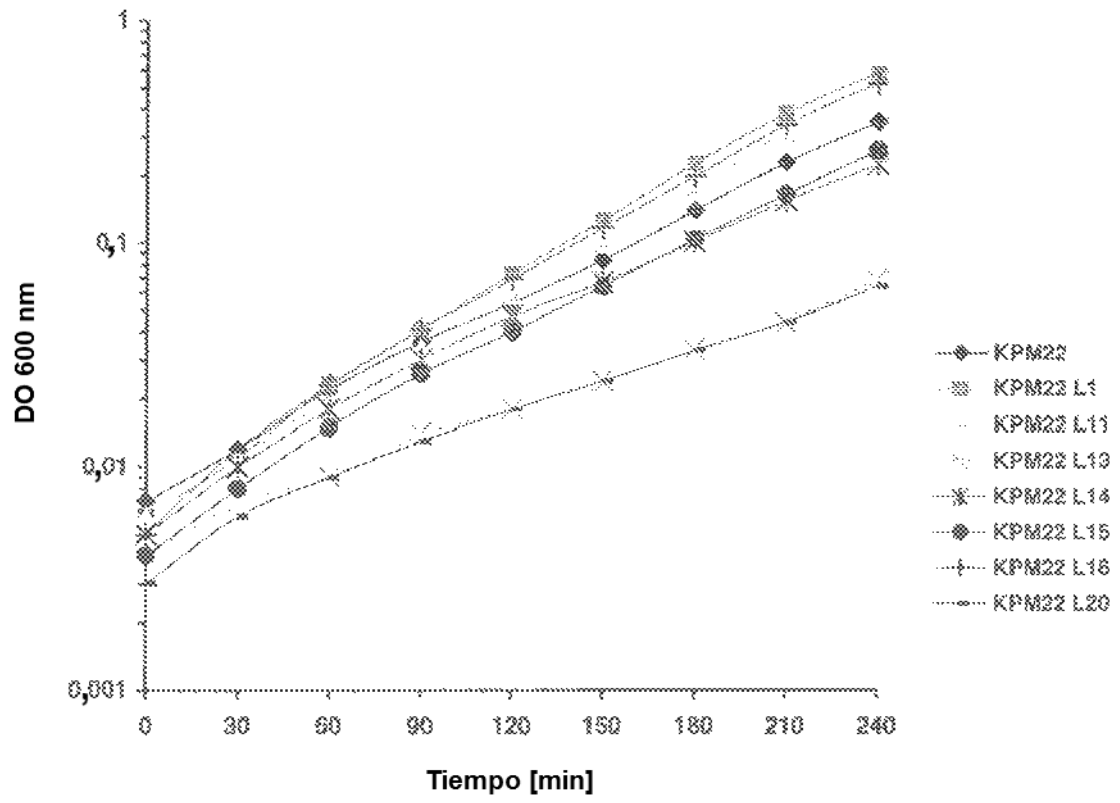


FIG. 1

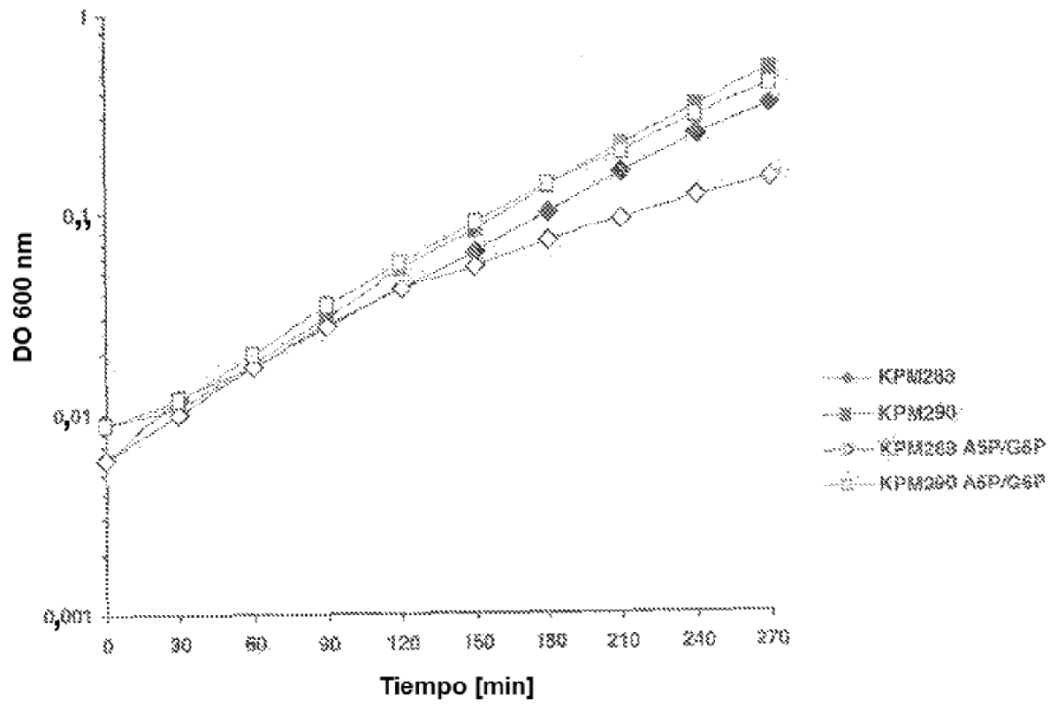


FIG. 2

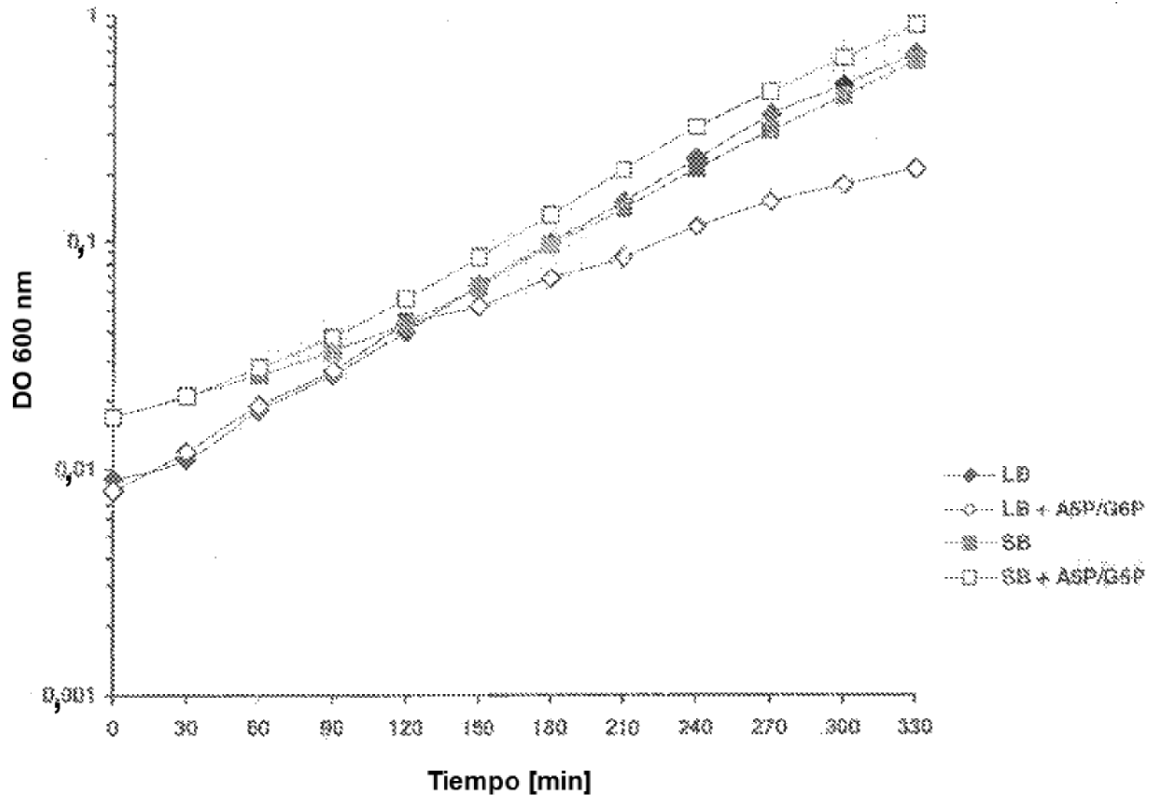


FIG. 3

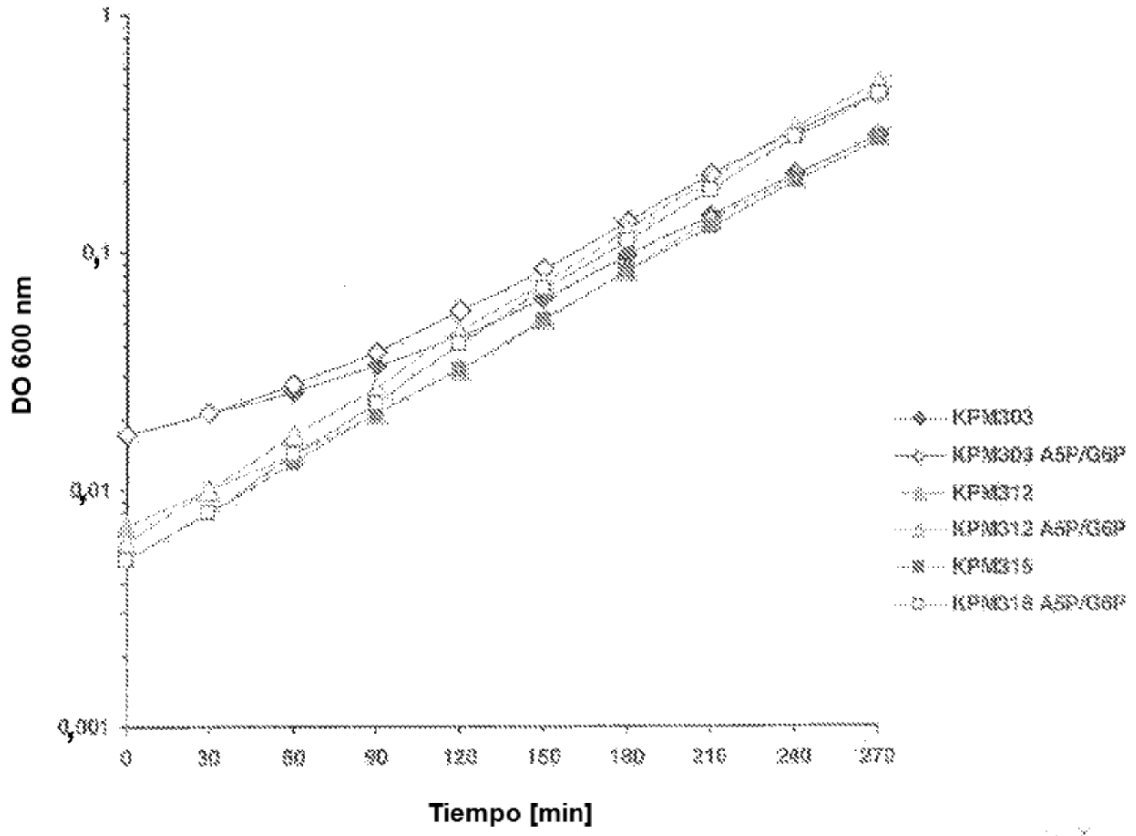


FIG. 4

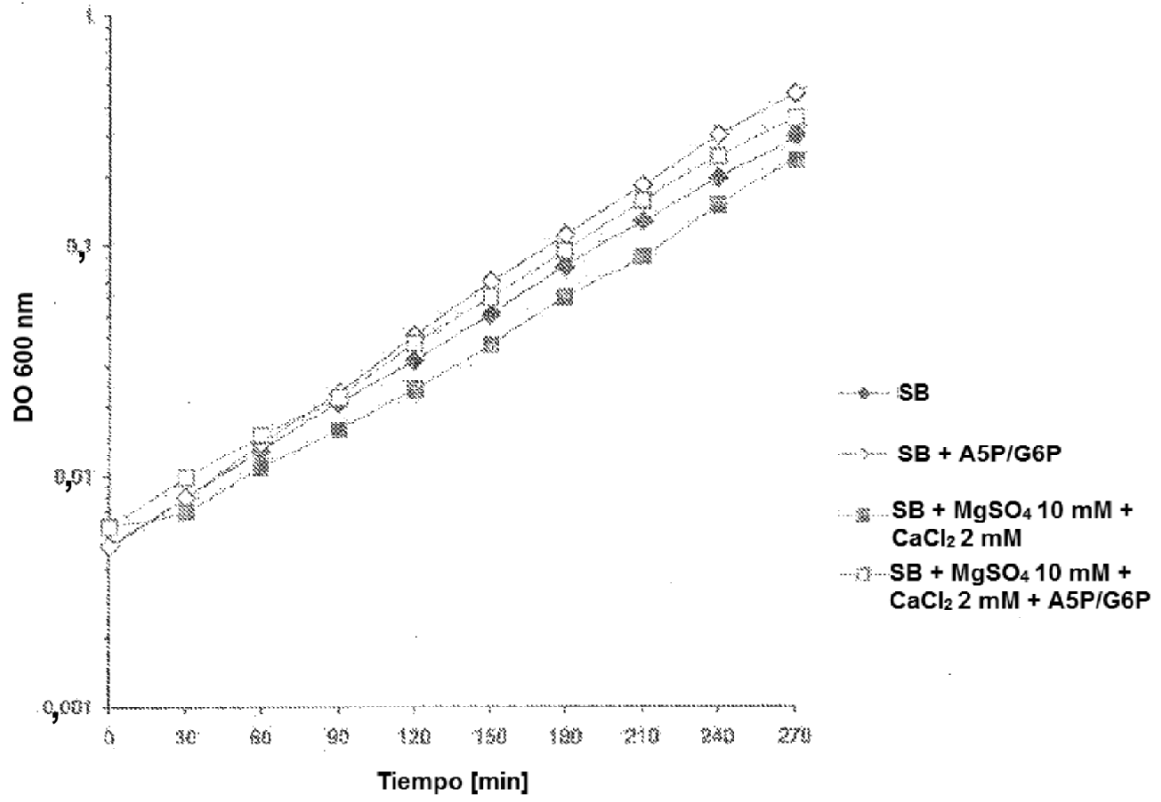
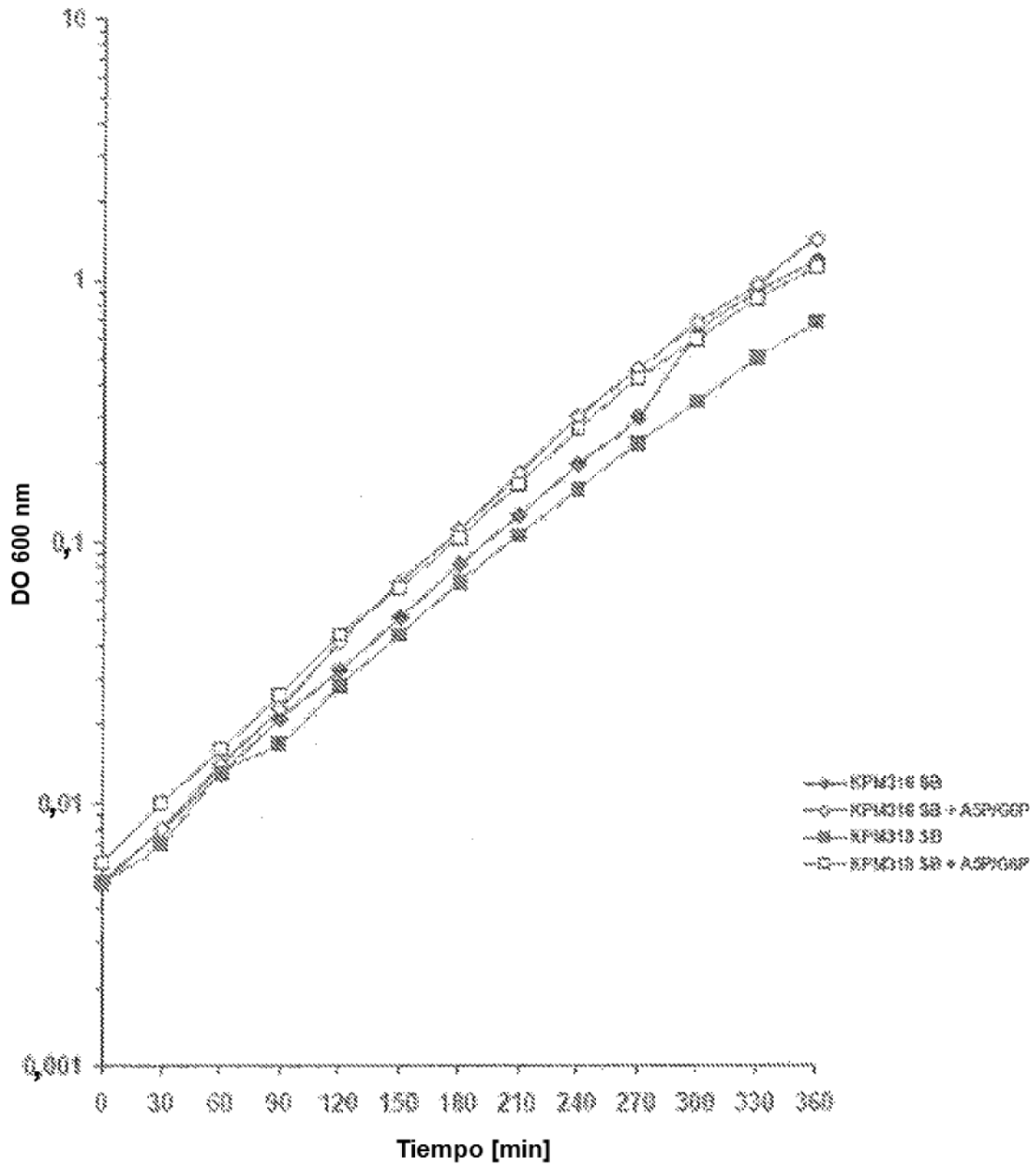


FIG. 5

FIG.6: Crecimiento a 37 °C de KPM316 y de KMP318 en Super Broth con y sin suplemento de arabinosa-5-fosfato. El inserto define los símbolos usados para cada cepa y las condiciones de crecimiento.



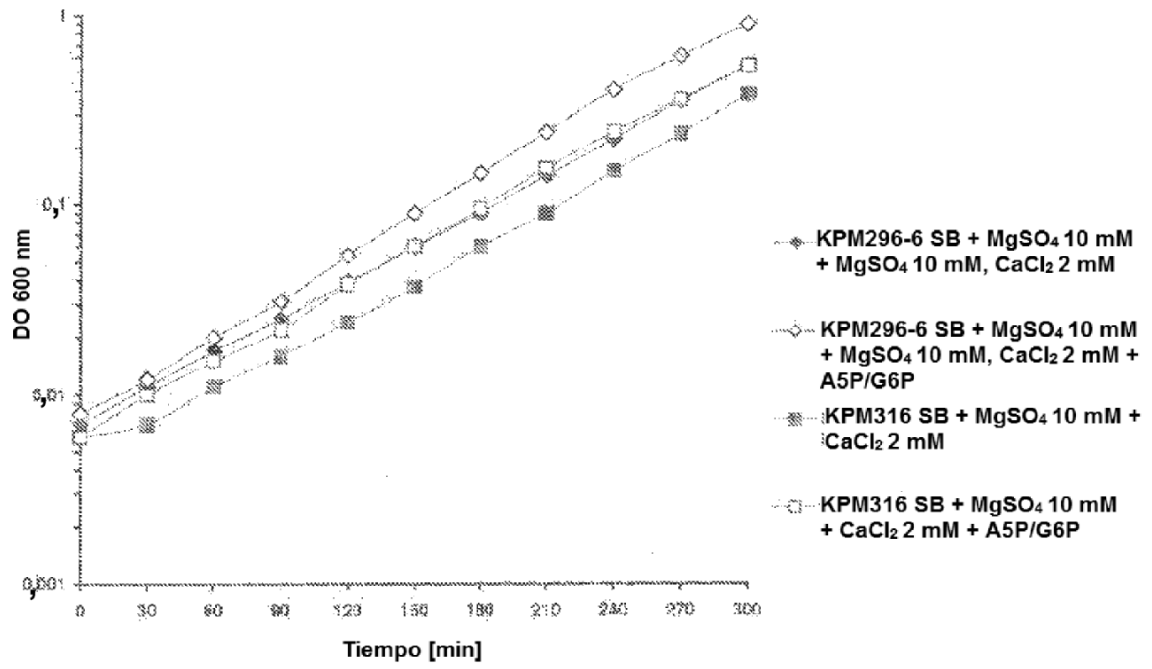


FIG. 7

FIG. 8

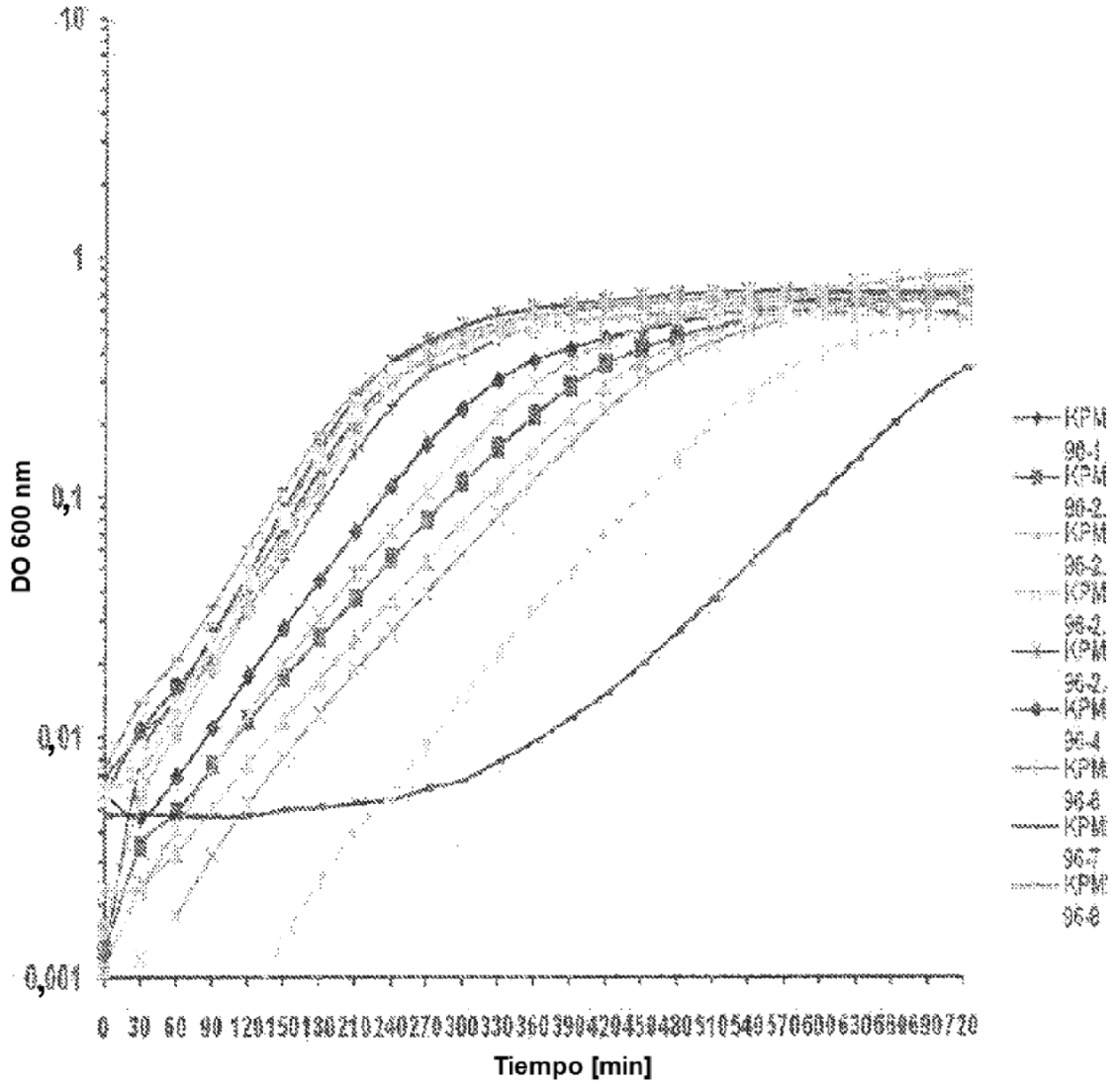


FIG.9: Productos de la PCR generados a partir del par de cebadores que flanquean cada uno de los genes delecionados procedentes de KMP318 analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa y comparados junto a los productos de control de la PCR procedentes de la cepa parental BW30270.

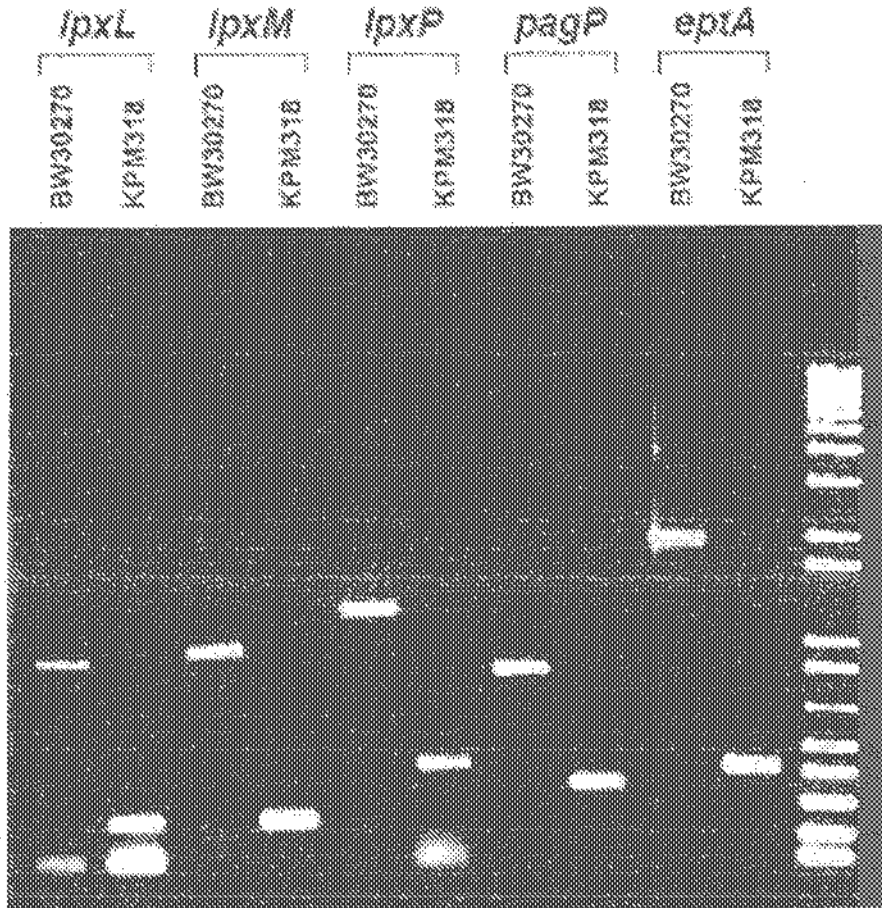


FIG.10a: Ensayos basados en células HEK blue de las membranas externas para cada una de KPM316, KPM318 y BW30270 cultivadas en medio LB a 37 °C.

(A) extractos de la membrana externa de las cepas indicadas desde 2 microgramos bajando hasta 2 picogramos. También se muestra el LPS de *E. coli* K12 de referencia suministrado con el kit.

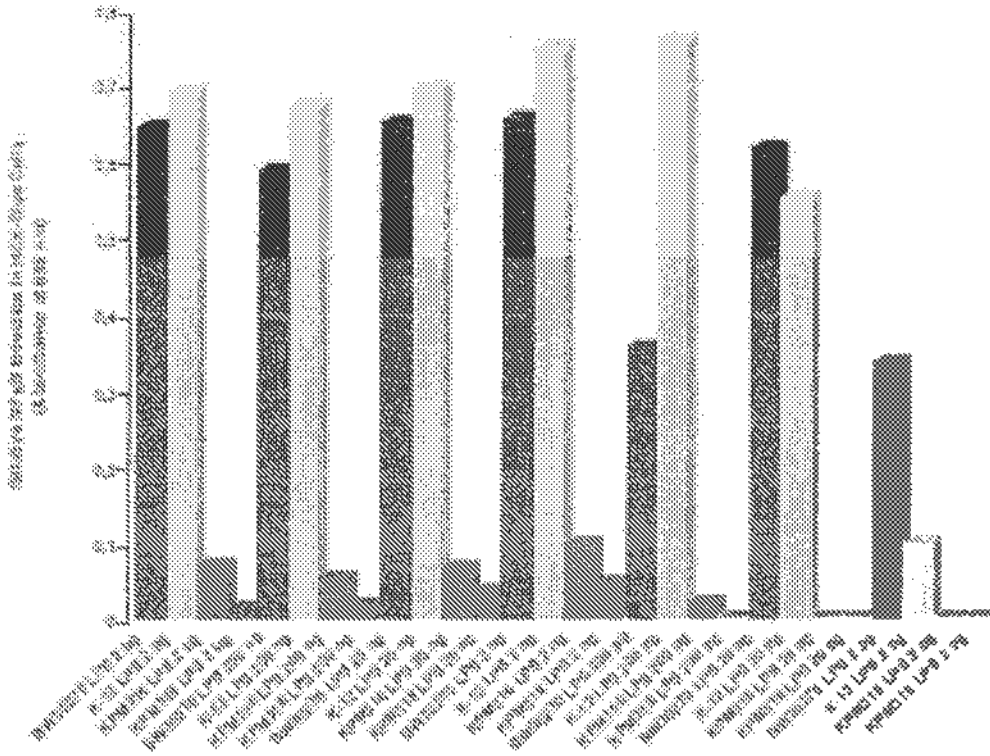


FIG. 10a

Células completas añadidas en las cantidades indicadas de unidades formadoras de colonias (UFC)

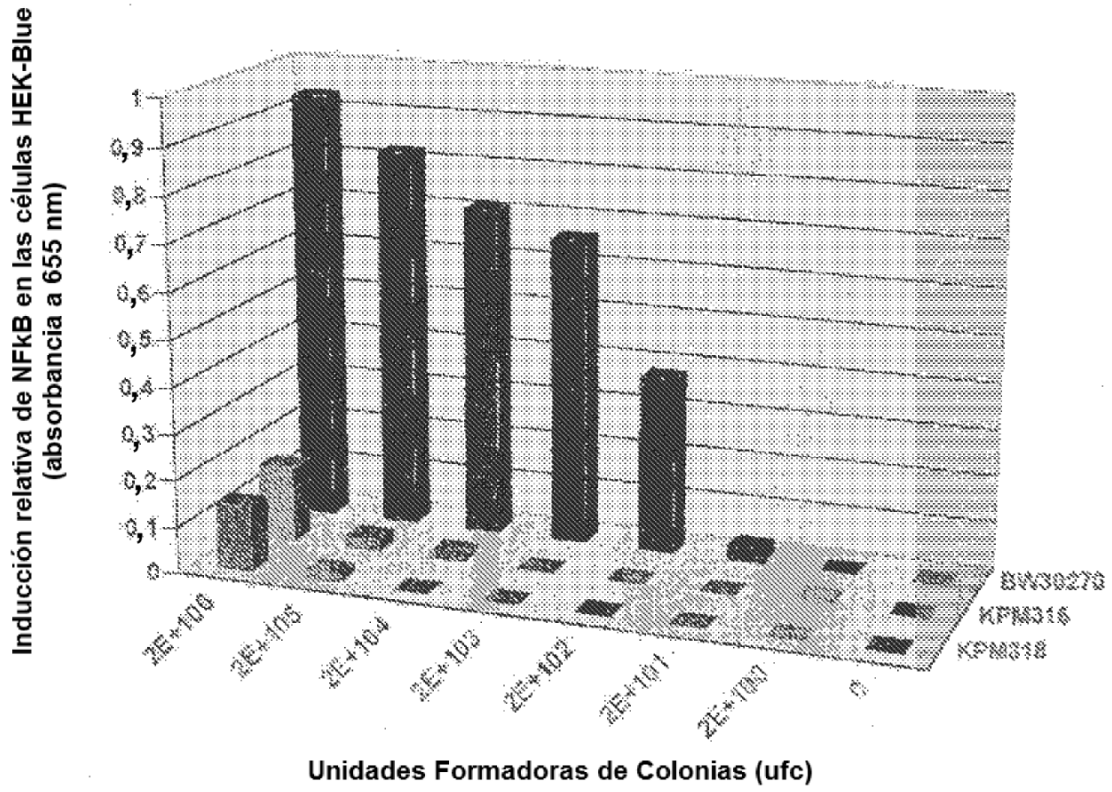
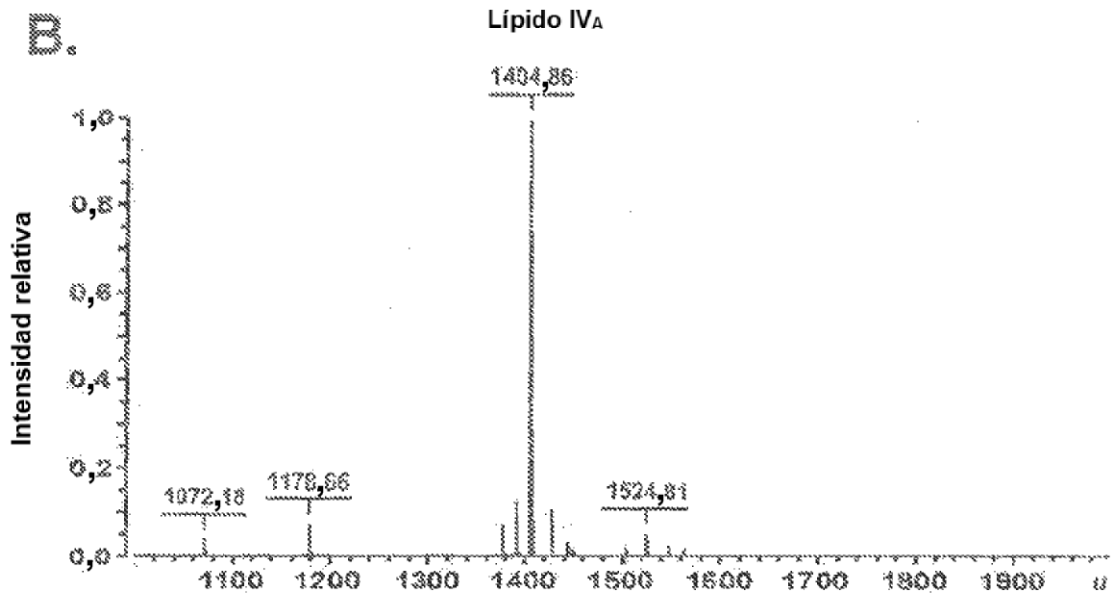
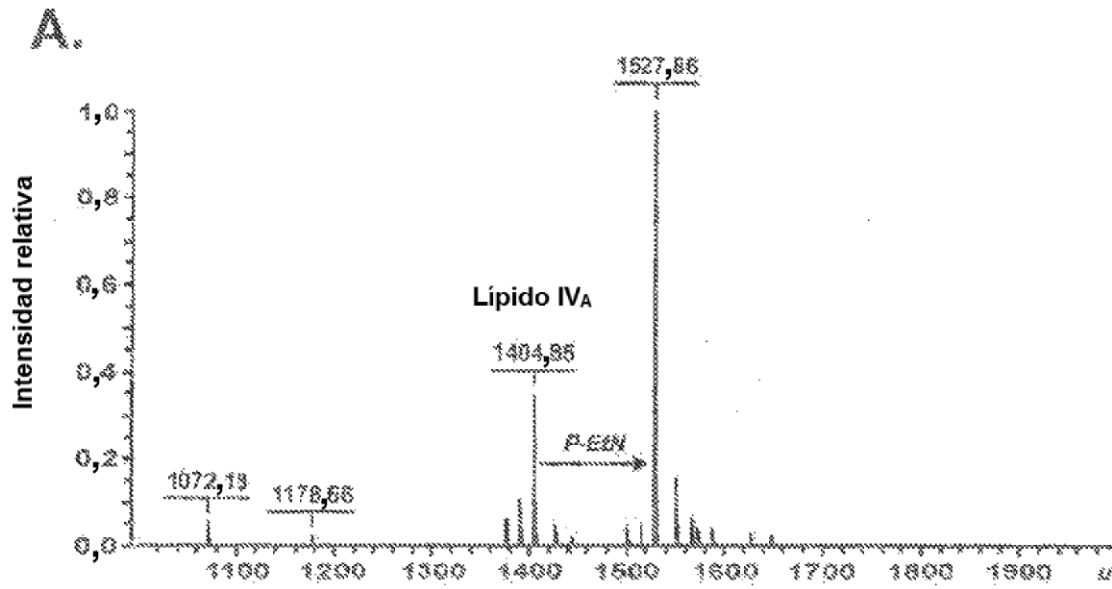


FIG. 10b

FIG.11: Espectros de ESI-EM de las muestras de membrana externa extraídas a partir de KPM316 (A) y de KPM318 (B).



ES 2 611 833 T3

Escherichia coli KPM316 (*msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP*)

La secuencia de la hebra sentido del organismo es la secuencia de referencia de *E. coli* con las siguientes alteraciones:

msbA52 sustituye al alero natural de *msbA*, en el que una C en 965895 está sustituida por una T, dando como resultado una Serina en lugar de una Prolina en el aminoácido 18 de la proteína MsbA.

SEQID5:

965844

C>T 965855

```
ATGCATAACGACAAAGATCTCTCTACGTGGCAGACATTCCGCCGACTGTGG[CAACCATTGC
GCCTTTCAAAGCGGGTCTGATCGTGGCGGGCGTAGCGTTAATCCTCAACGCAGCCAGCGAT
ACCTTCATGTTATCGCTCCTTAAGCCACTTCTTGATGATGGCTTTGGTAAAACAGATCGCTCC
GTGCTGGTGTGGATGCCGCTGGTGGTATCGGGCTGATGATTTTACGTGGTATCACCAGCT
ATGTCTCCAGCTACTGTATCTCCTGGGTATCAGGAAAGGTGGTAATGACCATGCGTCGCCG
CCTGTTTGGTCACATGATGGGAATGCCAGTTTCATTCTTTGACAAACAGTCAACGGGTACGC
TGTTGTCACGTATTACCTACGATTCCGAACAGGTTGCTTCTTCTTCCGGCGCACTGATTA
CTGTTGTGCGTGAAGGTGCGTCGATCATCGGCCTGTTTCATCATGATGTTCTATTACAGTTGG
CAACTGTCGATCATTTTATTGTTGCTGGCACCATTGTTTCGATTGCGATTGCGGTTGTATCG
AAGCGTTTTCGCAACATCAGTAAAAACATGCAGAACACCATGGGGCAGGTGACCACCAGCG
CAGAACAATGCTGAAGGGCCACAAAGAAGTATTGATTTTCCGGTGGTCAGGAAGTGGAAAC
GAAACGCTTTGATAAAGTCAGCAACCGAATGCGTCTTCAGGGGATGAAAATGGTTTCAGCCT
CTTCCATCTCTGATCCGATCATTACGCTGATCGCCTCTTTGGCGCTGGCGTTTGTTCTGTAT
GCGGGCAGCTTCCCAAGTGTGATGGATAGCCTGACTGCCGGTACCATTACCGTTGTTTTCTC
TTCAATGATTGCACTGATGCGTCCGCTGAAATCGCTGACCAACGTTAACGCCAGTTCCAGC
GCGGTATGGCGGCTTGTGACAGCGCTGTTTACCATTCTGGACAGTGAGCAGGAGAAAGATGA
AGGTAAGCGCGTATCGAGCGTGGGACTGGCGACGTGGAATTCGCAATGTCACCTTTACT
TATCCGGGACGTGACGTACCTGCATTGCGTAACATCAACCTGAAAATTCGGGCAGGGGAAGA
CGGTTGCTCTGGTTGGACGCTCTGGTTCGGGTAATCAACCATCGCCAGCCTGATCAGCGG
TTTTTACGATATTGATGAAGGCGAAATCCTGATGGATGGTCAAGATCTGCGCGAGTATAACC
TGGCGTCGTTACGTAACCAGGTTGCTCTGGTCTCGCAGAATGTCCATCTGTTAACGATACG
GTTGCTAACAAACATTGCTTACGCACGGACTGAACAGTACAGCCGTGAGCAAATTGAAGAAGC
GGCGCGTATGGCCTACGCCATGGACTTCATCAATAAGATGGATAACGGTCTCGATACAGTG
ATTGGTGAACCGCGTGTGCTCTCTGGCGGTGAGCGTCAAGCGTATTGCTATCGCTCGAG
CCTTGTGCGTGTATAGCCCGATTCTGATTCTGGACGAAGCTACCTCGGCTCTGGATACCGAA
TCCGAACGTGCGATTACAGGCGGCACTGGATGAGTTGCAGAAAACCGTACCTCTCTGGTGA
TTGCCACCGCTTGTCTACCATTGAAAAGGCAGACGAAATCGTGGTCTGTCGAGGATGGTGT
CATTTGTTGGAACGCGGTACGCATAACGATTTGCTTGAACACCGCGGCGTTTACGCGCAACTT
CACAAAATGCAGTTTGGCCAATGA
```

967592

FIG. 12a

ES 2 611 833 T3

ΔgutQ

Los nucleótidos 2827845 hasta 2828789 están deletados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM316 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM316 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una C en 2827845 y una G en 2828790):

SEQID6:

2827845

CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAC
TTCGGAATAGGAAGGTCGACGGATCCCCGGAATG
2828790

FIG. 12b

ΔkdsD

Los nucleótidos 3339288 hasta 3340264 están deletados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM316 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM316 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una T en 3339287 y una C en 3340265):

SEQID7:

3339287

TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC
3340265

FIG. 12c

ES 2 611 833 T3

$\Delta lpxL$

(la secuencia codificante de *lpxL* es un complemento de la hebra del ácido nucleico de referencia)

Los nucleótidos 1114958 hasta 11155744 están deletados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM316 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM316 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una C en 1114957 y una C en 1115745):

SEQID8:

1114957

CTATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTA
TAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACC
1115745

FIG. 12d

$\Delta lpxM$

(la secuencia codificante de *lpxM* es un complemento de la hebra del ácido nucleico de referencia)

Los nucleótidos 1937303 hasta 1938151 están deletados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM316 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM316 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una G en 1937302 y una G en 1938152):

SEQID9:

1937302

GTATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGT
ATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACG
1938152

FIG. 12e

ΔpagP

Los nucleótidos 655780 hasta 656340 están delecionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM316 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM316 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una A en 655779 y una G en 656341):

SEQID10:

655779

AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGG

656341

FIG. 12f

ΔlpxP

Los nucleótidos 2493667 hasta 2494587 están delecionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM316 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM316 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una T en 2493666 y una C en 2494588):

SEQID11:

2493666

TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC

2494588

FIG. 12g

Posición de la base de referencia (MG1655 ref)	Base en MG1655	Base en KPM316	Gene afectado	Efecto predicho
547694	A	G	<i>yjbB</i>	E a E (silenciosa)
3188791	C	T	<i>yqil</i>	S a S (silenciosa)
3753464	G	C	<i>aldB</i>	T a T (silenciosa)
3957957	C	T	Ninguna característica apreciada en la región	Efecto desconocido

FIG. 13

ES 2 611 833 T3

Escherichia coli KPM318 (*msbA52 ΔkdsD ΔgutQ ΔlpxL ΔlpxM ΔpagP ΔlpxP ΔeptA*)

La secuencia de la hebra sentido del organismo es la secuencia de referencia de *E. coli* con las siguientes alteraciones:

msbA52 sustituye al alero natural de *msbA*, en el que una C en 965895 está sustituida por una T, dando como resultado una Serina en lugar de una Prolina en el aminoácido 18 de la proteína MsbA.

SEQID12:

965844

C>T 965895

```
ATGCATAACGACAAAGATCTCTCTACGTGGCAGACATTCCGCCGACTGTGGTCAACCATTGC
GCCTTTCAAAGCGGGTCTGATCGTGGCGGGCGTAGCGTTAATCCTCAACGCAGCCAGCGAT
ACCTTCATGTTATCGCTCCTTAAGCCACTTCTTGATGATGGCTTTGGTAAACAGATCGCTCC
GTGCTGGTGTGGATGCCGCTGGTGGTGTGATCGGGCTGATGATTTTACGTGGTATCACCAGCT
ATGTCTCCAGCTACTGTATCTCCTGGGTATCAGGAAAGGTGGTAATGACCATGCGTCGCCG
CCTGTTTGGTCACATGATGGGAATGCCAGTTTCATTCTTTGACAAACAGTCAACGGGTACGC
TGTGTGTCACGTATTACCTACGATCCGAACAGGTTGCTTCTTCTTCTTCCGGCGCACTGATTA
CTGTTGTGCGTGAAGGTGCGTCGATCATCGGCCTGTTTCATCATGATGTTCTATTACAGTTGG
CAACTGTGATCATTTTGGATTGTGCTGGCACCGATTGTTTCGATTGCGATTCCGCGTTGTATCG
AAGCGTTTTGCAACATCAGTAAAAACATGCAGAACACCATGGGGCAGGTGACCACCAGCG
CAGAACAATGCTGAAGGGCCACAAAGAAGTATTGATTTTTGGTGGTTCAGGAAGTGGAAAC
GAAACGCTTTGATAAAGTCAGCAACCGAATGCGTCTTCAGGGGATGAAAATGGTTTCAGCCT
CTTCCATCTCTGATCCGATCATTGAGCTGATCGCCTCTTTGGCGCTGGCGTTTGTCTGTAT
GCGGCGAGCTTCCCAAGTGTGATGGATAGCCTGACTGCCGGTACGATTACCGTTGTTTTCTC
TTCAATGATTGCACTGATGCGTCCGCTGAAATCGCTGACCAACGTTAACGCCAGTTCCAGC
GCGGTATGGCGGCTTGTGACAGCGCTGTTTACCATTCTGGACAGTGAGCAGGAGAAAGATGA
AGGTAAGCGCGTGTGATCGAGCGTGGGACTGGCGACGTGGAATTCGCAATGTCACCTTTACT
TATCCGGGACGTGACGTACCTGCATTGCGTAAACATCAACCTGAAAATTCGCGCAGGGAAGA
CGGTTGCTCTGGTTGGACGCTCTGGTTCCGGTAAATCAACCATCGCCAGCCTGATCAGCGG
TTTTTACGATATTGATGAAGGGCGAAATCCTGATGGATGGTACGATCTGCGCGAGTATAACC
TGGCGTCGTTACGTAACCAGGTTGCTCTGGTGTGCGAGAATGTCCATCTGTTTAAACGATACG
GTTGCTAACCAACATTGCTTACGCACGGACTGAACAGTACAGCCGTGAGCAAATTGAAGAAGC
GGCGCGTATGGCCTACGCCATGGACTTCATCAATAAGATGGATAACGGTCTCGATACAGTG
ATTGGTGAAAACGGCGTGTGCTCTCTGGCGGTGAGCGTACGCGTATTGCTATCGCTCGAG
CCTTGTGCGTGTAGCCCGATTCTGATTCTGGACGAAGCTACCTCGGCTCTGGATACCGAA
TCCGAACGTGCGATTTCAGGCGGCACTGGATGAGTTGCAGAAAACCGTACCTCTCTGGTGA
TTGCCACCGCTTGTCTACCATGAAAAGGCAGACGAAATCGTGGTGTGCGAGGATGGTGT
CATTGTGGAACGCGGTACGCATAACGATTTGCTTGAGCACCGCGGCGTTTACGCGCAACTT
CACAAAATGCAGTTTGGCCAATG^
```

967592

FIG. 14a

ES 2 611 833 T3

ΔgutQ

Los nucleótidos 2827846 hasta 2828789 están deletados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una C en 2827845 y una G en 2828790):

SEQID13:
2827845

CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAC
TTCGGAATAGGAAGGTCGACGGATCCCCGGAATG
2828790

FIG. 14b

ΔkdsD

Los nucleótidos 3339288 hasta 3340264 están deletados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una T en 3339287 y una C en 3340265):

SEQID14:
3339287

TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC
3340265

FIG. 14c

ES 2 611 833 T3

$\Delta lpxL$

(la secuencia codificante de *lpxL* es un complemento de la hebra del ácido nucleico de referencia)

Los nucleótidos 1114958 hasta 11155744 están deletionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una C en 1114957 y una C en 1115745):

SEQID15:
1114957

CTATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTA
TAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACC

1115745

FIG. 14d

$\Delta lpxM$

(la secuencia codificante de *lpxM* es un complemento de la hebra del ácido nucleico de referencia)

Los nucleótidos 1937303 hasta 1938151 están deletionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una G en 1937302 y una G en 1938152):

SEQID16:
1937302

GTATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGT
ATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACG

1938152

FIG. 14e

ΔpagP

Los nucleótidos 655780 hasta 656340 están delecionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una A en 655779 y una G en 656341):

SEQID17:

655779

AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGG

656341

FIG. 14f

ΔlpxP

Los nucleótidos 2493667 hasta 2494587 están delecionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una T en 2493666 y una C en 2494588):

SEQID18:

2493666

TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC

2494588

FIG. 14g

ΔeptA

(la secuencia codificante es un complemento de la hebra del ácido nucleico de referencia)
 Los nucleótidos 4331974 hasta 4333613 están delecionados de la secuencia de referencia, y se incorpora la siguiente secuencia en KPM318 (los nucleótidos terminales, mostrados en los extremos de la secuencia, están presentes en KPM318 y se corresponden con las bases del genoma de MG1655: una T en 4331973 y una C en 4333614):

SEQID19:
 4331973

TCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG
 TATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACC

4333614

FIG. 14h

BW30270

Células SNP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Diferencia con respecto a MG1655
547694	532112	A	G	100	16	16	<i>yfbB</i>	E to E	silencioso	BW30270
3753464	3683218	G	C	100	22	22	<i>abdB</i>	T to T	silencioso	BW30270
3957957	3879611	C	T	100	9	9	ninguno	?	No se aprecia ninguna característica	BW30270

Células DIP

Coste de delección/inserción=2/2

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Diferencia con respecto a MG1655
3558478	3490410	G	-	100	19	19	<i>glpR</i>	1 bp DEL	desplazamiento de fase de lectura	BW30270

KPM318

Células SNP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Diferencia con respecto a MG1655
547694	532113	A	G	100	17	17	<i>yfbB</i>	F to F	silencioso	BW30270
965895	941104	C	T	100	24	24	<i>msbA</i>	P185	Supresor conocido	KPM318
3188791	3128701	C	T	100	18	18	<i>yqjI</i>	S to S	silencioso	KPM318
3644838	3571752	G	T	100	15	15	<i>gor</i>	V173F	¿Actividad alterada de la oxidoreductasa de glutación?	KPM318
3753464	3678244	G	C	100	19	19	<i>abdB</i>	T to T	silencioso	BW30270
3798895	3720343	T	A	100	12	12	<i>rfaY</i>	T32Y	¿Alteración en la síntesis del núcleo de azúcar del LPS?	KPM318
3957957	3874634	C	T	100	10	10	ninguno	?	no se aprecia ninguna característica	BW30270

Células DIP

Coste de delección/inserción=2/2

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Diferencia con respecto a MG1655
3558478	3490410	C	-	100	18	18	<i>glpR</i>	1 bp DEL	desplazamiento de fase de lectura	BW30270

FIG. 15

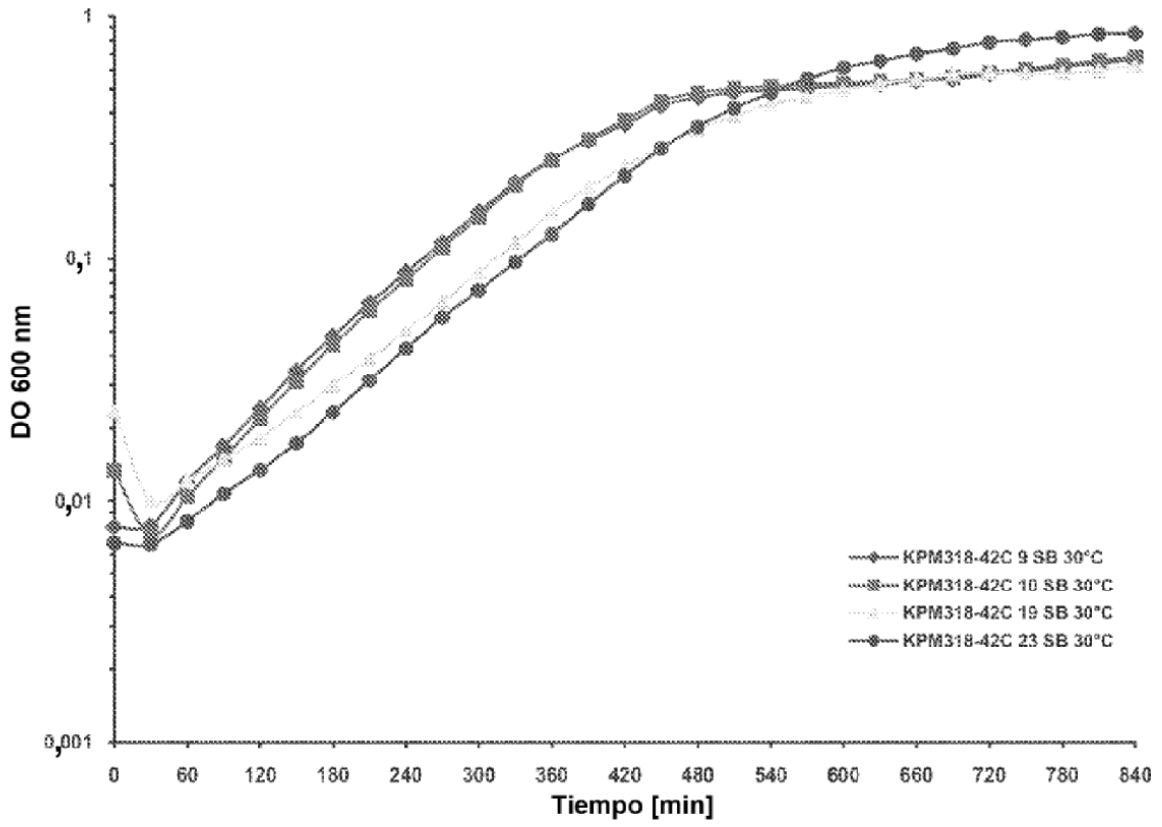


FIG. 16

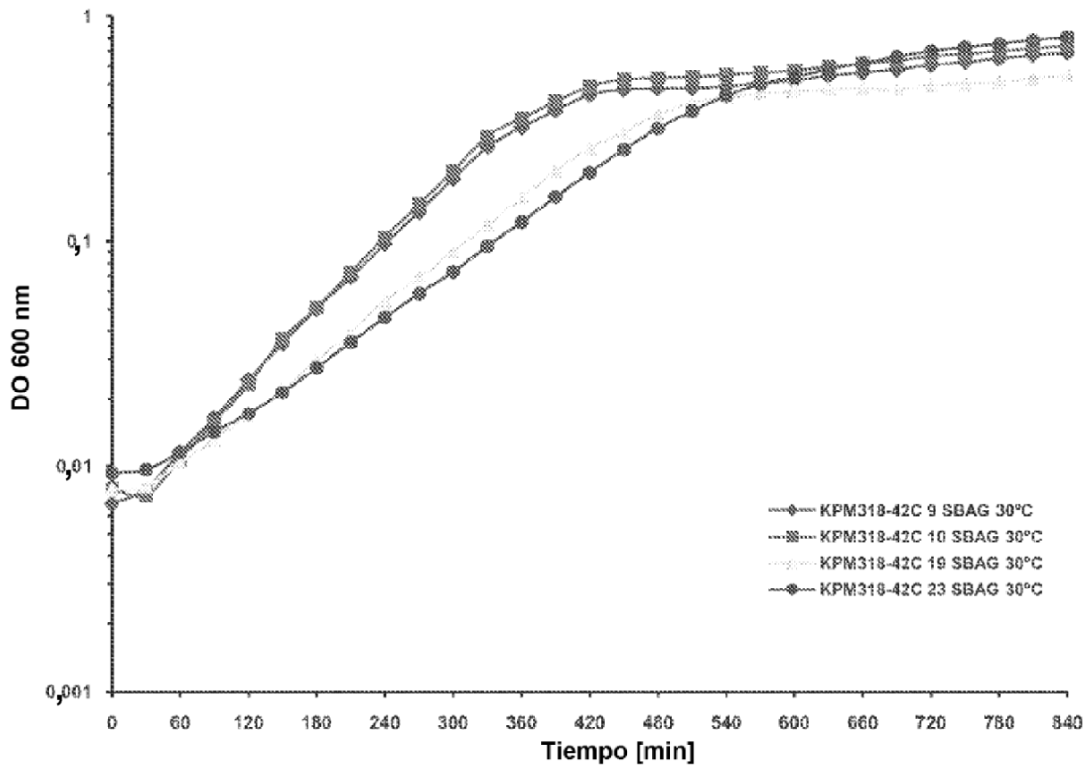


FIG. 17

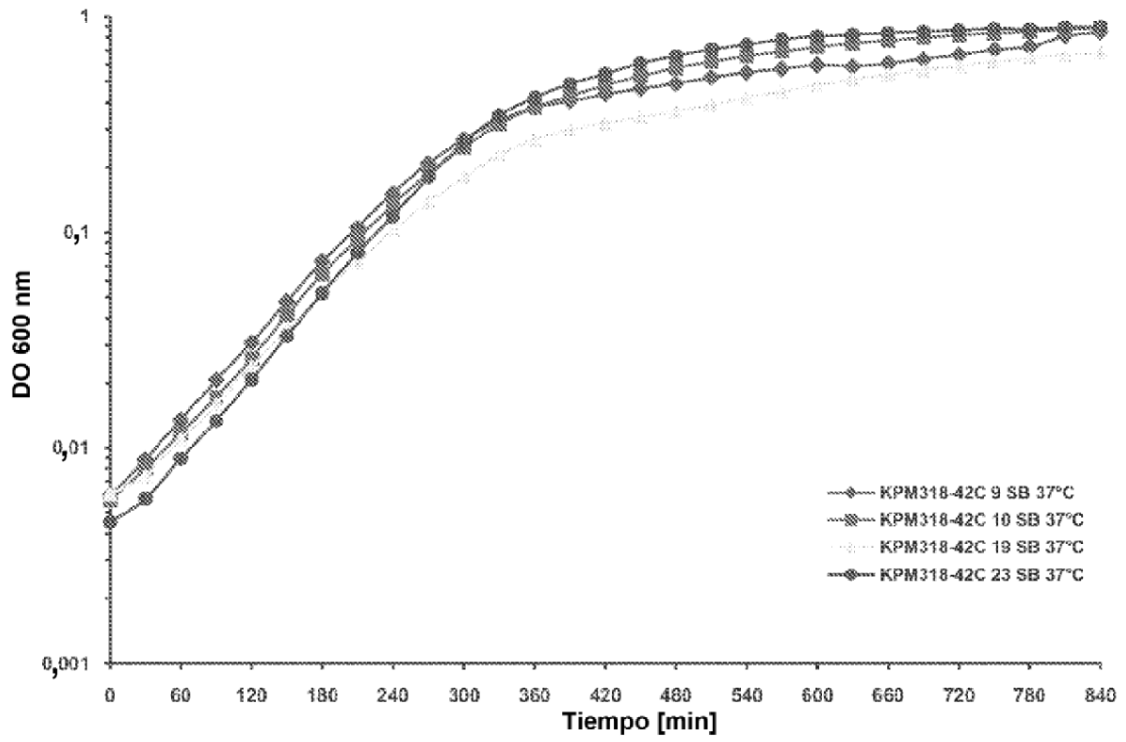


FIG. 18

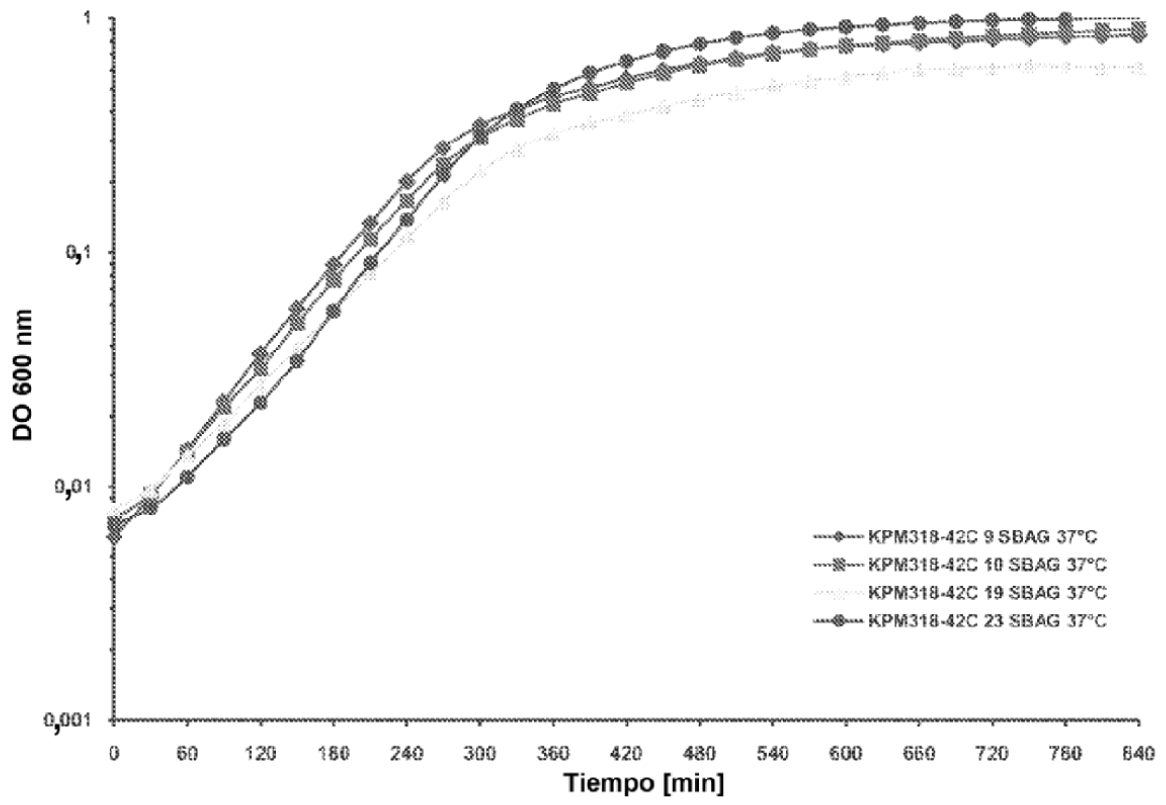


FIG. 19

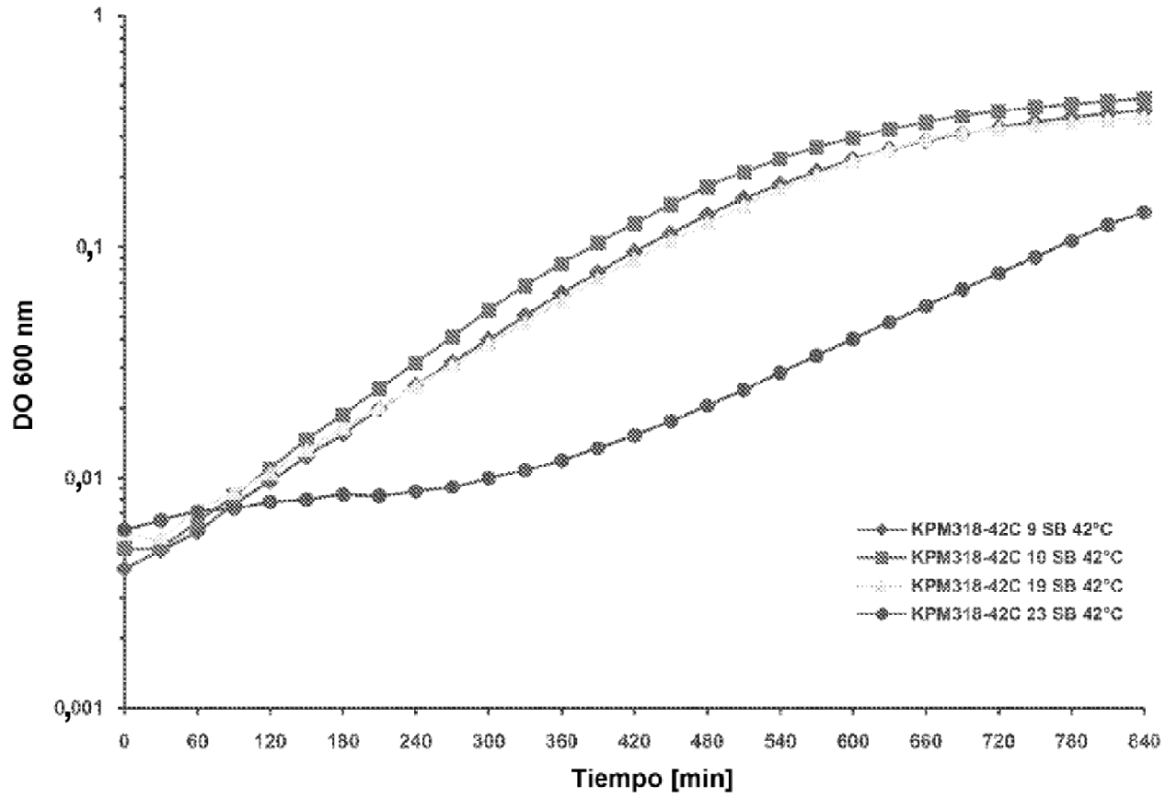


FIG. 20

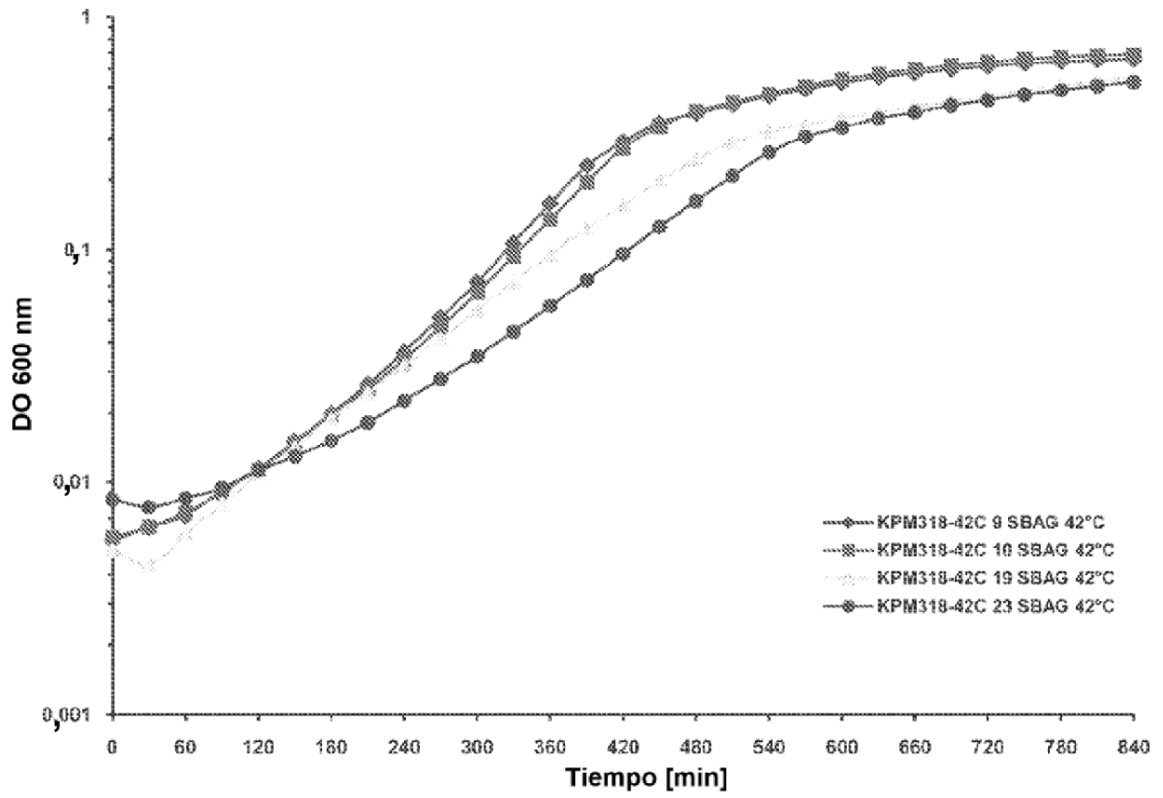


FIG. 21

ES 2 611 833 T3

KPM318-9

Células SNP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de		Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto
		referencia	mutante						
193052	191000	G	T	100	30	30	<i>frt</i>	D61Y	Factor de reciclado del ribosoma alterado UNICO hasta 9 y 10
547694	532079	A	G	100	16	16	<i>yfbB</i>	E to E	silencioso BW30270
965895	941032	C	T	100	19	19	<i>msbA</i>	P18S	supresor conocido KPM36
3188791	3128548	C	T	100	12	12	<i>yqiI</i>	S to S	silencioso KPMs
3644838	3571599	G	T	100	17	17	<i>gor</i>	V173F	¿Actividad alterada de la oxidoreductasa de glutación? KPMs
3753464	3678094	G	C	100	17	17	<i>aldB</i>	T to I	silencioso BW30270
3798895	3720172	T	A	100	10	10	<i>rfaY</i>	T32Y	¿Alteración en la síntesis del núcleo de azúcar del LPS? KPMs
3957957	3874474	C	T	100	10	10	ninguno	?	no se aprecia ninguna característica BW30270

Células DIP

Coste de delección/inserción=2/2

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de		Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto
		referencia	mutante						
3558478	3490169	G	-	100	20	20	<i>glnH</i>	1 bp DEL	desplazamiento de fase de lectura BW30270

FIG. 22a

KPM318-10

Células SNP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de		Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto
		referencia	mutante						
193052	191008	G	T	100	28	28	<i>frt</i>	D61Y	Factor de reciclado del ribosoma alterado UNICO hasta 9 y 10
547694	532080	A	G	100	18	18	<i>yfbB</i>	E to E	silencioso BW30270
965895	941034	C	T	100	27	27	<i>msbA</i>	P18S	Supresor conocido KPM36
3188791	3128576	C	T	100	13	13	<i>yqiI</i>	S to S	silencioso KPMs
3644838	3571685	G	T	100	19	19	<i>gor</i>	V173F	¿Actividad alterada de la oxidoreductasa de glutación? KPMs
3753464	3678183	G	C	100	19	19	<i>aldB</i>	T to I	silencioso BW30270
3798895	3720277	T	A	100	10	10	<i>rfaY</i>	T32Y	¿Alteración en la síntesis del núcleo de azúcar del LPS? KPMs
3957957	3874571	C	T	100	6	6	ninguno	?	no se aprecia ninguna característica BW30270

Células DIP

Coste de delección/inserción=2/2

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de		Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto
		referencia	mutante						
3558478	3490181	C	-	100	20	20	<i>glnH</i>	1 bp DEL	desplazamiento de fase de lectura BW30270

FIG. 22b

KPM318-19

Células SNP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Estirpe
547694	532090	A	G	100	20	20	<i>yhbB</i>	F to F	silencioso	BW30279
855895	941050	C	T	100	17	17	<i>msbA</i>	P185	supresor conocido	KPMs
3188791	3128613	C	T	100	18	18	<i>yqi</i>	S to S	silencioso	KPMs
3644838	3571682	G	T	100	16	16	<i>gor</i>	V173F	¿Actividad alterada de la oxidoreductasa de glutación?	KPMs
3753464	3678174	G	C	100	19	19	<i>aldB</i>	T to T	silencioso	BW30279
3798895	3720279	T	A	100	10	10	<i>rfaY</i>	T32Y	¿Alteración en la síntesis del núcleo de azúcar del LPS?	KPMs
3957957	3874575	C	T	100	12	12	ninguno	/	no se aprecia ninguna característica	BW30279

Células DIP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Estirpe
3558478	3490283	G	-	100	21	21	<i>gluR</i>	1 bp DEL	desplazamiento de fase de lectura	BW30279
4373919	4271896	-	T	100	38	38	<i>efp</i>		desplazamiento de fase de lectura en el factor de elongación P	ESTA CEPA CLÍNICA ES EL MEJOR CANDIDATO PARA EL FENOTIPO

FIG. 22c

KPM318-23

Células SNP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Estirpe
547694	532099	A	G	100	27	27	<i>yfbB</i>	E to E	silencioso	BW30270
965895	941061	C	T	100	25	25	<i>msbA</i>	P18S	supresor conocido	KPM96
3188791	3128668	C	T	100	8	8	<i>yqiI</i>	S to S	silencioso	KPM5
3644838	3571751	G	T	100	23	23	<i>gar</i>	V173F	¿Actividad alterada de la oxidoreductasa de glutación?	KPM5
3753464	3678248	G	C	100	35	35	<i>aldB</i>	T to T	silencioso	BW30270
3798895	3720343	T	A	100	12	12	<i>rfaY</i>	T32Y	¿Alteración de la síntesis del núcleo de azúcar del LPS?	KPM5
3957957	3874633	C	T	100	8	8	ninguno	?	No se aprecia ninguna característica	BW30270

Células DIP

Posición de referencia	Posición de consenso	Base del alelo de referencia	Base del alelo mutante	Frecuencia	n°	n° total	Gen	Cambio de aminoácido	Efecto	Estirpe
2139799	2095371	CAGCGG	-	100	10	10	<i>dcd</i>	PLPLAL por PLAL	Delección de 2 aa	ÚNICA
3558478	3490307	G	-	100	35	35	<i>gluR</i>		desplazamiento de fase de lectura	BW30270

FIG. 22d

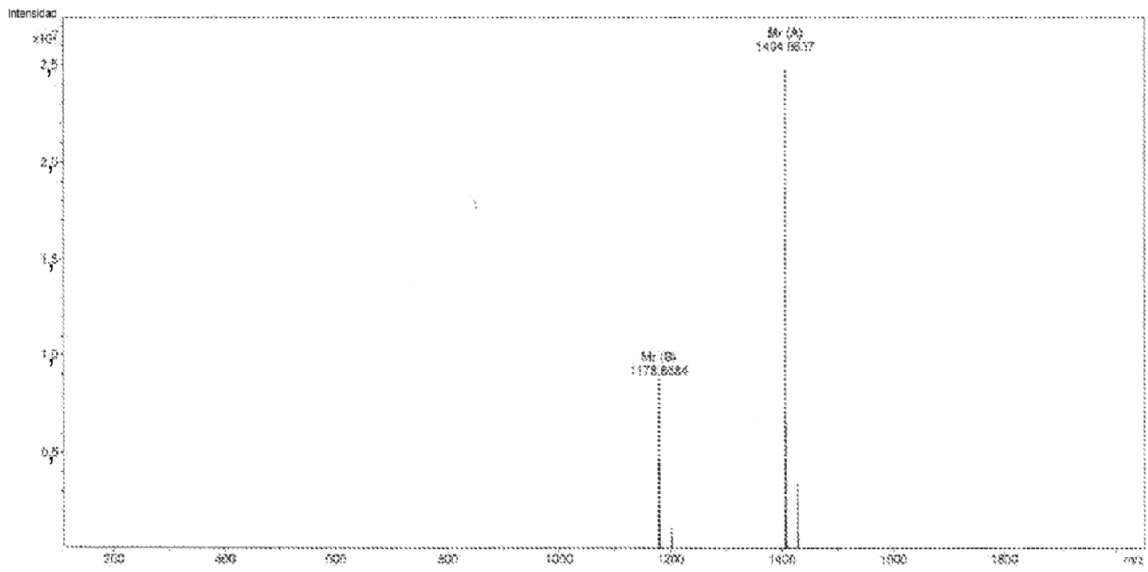


FIG. 23

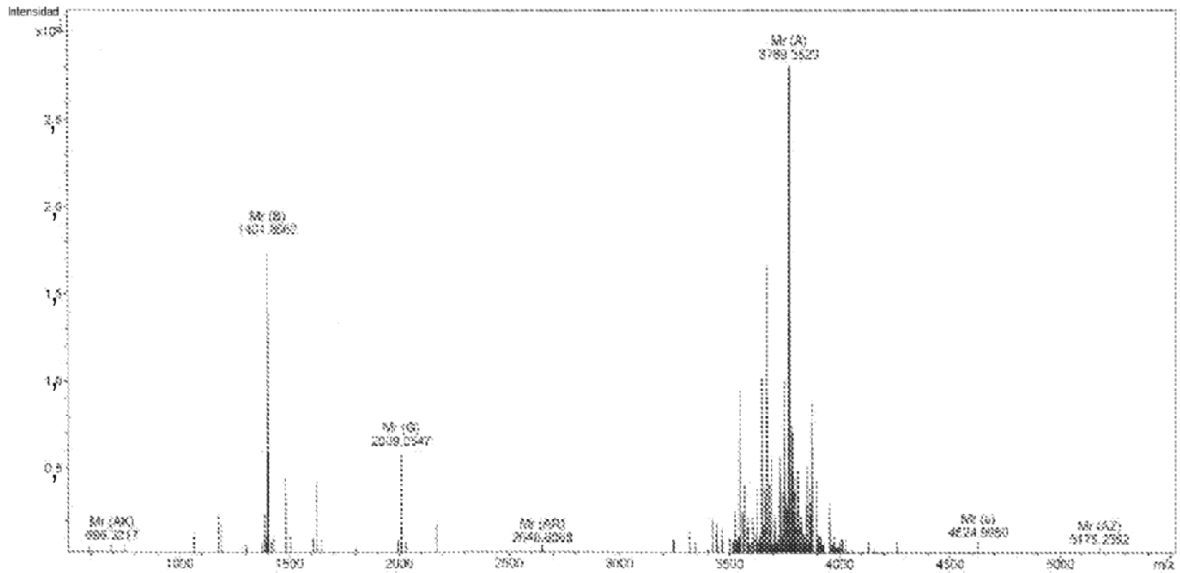


FIG. 24

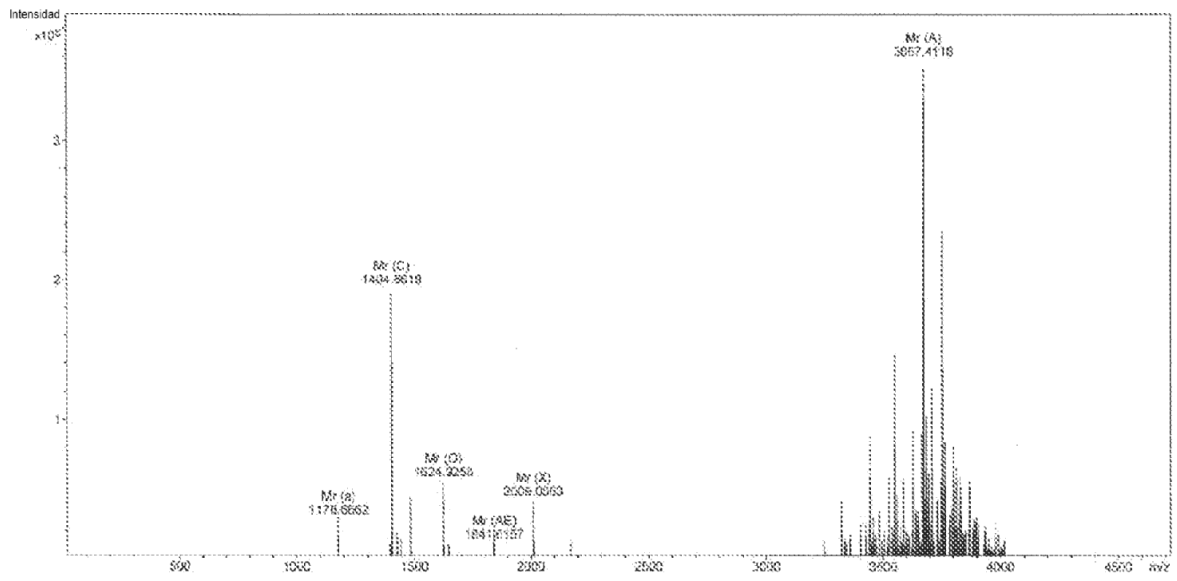


FIG. 25

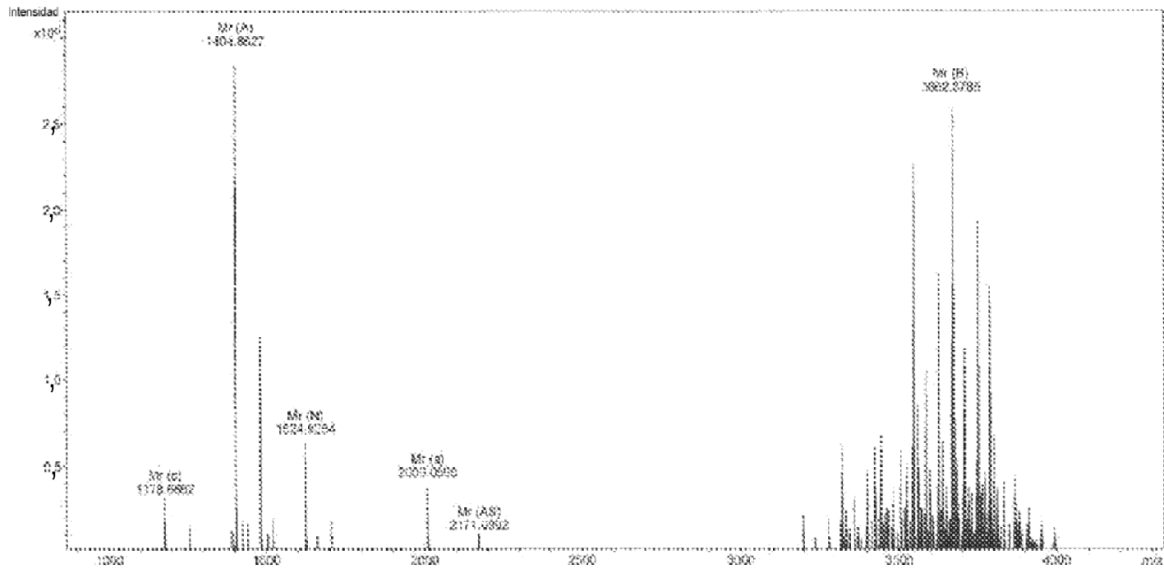


FIG. 26

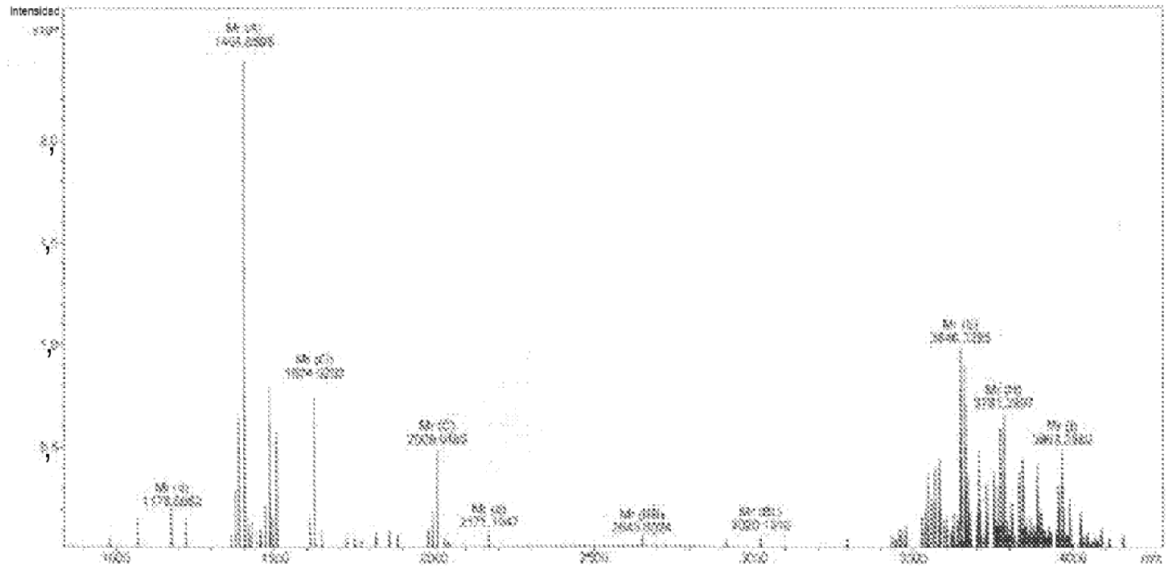


FIG. 27

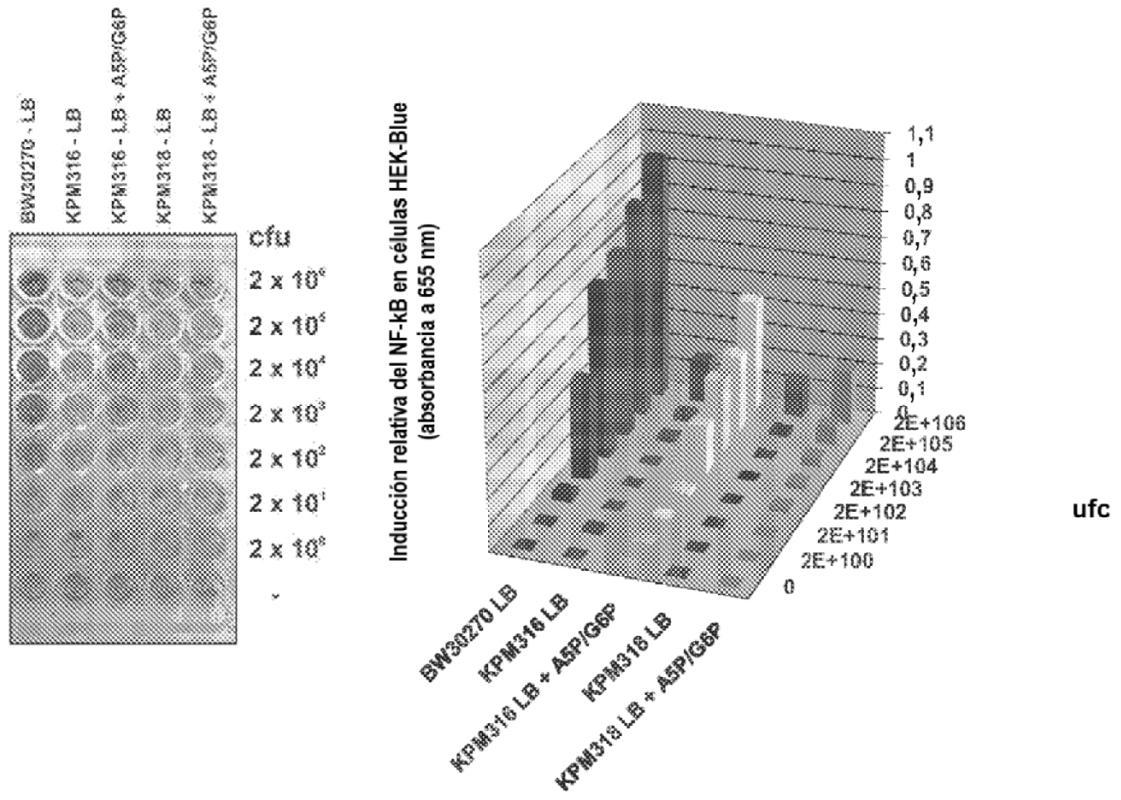


FIG. 28

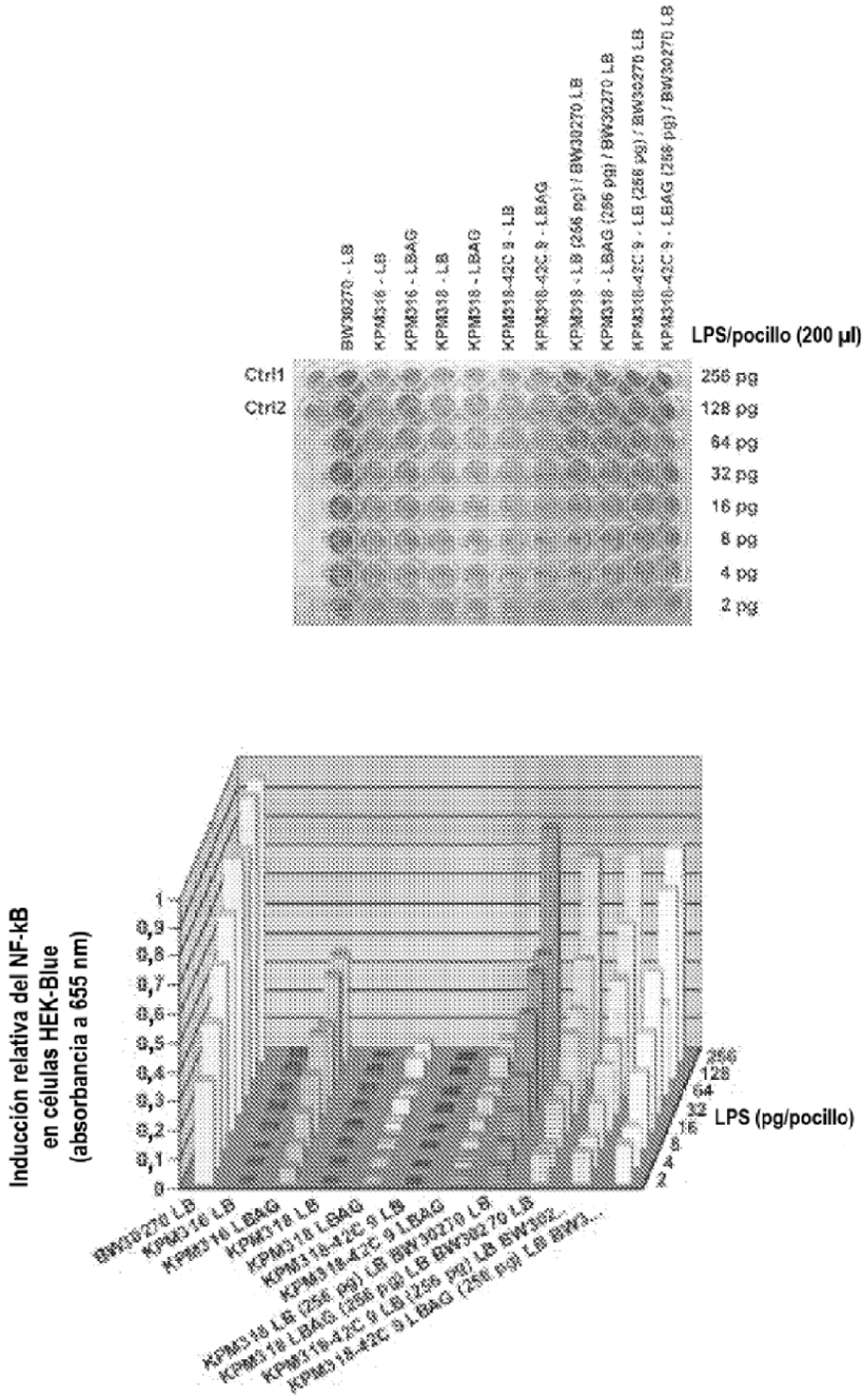


FIG. 29

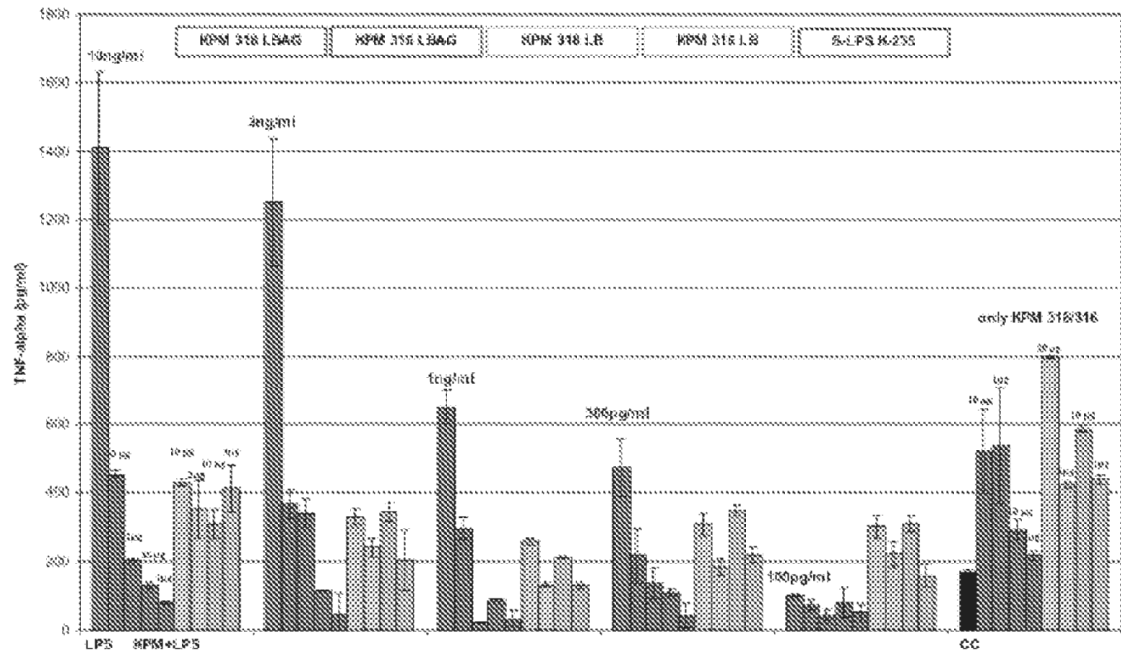


FIG. 30

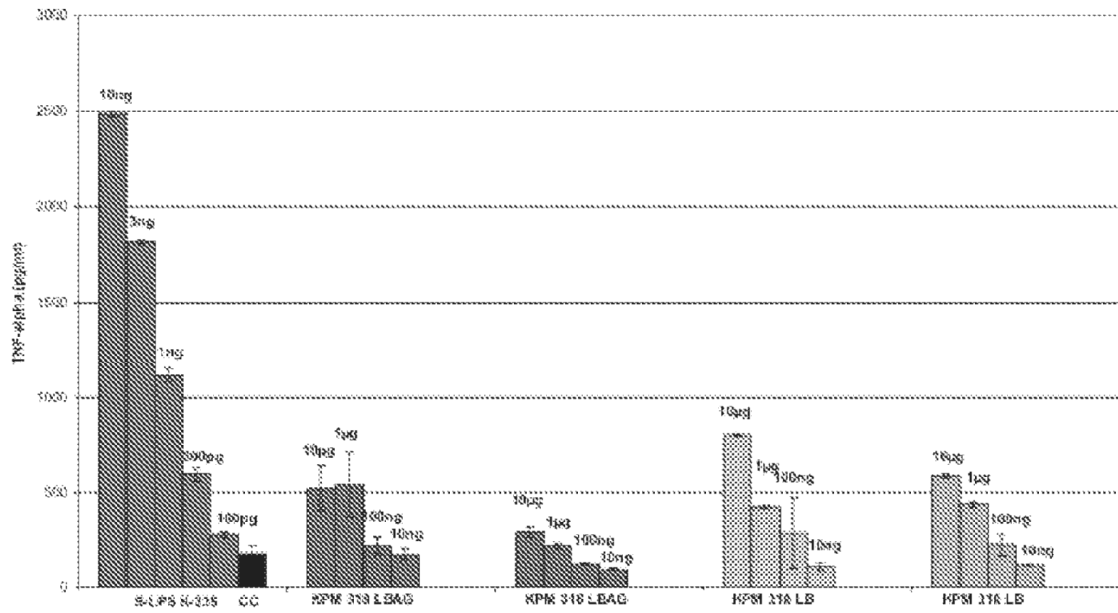


FIG. 31

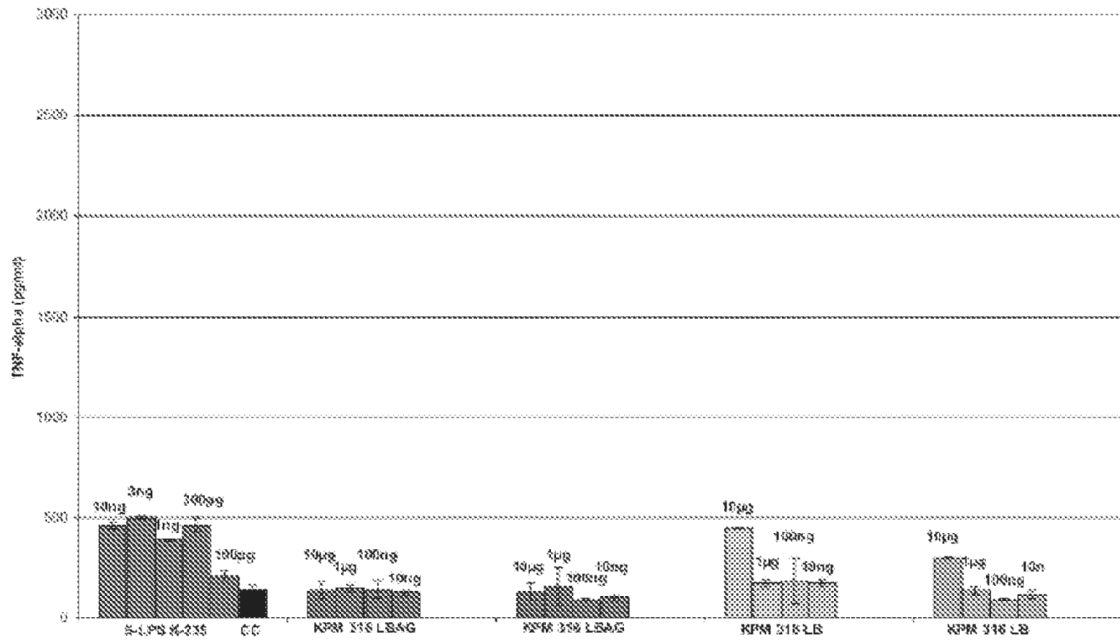


FIG. 32

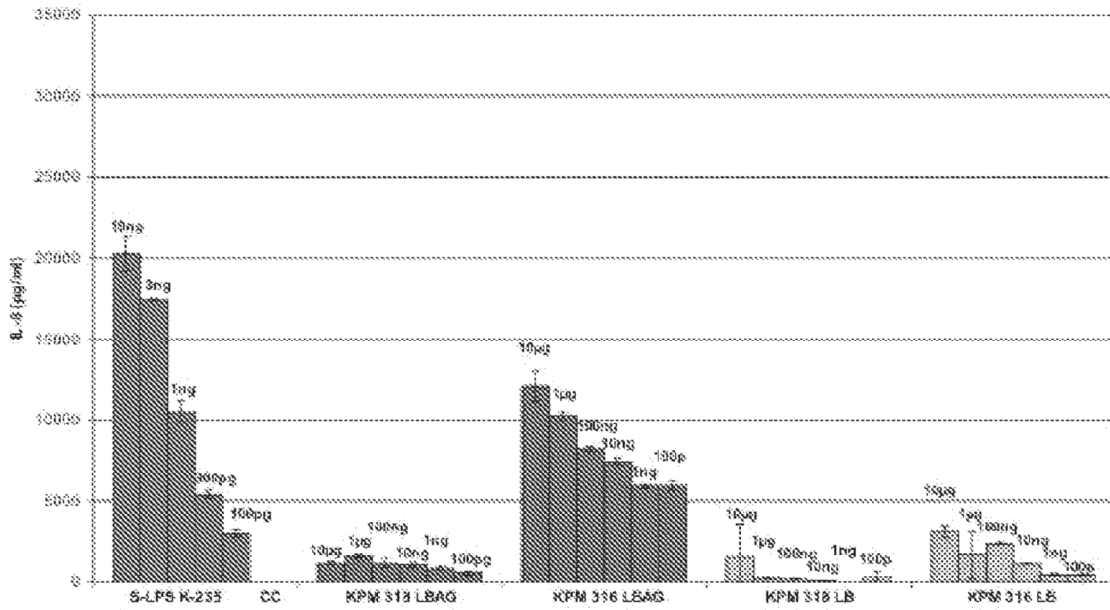


FIG. 33

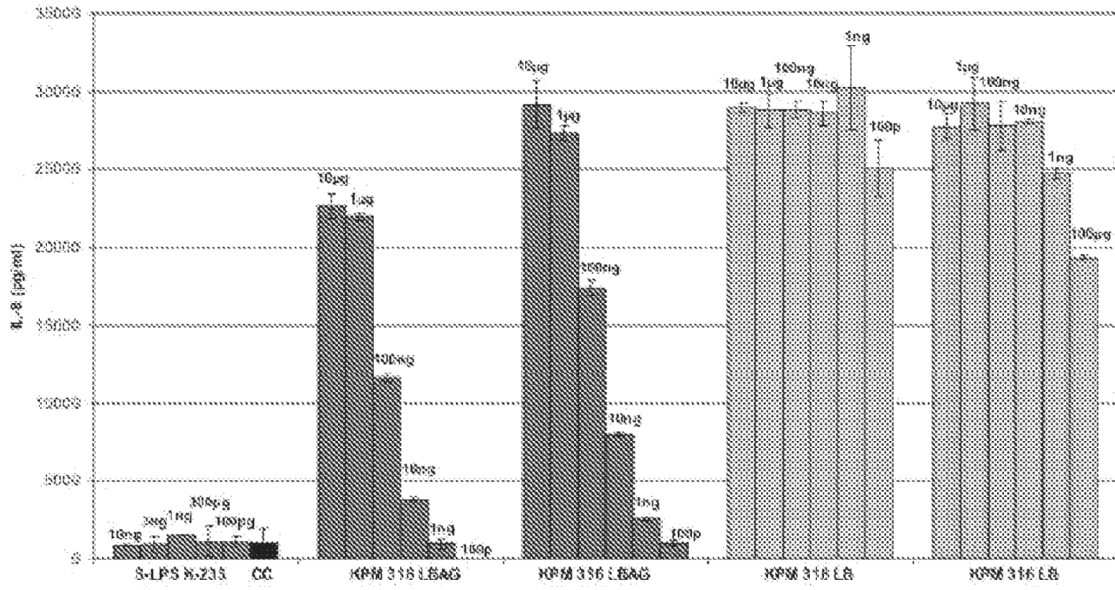


FIG. 34

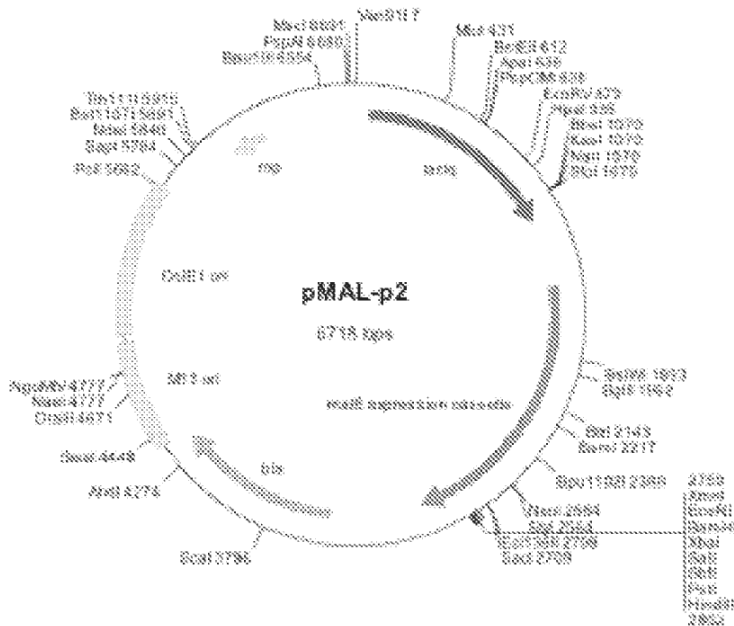
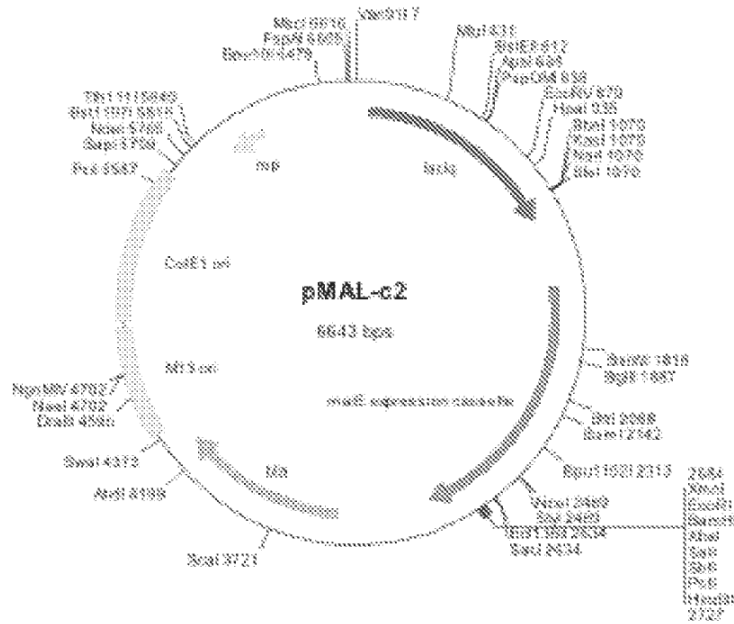
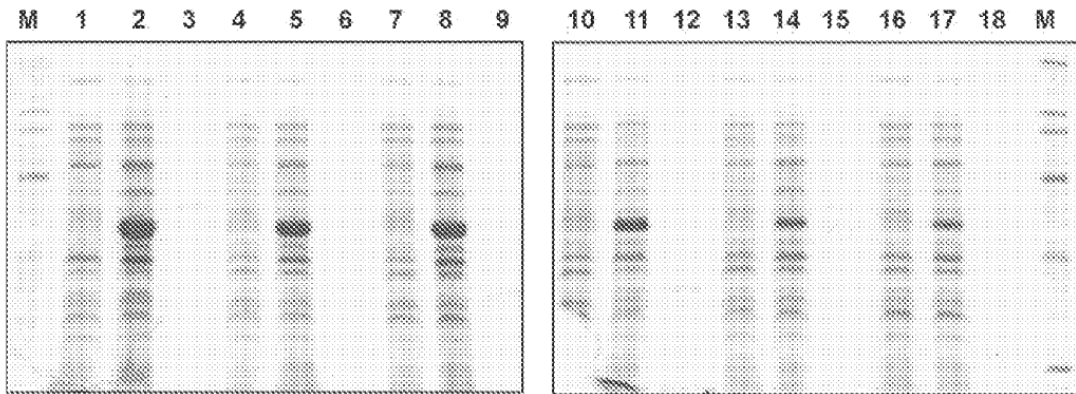
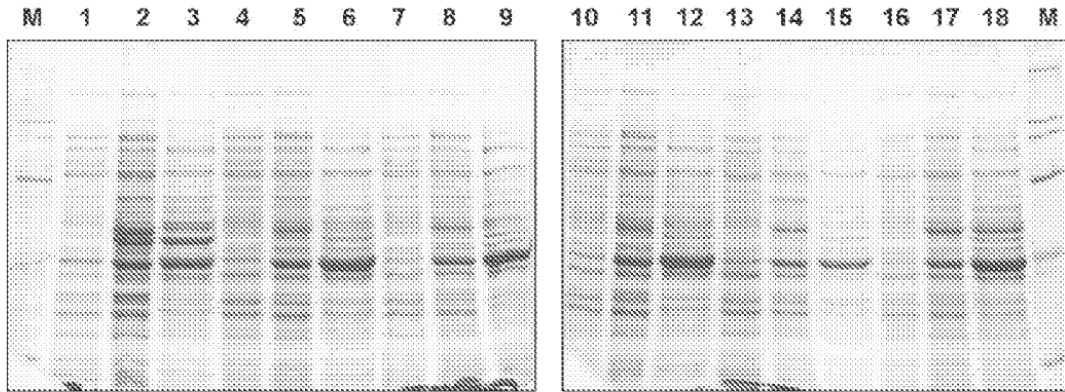


FIG. 35



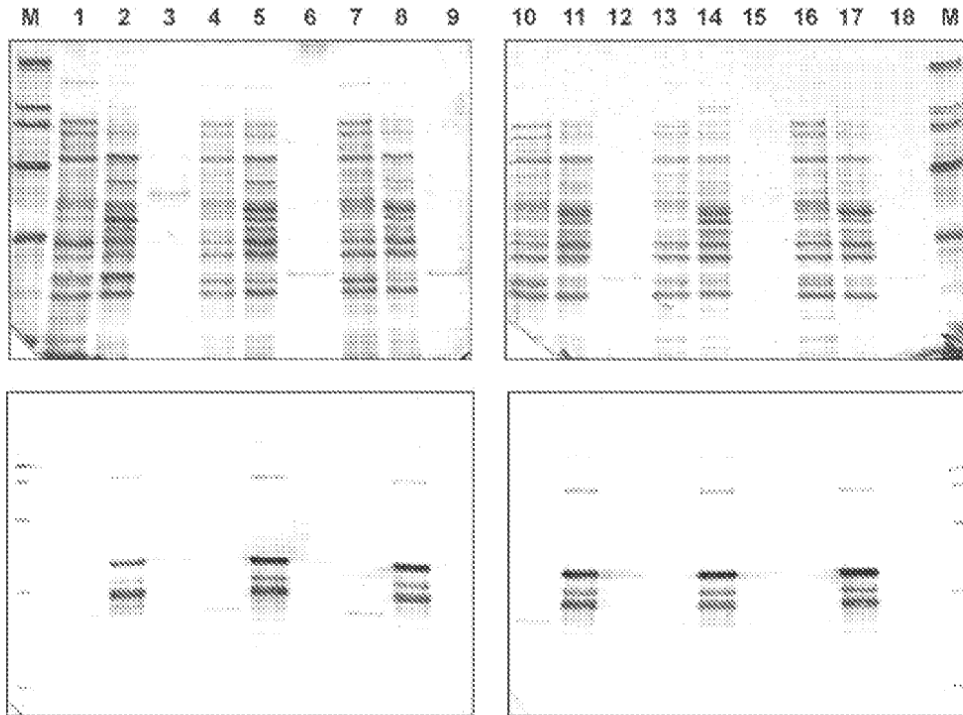
1. BW30270/pMAL-c2 - no inducido
2. BW30270/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (3 h)
3. BW30270/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
4. KPM318/pMAL-c2 - no inducido
5. KPM318/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (3 h)
6. KPM318/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
7. KPM318-9/pMAL-c2 – no inducido
8. KPM318-9/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (3 h)
9. KPM318-9/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
10. KPM318-10/pMAL-c2 – no inducido
11. KPM318-10/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (3 h)
12. KPM318-10/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
13. KPM318-19/pMAL-c2 – no inducido
14. KPM318-19/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (3 h)
15. KPM318-19/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
16. KPM318-23/pMAL-c2 –no inducido
17. KPM318-23/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (3 h)
18. KPM318-23/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)

FIG. 36



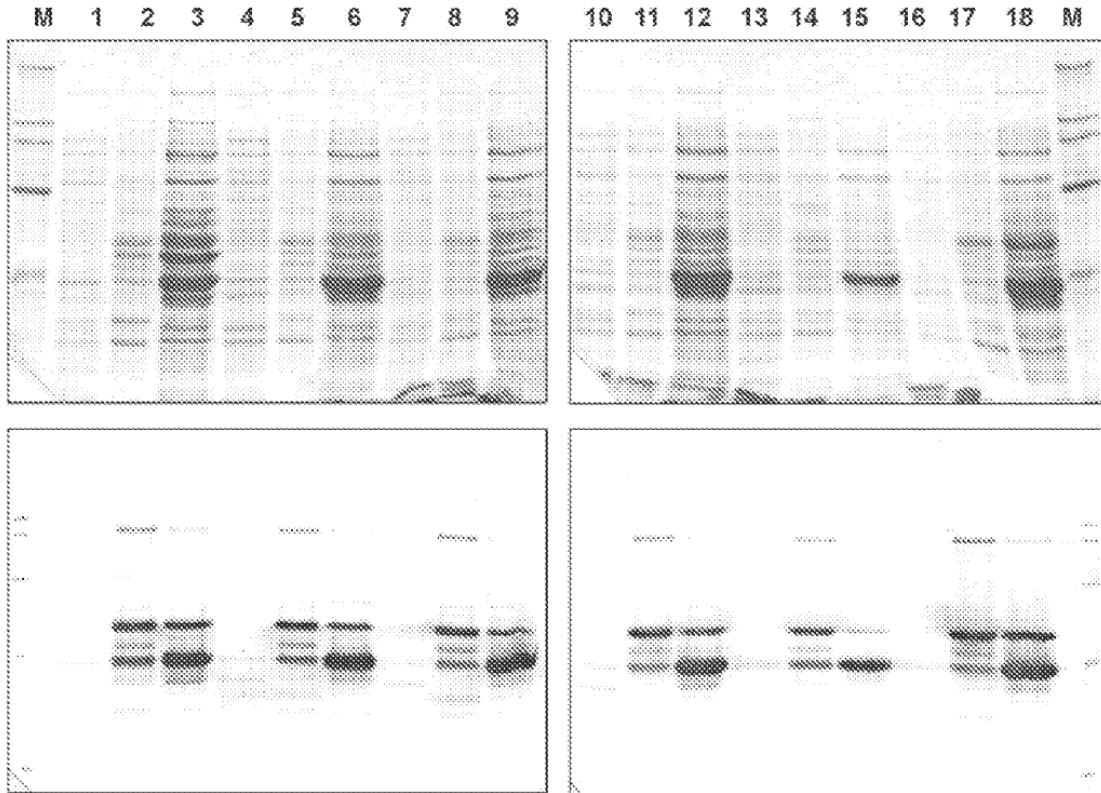
1. BW30270/pMAL-p2 - no inducido
2. BW30270/pMAL-p2 -- extracto de proteína, inducido (3 h)
3. BW30270/pMAL-p2 -- sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
4. KPM318/pMAL-p2 -no inducido
5. KPM318/pMAL-p2 -- extracto de proteína, inducido (3 h)
6. KPM318/pMAL-p2 -- sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
7. KPM318-9/pMAL-p2 -- no inducido
8. KPM318-9/pMAL-p2 -- extracto de proteína, inducido (3 h)
9. KPM318-9/pMAL-p2 --sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
10. KPM318-10/pMAL-p2 -- no inducido
11. KPM318-10/pMAL-p2 -- extracto de proteína, inducido (3 h)
12. KPM318-10/pMAL-p2 --sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
13. KPM318-19/pMAL-p2 -- no inducido
14. KPM318-19/pMAL-p2 -- extracto de proteína, inducido (3 h)
15. KPM318-19/pMAL-p2 -- sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
16. KPM318-23/pMAL-p2 -- no inducido
17. KPM318-23/pMAL-p2 -- extracto de proteína, inducido (3 h)
18. KPM318-23/pMAL-p2 --sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)

FIG. 37



1. BW30270/pMAL-c2 - no inducido
2. BW30270/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (durante la noche)
3. BW30270/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
4. KPM318/pMAL-c2 - no inducido
5. KPM318/pMAL-c2 –extracto de proteína, inducido (durante la noche)
6. KPM318/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
7. KPM318-9/pMAL-c2 – no inducido
8. KPM318-9/pMAL-c2 –extracto de proteína, inducido (durante la noche)
9. KPM318-9/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
10. KPM318-10/pMAL-c2 –no inducido
11. KPM318-10/pMAL-c2 –extracto de proteína, inducido (durante la noche)
12. KPM318-10/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
13. KPM318-19/pMAL-c2 – no inducido
14. KPM318-19/pMAL-c2 – extracto de proteína, inducido (durante la noche)
15. KPM318-19/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
16. KPM318-23/pMAL-c2 –no inducido
17. KPM318-23/pMAL-c2 –extracto de proteína, inducido (durante la noche)
18. KPM318-23/pMAL-c2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)

FIG. 38



1. BW30270/pMAL-p2 - no inducido
2. BW30270/pMAL-p2 – extracto de proteína, inducido (durante la noche)
3. BW30270/pMAL-p2 –sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
4. KPM318/pMAL-p2 - no inducido
5. KPM318/pMAL-p2 – extracto de proteína, inducido (durante la noche)
6. KPM318/pMAL-p2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
7. KPM318-9/pMAL-p2 – no inducido
8. KPM318-9/pMAL-p2 –extracto de proteína, inducido (durante la noche)
9. KPM318-9/pMAL-p2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
10. KPM318-10/pMAL-p2 –no inducido
11. KPM318-10/pMAL-p2 – extracto de proteína, inducido (durante la noche)
12. KPM318-10/pMAL-p2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
13. KPM318-19/pMAL-p2 –no inducido
14. KPM318-19/pMAL-p2 – extracto de proteína, inducido (durante la noche)
15. KPM318-19/pMAL-p2 –sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)
16. KPM318-23/pMAL-p2 –no inducido
17. KPM318-23/pMAL-p2 –extracto de proteína, inducido (durante la noche)
18. KPM318-23/pMAL-p2 – sobrenadante de cultivo, inducido (durante la noche)

FIG. 39

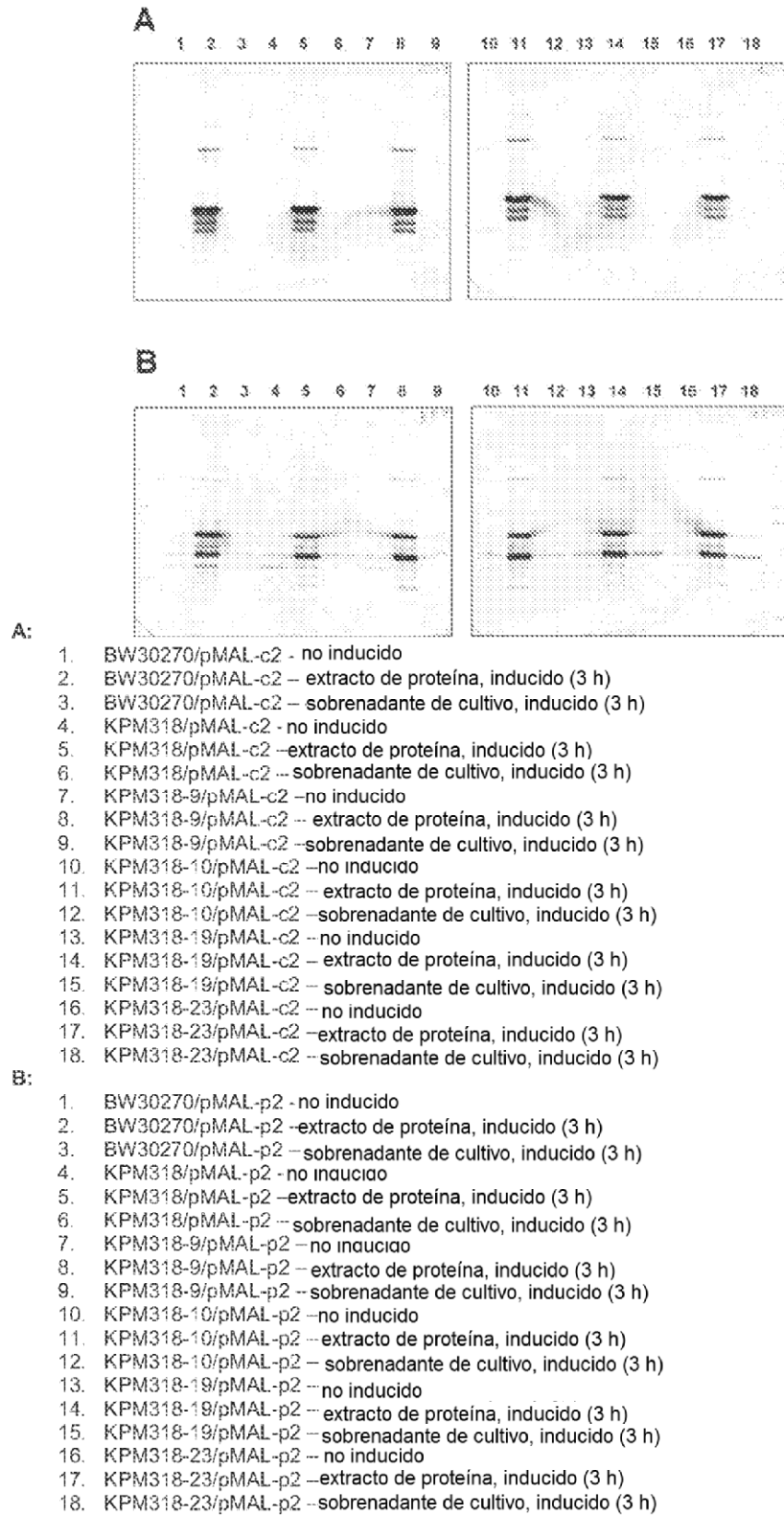
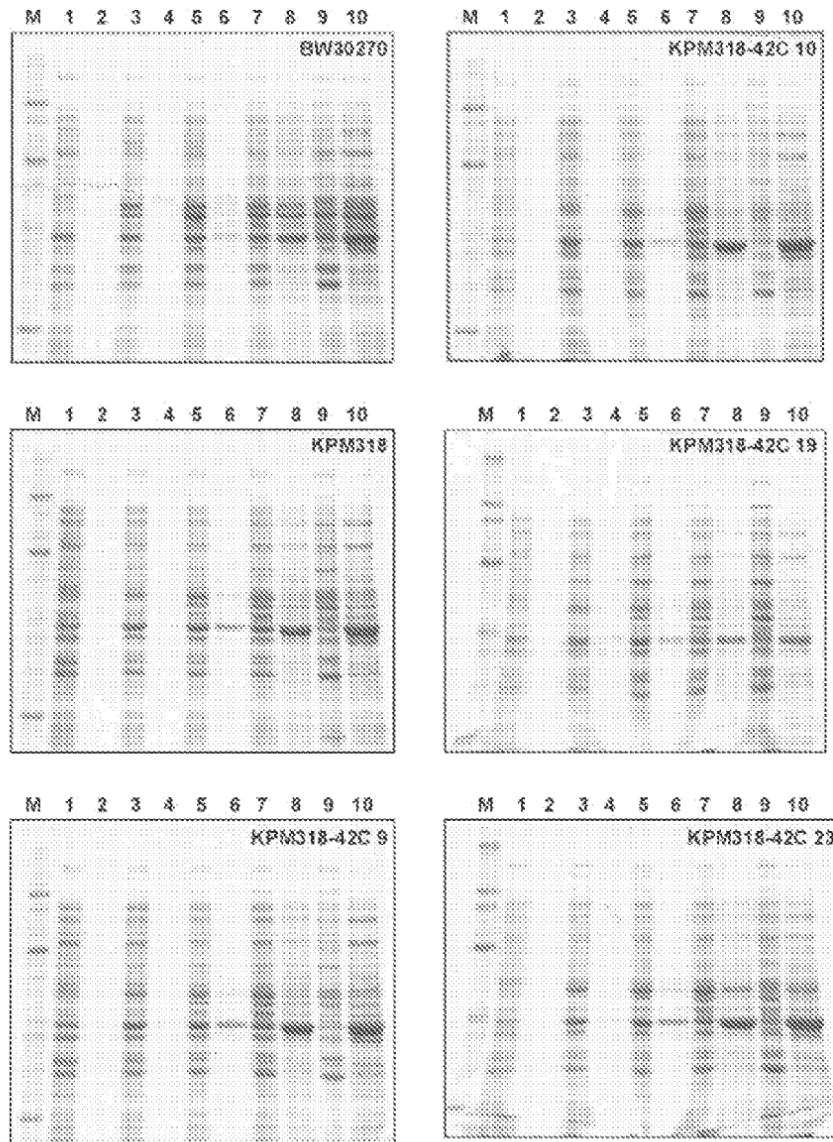
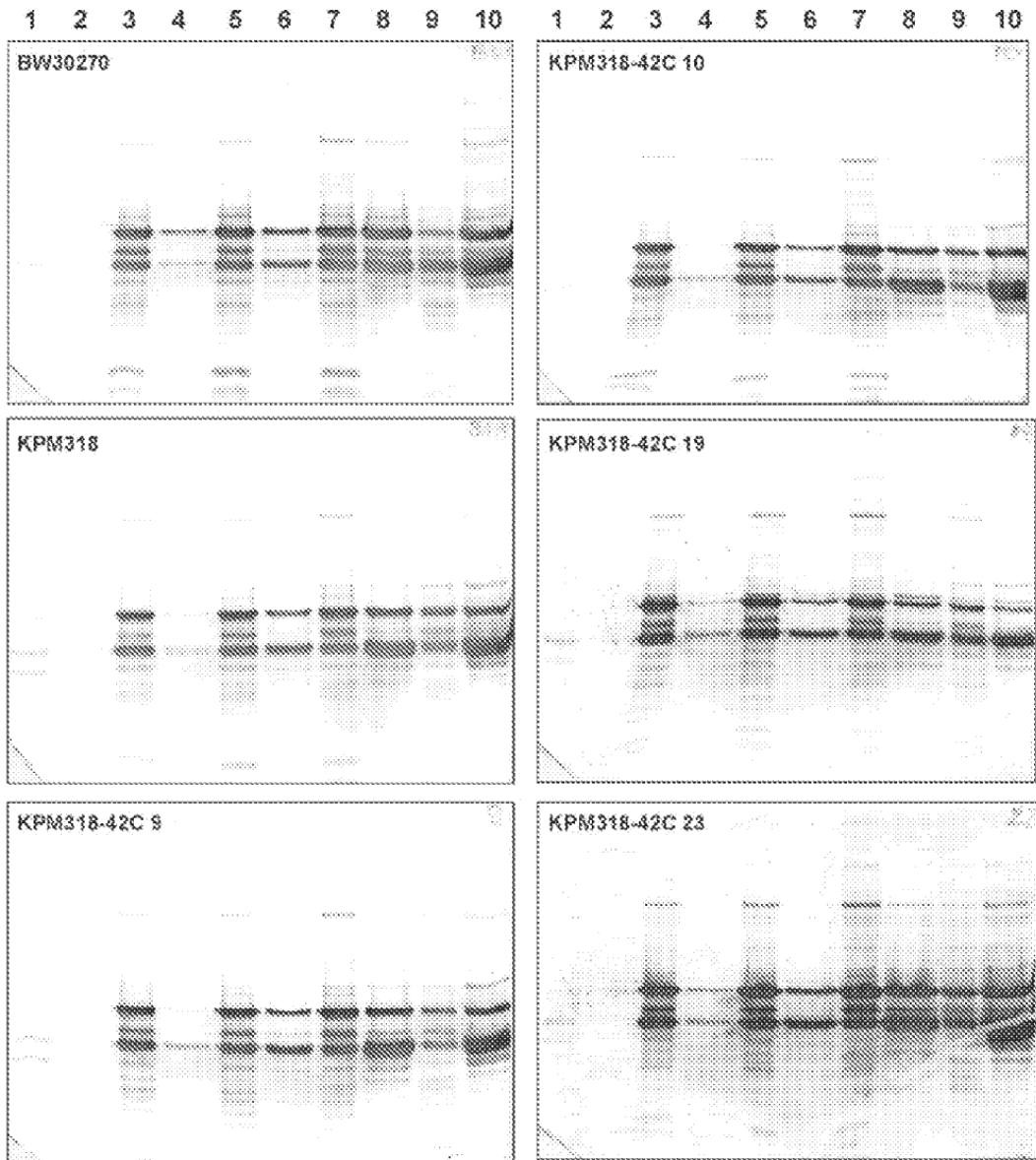


FIG. 40



1. Extracto de proteína - no inducido
2. Sobrenadante de cultivo- no inducido
3. Extracto de proteína - inducido (3 h)
4. Sobrenadante de cultivo- inducido (3 h)
5. Extracto de proteína - inducido (6 h)
6. Sobrenadante de cultivo- inducido (6 h)
7. Extracto de proteína - inducido (12 h)
8. Sobrenadante de cultivo- inducido (12 h)
9. Extracto de proteína - inducido (24 h)
10. Sobrenadante de cultivo- inducido (24 h)

FIG. 41



1. Extracto de proteína - no inducido
2. Sobrenadante de cultivo- no inducido
3. Extracto de proteína - inducido (3 h)
4. Sobrenadante de cultivo- inducido (3 h)
5. Extracto de proteína - inducido (6 h)
6. Sobrenadante de cultivo- inducido (6 h)
7. Extracto de proteína - inducido (12 h)
8. Sobrenadante de cultivo- inducido (12 h)
9. Extracto de proteína - inducido (24 h)
10. Sobrenadante de cultivo- inducido (24 h)

FIG. 42

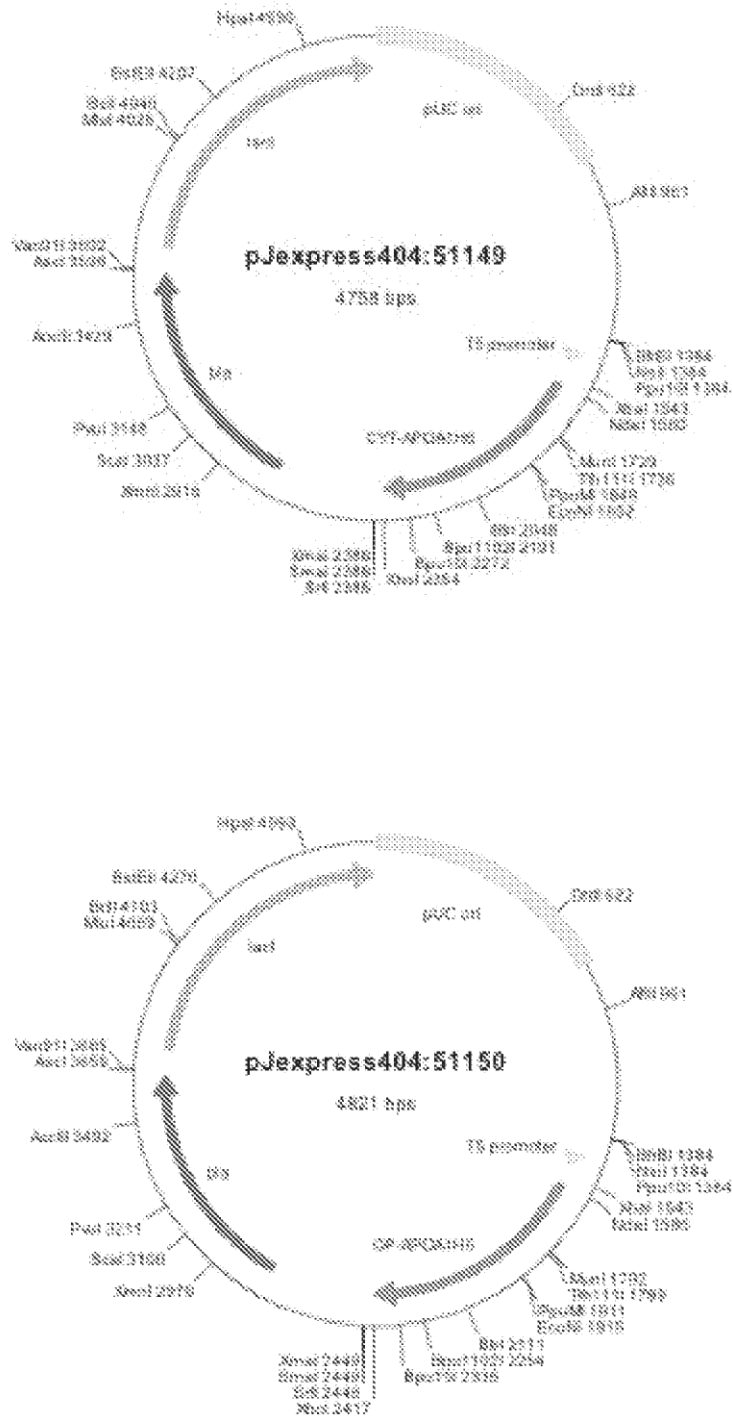
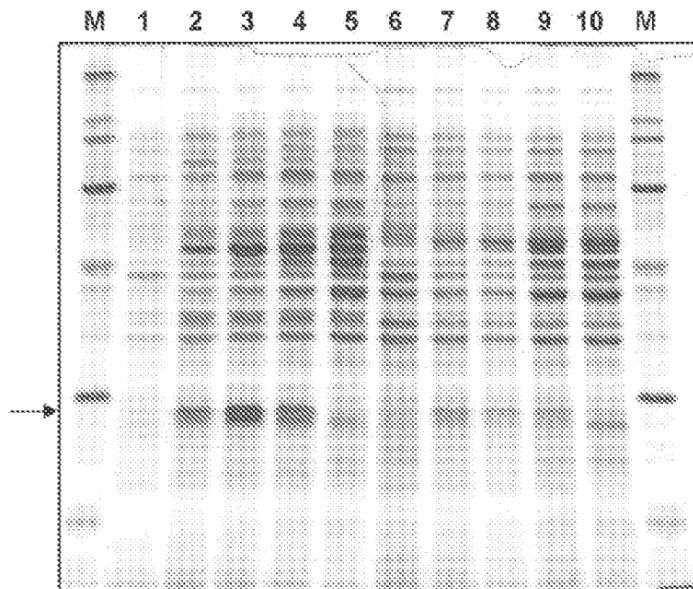
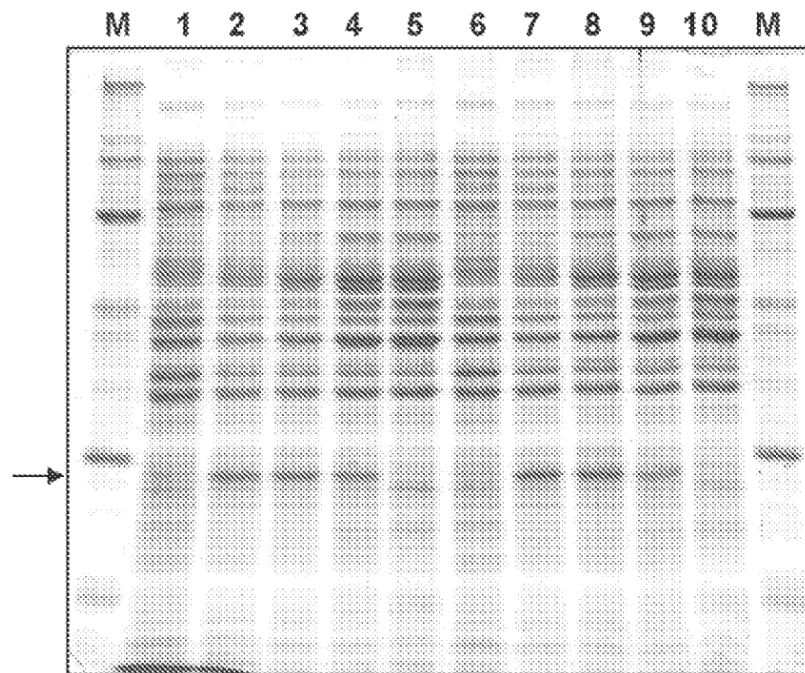


FIG. 43



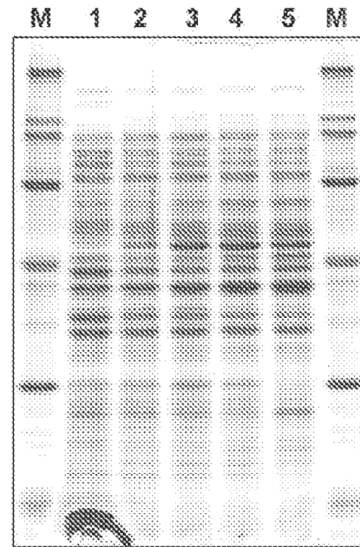
1. BW30270/pJexpress404:51149 - no inducido
2. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
3. BW30270/pJexpress404:51149 -inducido (6 h)
4. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
6. KPM318/pJexpress404:51149 - no inducido
7. KPM318/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
8. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
9. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
10. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)

FIG. 44



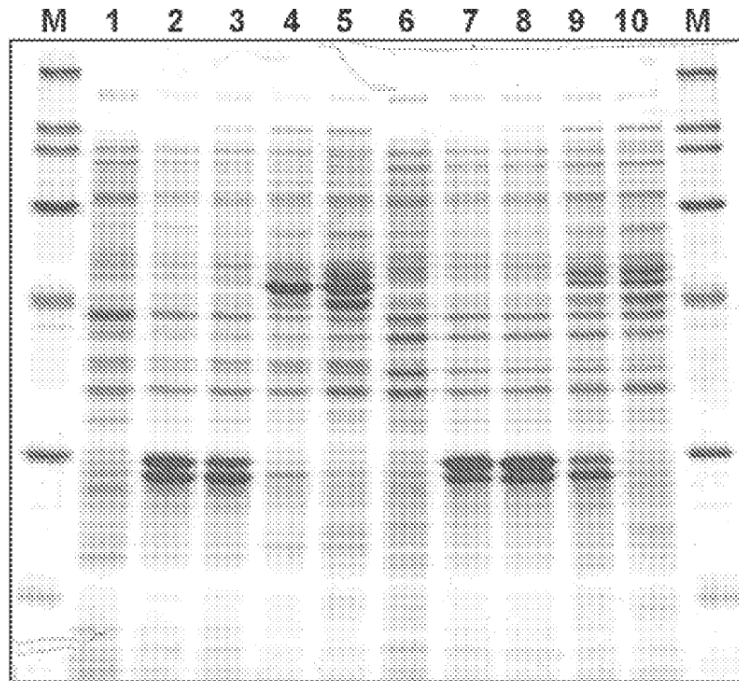
1. KPM318-9/pJexpress404:51149 - no inducido
2. KPM318-9/pJexpress404:51149 - inducido (3 h)
3. KPM318-9/pJexpress404:51149 -inducido (6 h)
4. KPM318-9/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. KPM318-9/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
6. KPM318-10/pJexpress404:51149 -no inducido
7. KPM318-10/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
8. KPM318-10/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
9. KPM318-10/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
10. KPM318-10/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)

FIG. 45



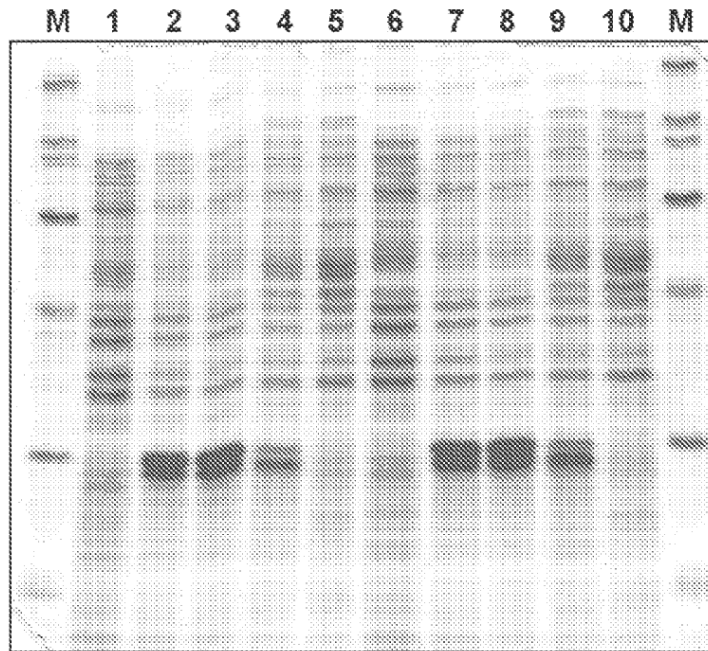
1. KPM318-19/pJexpress404:51149 -no inducido
2. KPM318-19/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
3. KPM318-19/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
4. KPM318-19/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. KPM318-19/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)

FIG. 46



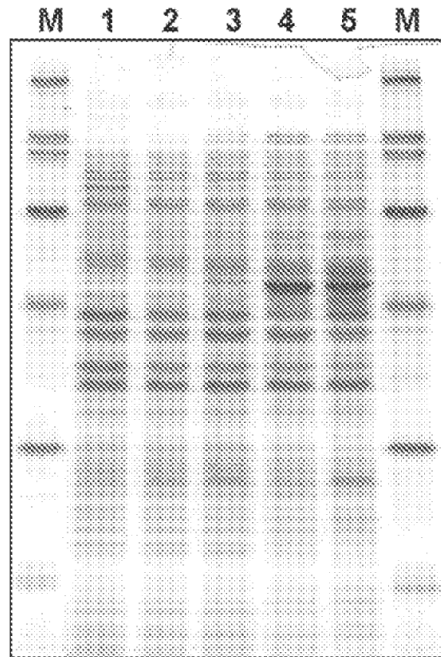
1. BW30270/pJexpress404:51150 -no inducido
2. BW30270/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 47



1. KPM318-9/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-9/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318-10/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318-10/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 48



1. KPM318-19/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-19/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 49

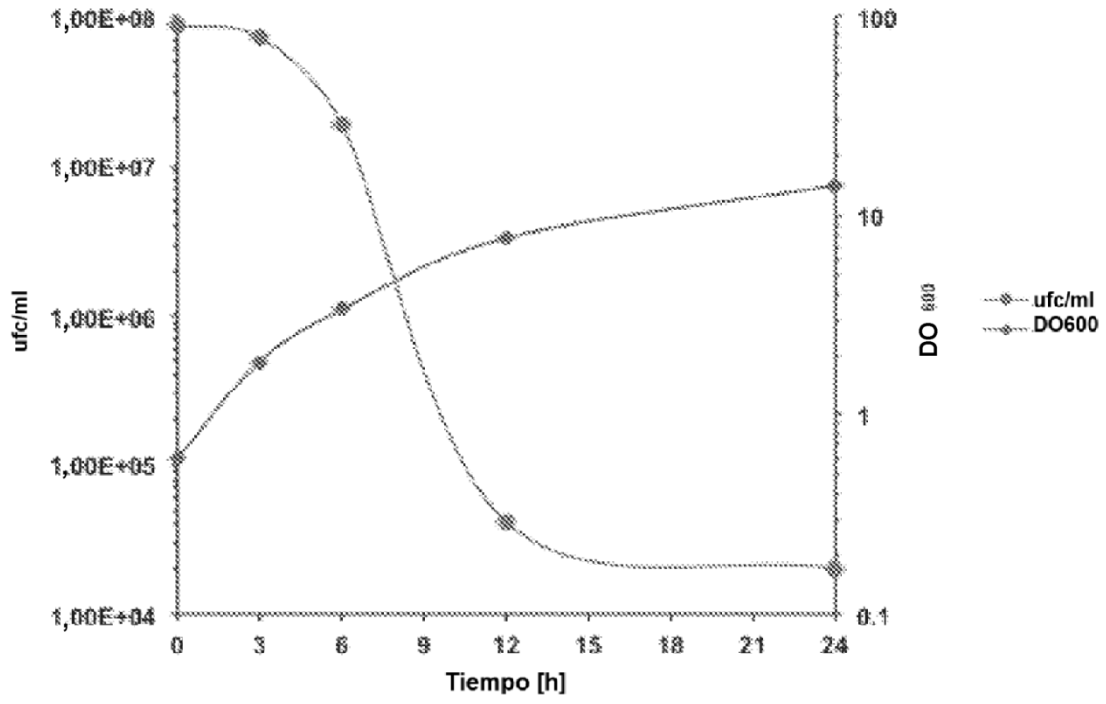
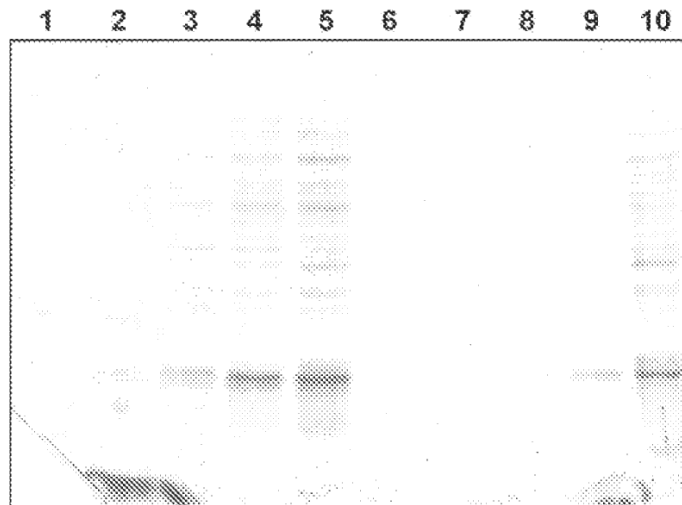
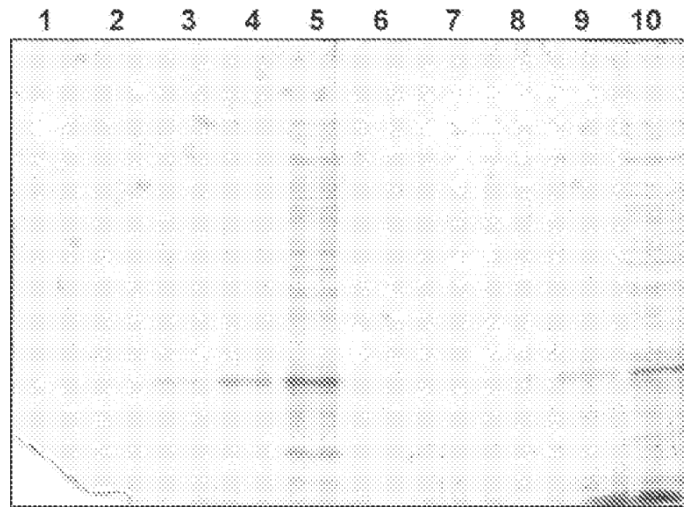


FIG. 50



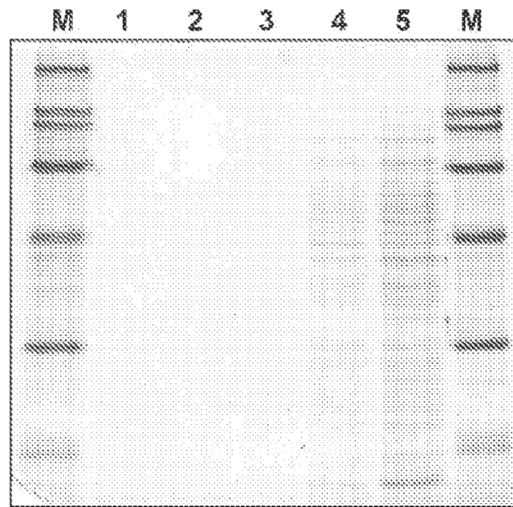
1. BW30270/pJexpress404:51150 -no inducido
2. BW30270/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 51



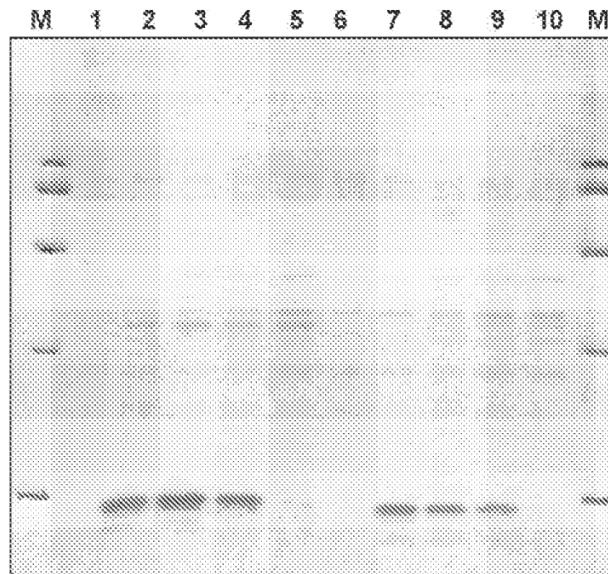
1. KPM318-9/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-9/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318-10/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318-10/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 52



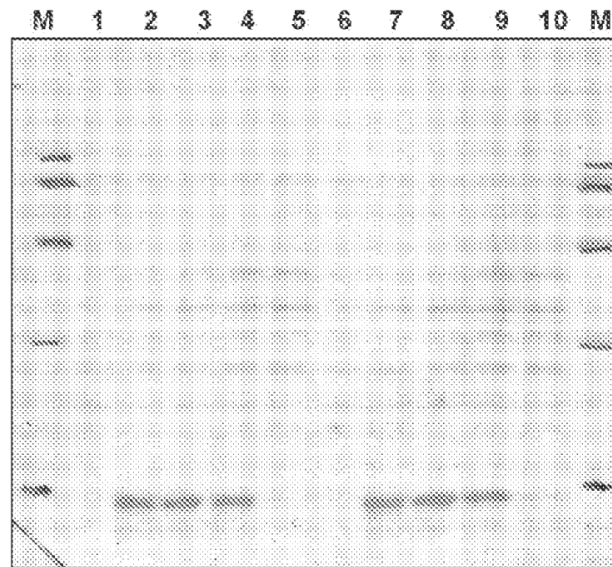
1. KPM318-19/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-19/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 53



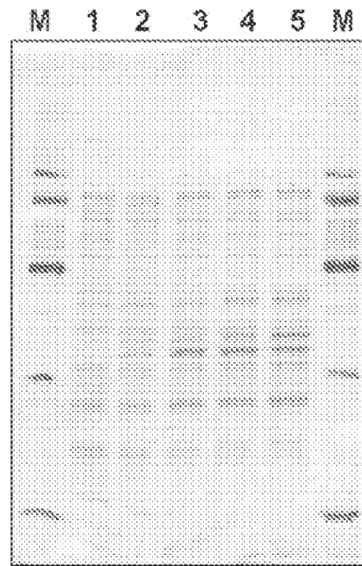
1. BW30270/pJexpress404:51149 -no inducido
2. BW30270/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
3. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
4. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. BW30270/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
6. KPM318/pJexpress404:51149 -no inducido
7. KPM318/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
8. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
9. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
10. KPM318/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)

FIG. 54



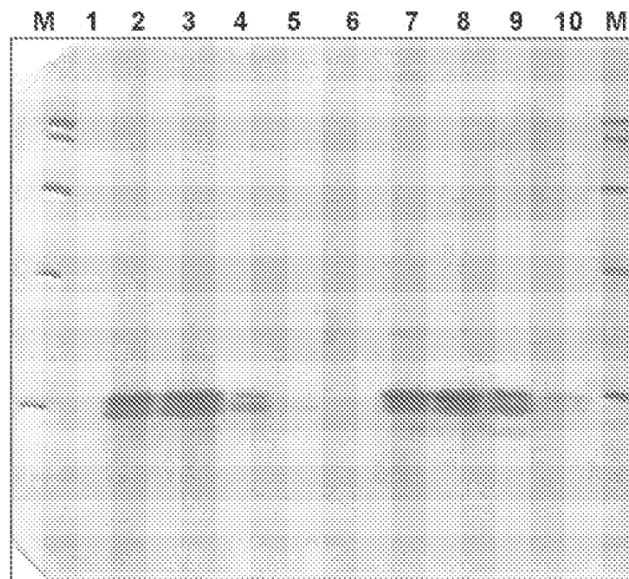
1. KPM318-9/pJexpress404:51149 -no inducido
2. KPM318-9/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
3. KPM318-9/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
4. KPM318-9/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. KPM318-9/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)
6. KPM318-10/pJexpress404:51149 -no inducido
7. KPM318-10/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
8. KPM318-10/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
9. KPM318-10/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
10. KPM318-10/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)

FIG. 55



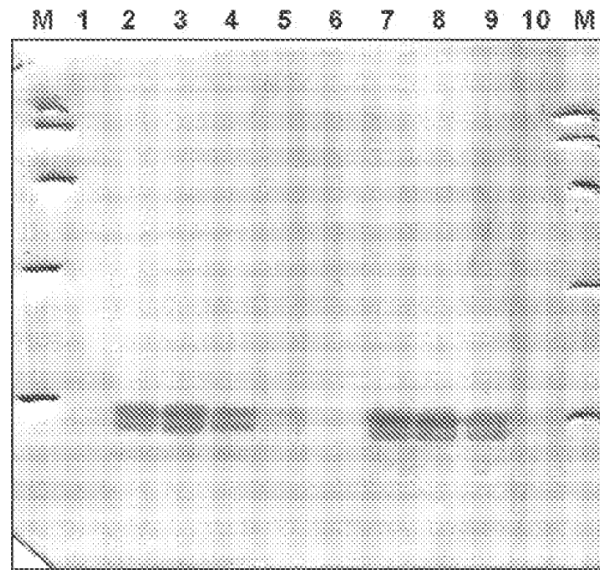
1. KPM318-19/pJexpress404:51149 -no inducido
2. KPM318-19/pJexpress404:51149 -inducido (3 h)
3. KPM318-19/pJexpress404:51149 - inducido (6 h)
4. KPM318-19/pJexpress404:51149 - inducido (12 h)
5. KPM318-19/pJexpress404:51149 - inducido (24 h)

FIG. 56



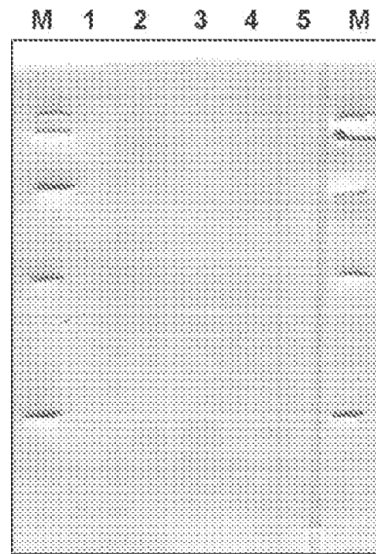
1. BW30270/pJexpress404:51150 -no inducido
2. BW30270/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 57



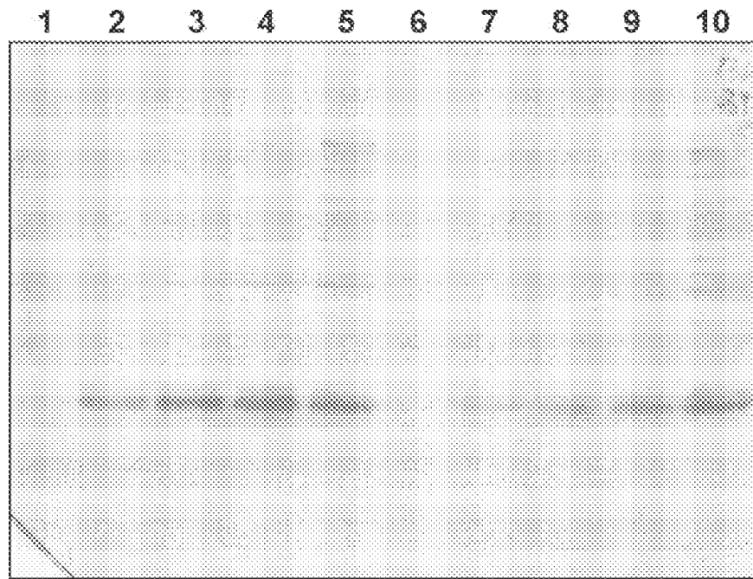
1. KPM318-9/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-9/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318-10/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318-10/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 58



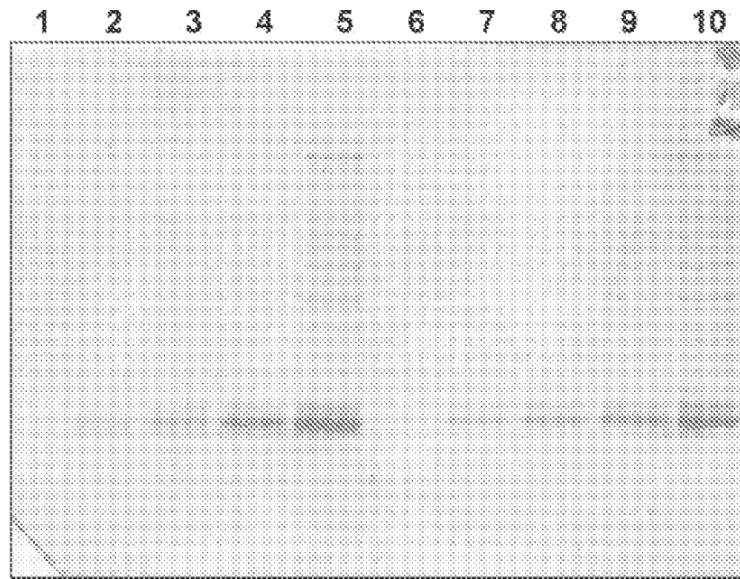
1. KPM318-19/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-19/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 59



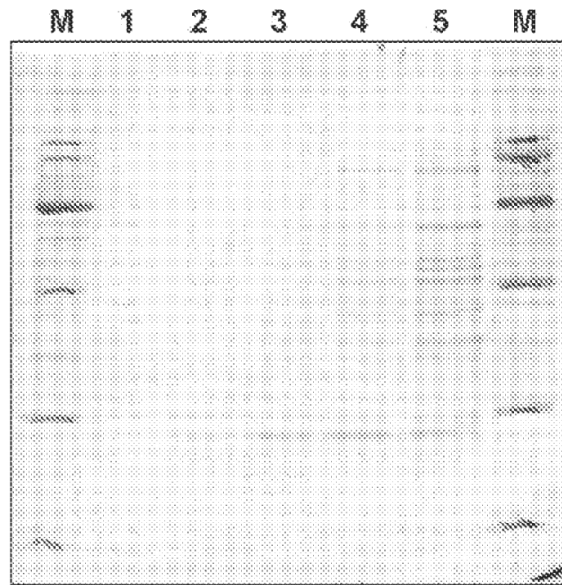
1. BW30270/pJexpress404:51150 -no inducido
2. BW30270/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. BW30270/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 60



1. KPM318-9/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-9/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-9/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)
6. KPM318-10/pJexpress404:51150 -no inducido
7. KPM318-10/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
8. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
9. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
10. KPM318-10/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 61



1. KPM318-19/pJexpress404:51150 -no inducido
2. KPM318-19/pJexpress404:51150 -inducido (3 h)
3. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (6 h)
4. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (12 h)
5. KPM318-19/pJexpress404:51150 - inducido (24 h)

FIG. 62

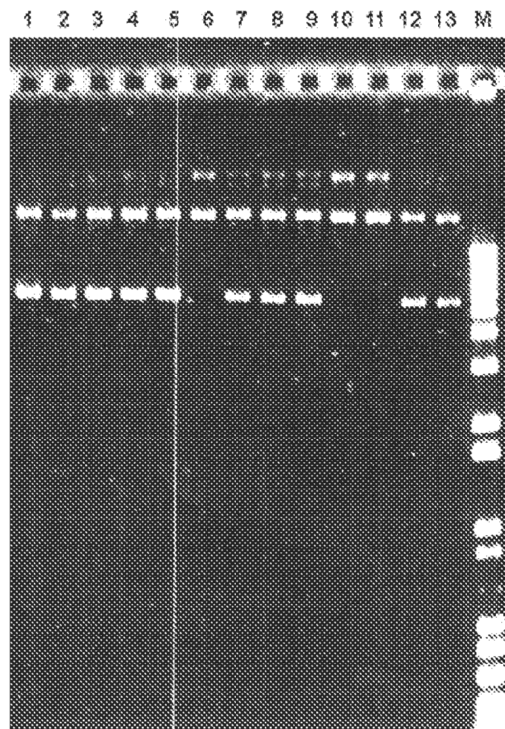


FIG. 63

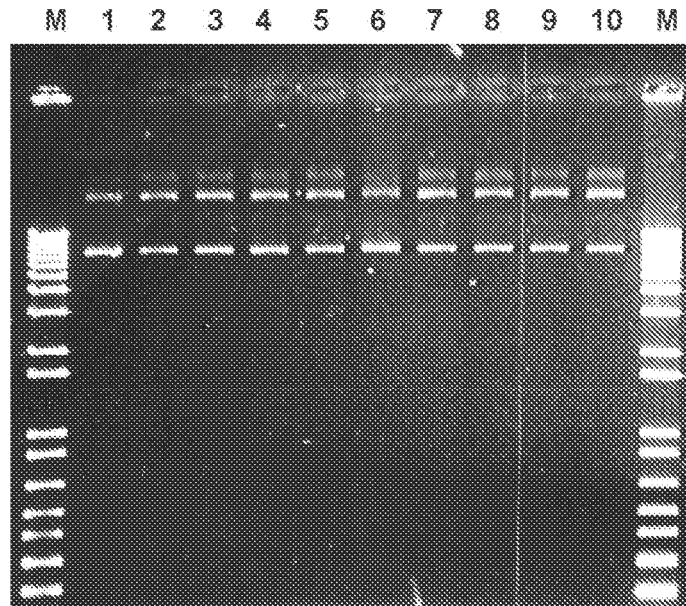


FIG. 64

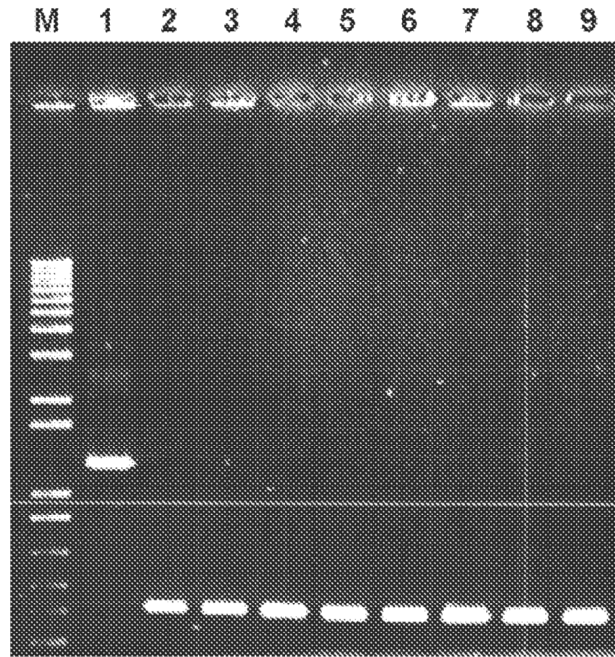


FIG. 65

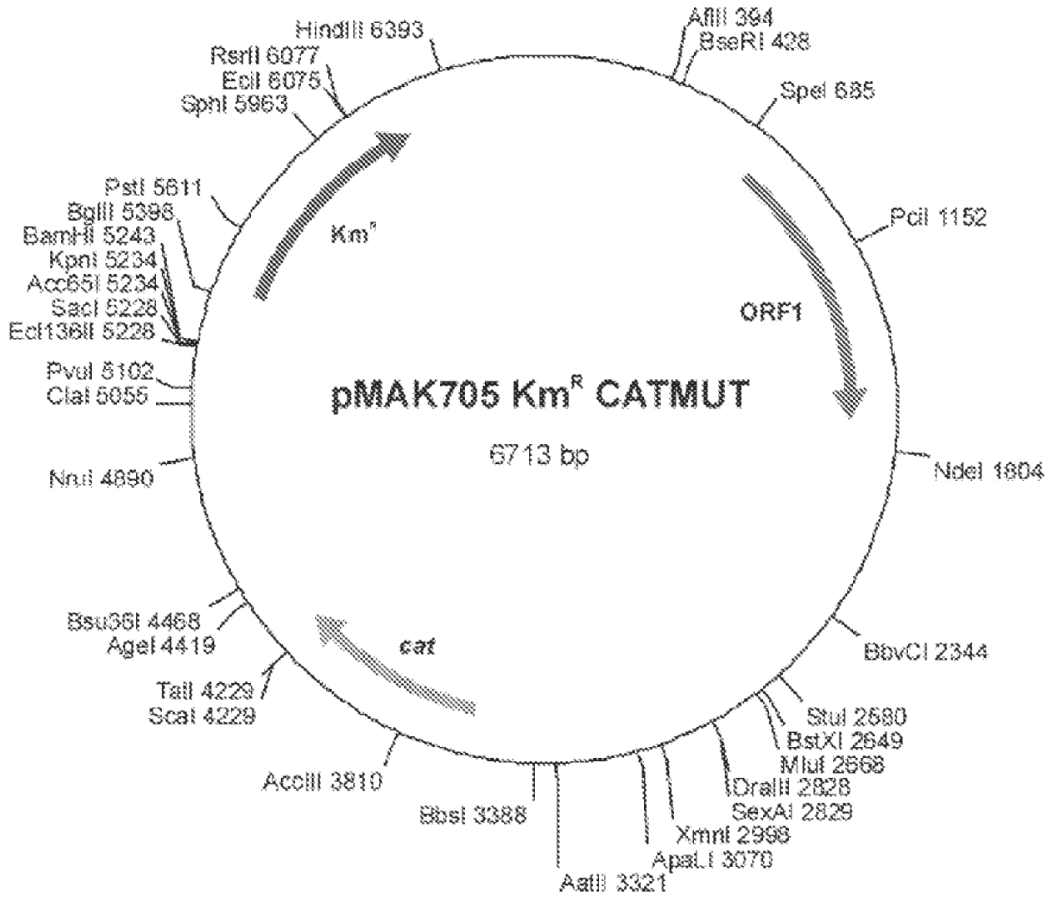
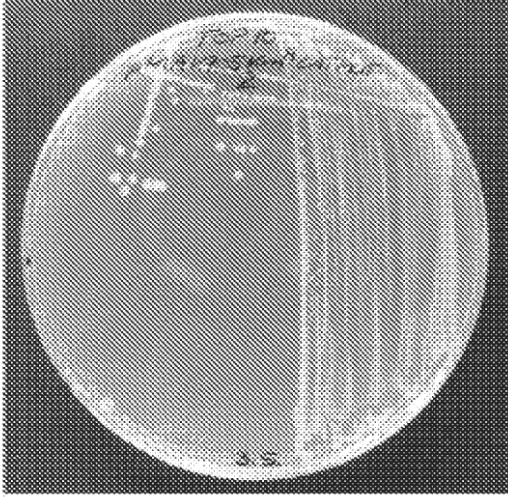
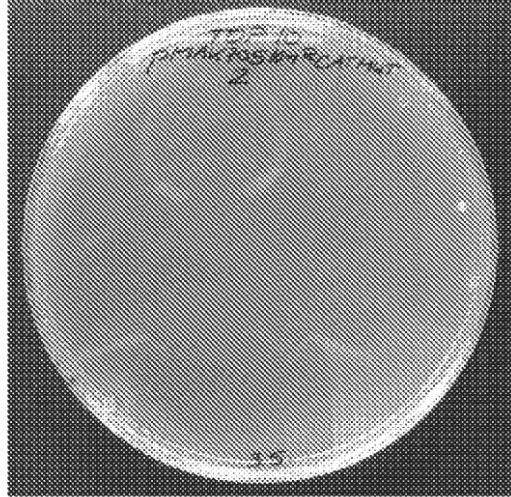


FIG. 66

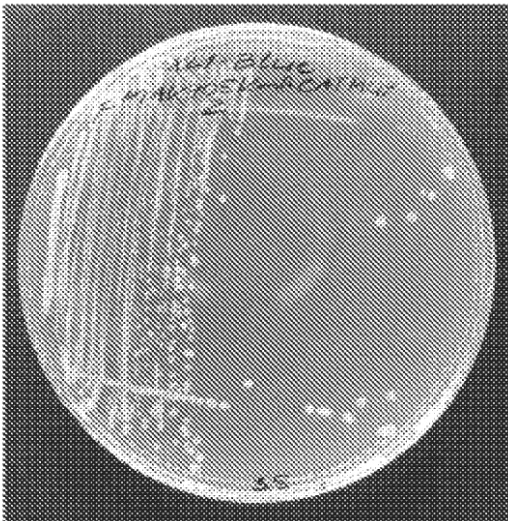
E. coli TOP10/pMAK705 Km^r CATMUT
LB + 30 µg/ml de kanamicina



E. coli TOP10/pMAK705 Km^r CATMUT
LB + 30 µg/ml de kanamicina + 15 µg/ml de cloranfenicol



E. coli XL1-Blue/pMAK705 Km^r CATMUT
LB + 30 µg/ml de kanamicina



E. coli XL1-Blue/pMAK705 Km^r CATMUT
LB + 30 µg/ml de kanamicina + 15 µg/ml de cloranfenicol

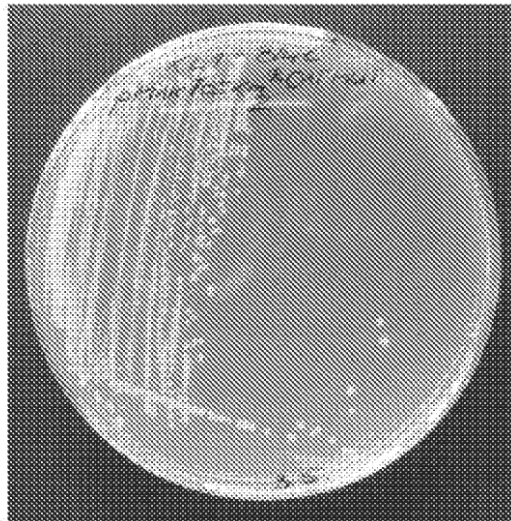


FIG. 67

Tabla 1. Ejemplos de cepas de *E. coli* construidas

Cepa	Descripción
KPM274	KPM22 $\Delta septA::Km^+$; $\Delta septA::Km^+$ cepa donante
KPM279	KPM22 $\Delta lpxL::Km^+$; $\Delta lpxL::Km^+$ cepa donante
KPM280	KPM22 $\Delta lpxM::Km^+$; $\Delta lpxM::Km^+$ cepa donante
KPM281	KPM22 $\Delta lpxL$
KPM282	KPM22 $\Delta lpxM$
KPM288	KPM22 L1 $\Delta lpxL::Km^+$
KPM290	KPM22 L11 $\Delta lpxL::Km^+$
KPM296	KPM22 L11 $\Delta lpxL$
KPM296-6	42°C-resistant derivative of KPM296
KPM300	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM::Km^+$
KPM303	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM$
BW30270 $\Delta lpxP::Km^+$	<i>E. coli</i> K-12 wild-type; $\Delta lpxP::Km^+$ cepa donante
BW30270 $\Delta pagP::Km^+$	<i>E. coli</i> K-12 wild-type; $\Delta pagP::Km^+$ cepa donante
KPM310	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP::Km^+$
KPM312	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP$
KPM314	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP::Km^+$
KPM316	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP$
KPM317	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP \Delta septA::Km^+$
KPM318	KPM22 L11 $\Delta lpxL \Delta lpxM \Delta pagP \Delta lpxP \Delta septA$

FIG. 68

Tabla 2. Lista de picos de la ESI FT ICR EM de las glicofomas detectadas en *E. coli* KPM318

Masa observada, [M] ⁺	Masa calculada, [M] ⁺	Composición química	Glicofoma	SEQID
3544,4065	3544,3941	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P 1* P-EN	II	SEQID20
3556,4395	3556,3975	1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 4* P 1* P-EN 1* Rha	IV	SEQID21
3566,3995		1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P 1* P-EN 1* Na	II	SEQID22
3578,3673		1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 4* P 1* P-EN 1* Rha 1* Na	IV	SEQID23
3624,4493	3624,3904	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* P-EN	I	SEQID24
	3624,4651	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P	II	SEQID25
3646,3395		1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* P-EN 1* Na	I	SEQID26
		1* GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* Na	II	SEQID27
3658,3357		1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 5* P 1* P-EN 1* Rha 1* Na	IV	SEQID28
3667,4097	3667,5072	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 3* P 1* P-EN	II	SEQID29
	3704,4313	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 3* P	II	SEQID30
3748,3038		1* GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 3* P 2* Na	II	SEQID31
	3747,4733	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P 1* P-EN	II	SEQID32
3783,4987		1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 4* P 1* P-EN 1* Rha 1* HexA 1* Ara4N		SEQID33
3797,3734		1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 3* P 1* P-EN 1* HexA 1* Ara4N		SEQID34
	3798,3436	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* P-EN 1* Ara4N		SEQID35

FIG. 69

Tabla 3. Densidad óptica y número de células de las suspensiones bacterianas inmediatamente antes de la inducción con IPTG

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) inmediatamente antes de la inducción	Número de células (ufc/ml)
BW30270/pJexpress404:51149	0,519	N.D.
KPM318/pJexpress404:51149	0,540	N.D.
KPM318-9/pJexpress404:51149	0,603	4,7 x 10 ⁷
KPM318-10/pJexpress404:51149	0,566	9,2 x 10 ⁷
KPM318-19/pJexpress404:51149	0,539	1,3 x 10 ⁸
BW30270/pJexpress404:51150	0,555	8,0 x 10 ⁵
KPM318/pJexpress404:51150	0,548	6,4 x 10 ⁷
KPM318-9/pJexpress404:51150	0,600	7,1 x 10 ⁷
KPM318-10/pJexpress404:51150	0,601	8,5 x 10 ⁷
KPM318-19/pJexpress404:51150	0,633	1,5 x 10 ⁸

FIG. 70

Tabla 4. Densidad óptica y número de células de las suspensiones bacterianas después de 6h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 6 h de inducción	Número de células (ufc/ml)
BW30270/pJexpress404:51149	2,66	N.D.
KPM318/pJexpress404:51149	2,89	N.D.
KPM318-9/pJexpress404:51149	2,76	7,4 x 10 ⁸
KPM318-10/pJexpress404:51149	2,73	7,8 x 10 ⁸
KPM318-19/pJexpress404:51149	1,73	7,8 x 10 ⁸
BW30270/pJexpress404:51150	1,73	1,0 x 10 ⁸
KPM318/pJexpress404:51150	2,04	3,9 x 10 ⁷
KPM318-9/pJexpress404:51150	1,93	4,4 x 10 ⁷
KPM318-10/pJexpress404:51150	1,86	7,2 x 10 ⁷
KPM318-19/pJexpress404:51150	1,49	1,0 x 10 ⁸

FIG. 71

Tabla 5. Densidad óptica y número de células de las suspensiones bacterianas después de 12 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 6 h de inducción	Número de células (ufc/ml)
BW30270/pJexpress404:51149	4,85	N.D.
KPM318/pJexpress404:51149	4,99	N.D.
KPM318-9/pJexpress404:51149	4,77	9,6 x 10 ⁸
KPM318-10/pJexpress404:51149	4,61	2,0 x 10 ⁹
KPM318-19/pJexpress404:51149	3,59	2,7 x 10 ⁸
BW30270/pJexpress404:51150	2,57	3,5 x 10 ⁷
KPM318/pJexpress404:51150	3,32	2,1 x 10 ⁷
KPM318-9/pJexpress404:51150	3,42	2,3 x 10 ⁸
KPM318-10/pJexpress404:51150	3,39	1,9 x 10 ⁷
KPM318-19/pJexpress404:51150	2,38	2,3 x 10 ⁸

FIG. 72

Tabla 6. Densidad óptica y número de células de las suspensiones bacterianas después de 12 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 12 h de inducción	Número de células (ufc/ml)
BW30270/pJexpress404:51149	8,73	N.D.
KPM318/pJexpress404:51149	8,74	N.D.
KPM318-9/pJexpress404:51149	9,08	$6,9 \times 10^8$
KPM318-10/pJexpress404:51149	9,10	$8,7 \times 10^8$
KPM318-19/pJexpress404:51149	6,15	$2,2 \times 10^7$
BW30270/pJexpress404:51150	6,80	$1,0 \times 10^7$
KPM318/pJexpress404:51150	7,59	$1,0 \times 10^5$
KPM318-9/pJexpress404:51150	7,44	$3,1 \times 10^4$
KPM318-10/pJexpress404:51150	7,75	$4,1 \times 10^4$
KPM318-19/pJexpress404:51150	4,63	$5,8 \times 10^7$

FIG. 73

Tabla 7. Densidad óptica y número de células de las suspensiones bacterianas después de 24 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 24 h de inducción	Número de células (ufc/ml)
BW30270/pJexpress404:51149	12,95	N.D.
KPM318/pJexpress404:51149	11,85	N.D.
KPM318-9/pJexpress404:51149	10,50	3,0 x 10 ⁸
KPM318-10/pJexpress404:51149	10,90	to the 10 ⁻⁶ dilut.: -
KPM318-19/pJexpress404:51149	7,75	1,0 x 10 ⁷
BW30270/pJexpress404:51150	10,00	5,0 x 10 ⁵
KPM318/pJexpress404:51150	13,75	4,2 x 10 ⁴
KPM318-9/pJexpress404:51150	12,30	2,4 x 10 ⁴
KPM318-10/pJexpress404:51150	14,20	2,0 x 10 ⁴
KPM318-19/pJexpress404:51150	7,50	2,0 x 10 ⁵

FIG. 74

Tabla 8. Determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células bacterianas inmediatamente antes de la inducción con IPTG

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 3 h de inducción	Medio de cultivo (µl)
BW30270/pJexpress404:51150	0,555	9,9
KPM318/pJexpress404:51150	0,548	10,0
KPM318-9/pJexpress404:51150	0,600	9,1
KPM318-10/pJexpress404:51150	0,601	9,1
KPM318-19/pJexpress404:51150	0,633	8,7

FIG. 75

Tabla 9. Determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de 3 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 3 h de inducción	Medio de cultivo (μl)
BW30270/pJexpress404:51150	1,73	8,6
KPM318/pJexpress404:51150	2,04	7,3
KPM318-9/pJexpress404:51150	1,93	7,7
KPM318-10/pJexpress404:51150	1,86	8,0
KPM318-19/pJexpress404:51150	1,49	10,0

FIG. 76

Tabla 10. Determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de 6 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 6 h de inducción	Medio de cultivo (μl)
BW30270/pJexpress404:51150	2,57	9,3
KPM318/pJexpress404:51150	3,32	7,2
KPM318-9/pJexpress404:51150	3,42	7,0
KPM318-10/pJexpress404:51150	3,39	7,0
KPM318-19/pJexpress404:51150	2,38	10,0

FIG. 77

Tabla 11. Determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de 12 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 12 h de inducción	Medio de cultivo (μl)
BW30270/pJexpress404:51150	6,80	6,3
KPM318/pJexpress404:51150	7,59	6,1
KPM318-9/pJexpress404:51150	7,44	6,2
KPM318-10/pJexpress404:51150	7,75	6,0
KPM318-19/pJexpress404:51150	4,63	10,0

FIG. 78

Tabla 12. Determinación de la cantidad de medio de cultivo obtenido a partir de las células después de 12 h de inducción

Cepa	Densidad óptica (DO ₆₀₀) después de 24 h de inducción	Medio de cultivo (μl)
BW30270/pJexpress404:51150	10,00	7,5
KPM318/pJexpress404:51150	13,75	5,4
KPM318-9/pJexpress404:51150	12,30	6,1
KPM318-10/pJexpress404:51150	14,20	5,3
KPM318-19/pJexpress404:51150	7,50	10,0

FIG. 79

Tabla 13. Número de células electrocompetentes

Cepa	Número de células (ufc/ml)
BW30270	$7,3 \times 10^8$
KPM318 (LB)	4×10^9
KPM318 (LB A5P/G6P)	$1,1 \times 10^9$

FIG. 80

Tabla 14. Eficacias de transformación para las cepas de *E. coli* BW30270, KPM318 (LB) y KPM318 (LB A5P/G6P)

Cepa	Eficacia de transformación (ufc/ μ g de ADN de pMAL-c2)
BW30270	$1,06 \times 10^7$
KPM318 (LB)	$3,64 \times 10^6$
KPM318 (LB A5P/G6P)	$2,51 \times 10^7$

FIG. 81

Tabla 15. Eficacias de transformación para las cepas de *E. coli* KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-23

Cepa	Eficacia de transformación (ufc/ μ g de ADN de pMAL-c2)	Eficacia de transformación (ufc/ μ g de ADN de pMAL-p2)
KPM318-9	$3,44 \times 10^7$	$7,12 \times 10^7$
KPM318-10	$2,33 \times 10^7$	$2,78 \times 10^7$
KPM318-19	$1,29 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$
KPM318-23	$1,08 \times 10^4$	$8,20 \times 10^3$

FIG. 82

Tabla 16. Rendimientos de los plásmidos pMAL-c2 y pMAL-p2 aislados a partir de *E. coli* BW30270, KPM318, KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19 y KPM318-22

Cepa	Rendimiento de pMAL-c2 (μg de ADN/5 ml de cultivo)	Rendimiento de pMAL-p2 (μg de ADN/5 ml de cultivo)
BW30270	1,36	3,04
KPM318	0,76	0,92
KPM318-9	1,6	1,44
KPM318-10	1,28	1,2
KPM318-19	0,88	0,92
KPM318-23	0,48	0,28

FIG. 83

Tabla 17. Cálculo de la cantidad de receptor (BW30270 y KPM318) que se debe añadir a 500 µl del donante

Cepa	DO600	Cantidad de receptor en µl que se debe añadir a 500 µl del donante
JC19022 F'121 Tn10 (25 µl)	0,019	-
JC19022 F'121 Tn10 (50 µl)	0,035	-
JC19022 F'121 Tn10 (100 µl)	0,07	-
JC19022 F'121 Tn10 (200 µl)	0,111	-
BW30270 (25 µl)	0,264	210 µl
BW30270 (50 µl)	0,432	-
BW30270 (100 µl)	0,697	-
BW30270 (200 µl)	1,008	-
KPM318 (25 µl)	0,055	-
KPM318 (50 µl)	0,109	509 µl
KPM318 (100 µl)	0,212	-
KPM318 (200 µl)	0,372	-

FIG. 84

Tabla 18. Cálculo de la cantidad de receptor (KPM318-9, KPM318-10, KPM318-19, y KPM318-23) que se debe añadir a 500 µl del donante (JC19022 F'121 Tn10)

Cepa	DO600	Cantidad de receptor en µl que se debe añadir a 500 µl del donante
JC19022 F'121 Tn10 (25 µl)	0,035	-
JC19022 F'121 Tn10 (50 µl)	0,048	-
JC19022 F'121 Tn10 (100 µl)	0,105	-
JC19022 F'121 Tn10 (200 µl)	0,163	-
KPM318-9 (25 µl)	0,117	449 µl
KPM318-9 (50 µl)	0,226	-
KPM318-9 (100 µl)	0,352	-
KPM318-9 (200 µl)	0,654	-
KPM318-10 (25 µl)	0,134	392 µl
KPM318-10 (50 µl)	0,244	-
KPM318-10 (100 µl)	0,446	-
KPM318-10 (200 µl)	0,710	-
KPM318-19 (25 µl)	0,029	-
KPM318-19 (50 µl)	0,068	-
KPM318-19 (100 µl)	0,131	401 µl
KPM318-19 (200 µl)	0,245	-
KPM318-23 (25 µl)	0,127	413 µl
KPM318-23 (50 µl)	0,241	-
KPM318-23 (100 µl)	0,430	-
KPM318-23 (200 µl)	0,737	-

FIG. 85

Tabla 19. Densidades ópticas (DO_{600}) de las cepas inmediatamente antes de la infección con M13KO7.

Cepa	Densidad óptica (DO_{600}) inmediatamente antes de la infección con M13KO7
BW30270 (control)	0,717
JC19022 (F'121 Tn10) - control	0,559
KPM318 (control)	0,344
BW30270 (F'121 Tn10)-1	0,581
BW30270 (F'121 Tn10)-2	0,574
BW30270 (F'121 Tn10)-3	0,600
BW30270 (F'121 Tn10)-4	0,623
KPM318 (F'121 Tn10)-4	0,410
KPM318 (F'121 Tn10)-6	0,178
KPM318 (F'121 Tn10)-7	0,174
KPM318 (F'121 Tn10)-8	0,157
KPM318-9 (F'121 Tn10)-1	0,128
KPM318-9 (F'121 Tn10)-2	0,246
KPM318-9 (F'121 Tn10)-3	0,098
KPM318-9 (F'121 Tn10)-4	0,261
KPM318-10 (F'121 Tn10)-1	0,111
KPM318-10 (F'121 Tn10)-3	0,289
KPM318-10 (F'121 Tn10)-4	0,166
KPM318-10 (F'121 Tn10)-5	0,406
KPM318-19 (F'121 Tn10)-6*	0,136
KPM318-23 (F'121 Tn10)-1	0,219
KPM318-23 (F'121 Tn10)-2	0,328
KPM318-23 (F'121 Tn10)-3	0,280
KPM318-23 (F'121 Tn10)-5	0,252

FIG. 86

Tabla 20. Número de colonias resistentes a la kanamicina después de la infección de los potenciales transconjugantes F'121 Tn10 con el fago colaborador M13KO7

Cepa	Número de colonias resistentes a la kanamicina (ufc/ml)
BW30270 (control)	0
JC19022 (F'121 Tn10) - control	$2,8 \times 10^8$
KPM318 (control)	$8,5 \times 10^2$
BW30270 (F'121 Tn10)-1	$2,7 \times 10^8$
BW30270 (F'121 Tn10)-2	$1,0 \times 10^8$
BW30270 (F'121 Tn10)-3	$2,1 \times 10^8$
BW30270 (F'121 Tn10)-4	$1,7 \times 10^8$
KPM318 (F'121 Tn10)-4	$4,2 \times 10^4$
KPM318 (F'121 Tn10)-6	$5,5 \times 10^3$
KPM318 (F'121 Tn10)-7	$4,4 \times 10^3$
KPM318 (F'121 Tn10)-8	$6,4 \times 10^4$
KPM318-9 (F'121 Tn10)-1	$1,4 \times 10^7$
KPM318-9 (F'121 Tn10)-2	$4,1 \times 10^5$
KPM318-9 (F'121 Tn10)-3	$3,8 \times 10^7$
KPM318-9 (F'121 Tn10)-4	$5,6 \times 10^7$
KPM318-10 (F'121 Tn10)-1	$3,6 \times 10^5$
KPM318-10 (F'121 Tn10)-3	$7,6 \times 10^4$
KPM318-10 (F'121 Tn10)-4	$6,5 \times 10^7$
KPM318-10 (F'121 Tn10)-5	$7,8 \times 10^5$
KPM318-19 (F'121 Tn10)-6	$6,4 \times 10^6$
KPM318-23 (F'121 Tn10)-1	$9,8 \times 10^5$
KPM318-23 (F'121 Tn10)-2	$3,7 \times 10^7$
KPM318-23 (F'121 Tn10)-3	$1,0 \times 10^7$
KPM318-23 (F'121 Tn10)-5	$2,3 \times 10^4$

FIG. 87

Tabla 21. Secuencias indicadas en esta solicitud

SEQ ID No.	Secuencia de aminoácidos
SEQID1	ATATGGATCCTTACATGGCGATAGCTAGACTGG
SEQID2	ATATAAGCTTGAAGAACTCCAGCATGAGATCC
SEQID3	GAGAAAAAATCACTGGATATACCTAGGTTGATATATCCCAATGGCA
SEQID4	CAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATC
SEQID5	ATGCATAACGACAAAGATCTCTACGTGGCAGACATTCCGCCGACTGTGGTCAACC ATTGCGCCTTTCAAAGCGGGTCTGATCGTGGCGGGCGTAGCGTTAATCCTCAACGCA GCCAGCGATACCTTCATGTTATCGCTCCTTAAGCCACTTCTTGATGATGGCTTTGGTA AAACAGATCGCTCCGTGCTGGTGTGGATGCCGCTGGTGGTATCGGGCTGATGATT TTACGTGGTATCACCAGCTATGTCTCCAGCTACTGTATCTCTGGGTATCAGGAAAG GTGGTAATGACCATGCGTCGCCGCTGTTGGTCCACATGATGGGAATGCCAGTTTCA TTCTTTGACAAACAGTCAACGGGTACGCTGTTGTACGATTACCTACGATCCGAAC AGGTTGCTTCTTCTTCCGGCGCACTGATTACTGTTGTGCGTGAAGGTGCGTCGA TCATCGGCCTGTTTCATCATGATGTTCTATTACAGTTGGCAACTGTCGATCATTTTGATT GTGCTGGCACCATTGTTTCGATTGCGATTGCGGTTGTATCGAAGCGTTTTGCGAAC ATCAGTAAAAACATGCAGAACACCATGGGGCAGGTGACCACCAGCGCAGAACAAT GCTGAAGGGCCACAAAGAAGTATTGATTTTCGGTGGTCAGGAAGTGAAACGAAACG CTTTGATAAAGTCAGCAACCGAATGCGTCTTCAGGGGATGAAAATGGTTTCAGCCTC TTCCATCTCTGATCCGATCATTACAGCTGATCGCCTCTTTGGCGCTGGCGTTTTGTTCTG TATGCGGGCAGCTTCCCAAGTGTATGGATAGCCTGACTGCCGGTACGATTACCGTT GTTTTCTTCAATGATTGCACTGATGCGTCCGCTGAAATCGCTGACCAACGTTAACG CCCAGTTCCAGCGCGGTATGGCGCTTGTACAGCGCTGTTACCATTCTGGACAGTG AGCAGGAGAAAGATGAAGGTAAGCGCGTATCGAGCGTGGGACTGGCGACGTGGA ATTCCGCAATGTCACCTTTACTTATCCGGGACGTGACGTACCTGCATTGCGTAACATC AACCTGAAAATCCGGCAGGGAAGACGGTTGCTCTGGTTGGACGCTCTGGTTCCGGG TAAATCAACCATCGCCAGCCTGATCACGCGTTTTTACGATATTGATGAAGGCGAAATC CTGATGGATGGTCACGATCTGCGCGAGTATACCCTGGCGTCGTTACGTAACCGAGTT GCTCTGGTGTGCGAGAATGCCATCTGTTTAAAGATACGGTTGCTAACAAACATTGCTT ACGCACGGACTGAACAGTACAGCCGTGAGCAAATGAAGAAGCGGCGCGTATGGCC TACGCCATGGACTTCATCAATAAGATGGATAACGGTCTCGATACAGTGATTGGTGA ACGGCGTGCTGCTCTCTGGCGGTACGCGTACGCGTATTGCTATCGCTCGAGCCTTG TTGCGTGATAGCCCGATTCTGATTCTGGACGAAGCTACCTCGGCTCTGGATACCGAA TCCGAACGTGCGATTACAGGCGGCACTGGATGAGTTGCAGAAAAACCGTACCTCTCTG GTGATTGCCACCGCTTGTCTACCATTGAAAAGGCAGACGAAATCGTGGTCTCGAG GATGGTGTATTGTGGAACGCGGTACGCATAACGATTTGCTTGAGCACCGCGGCGTT TACGCGCAACTTCACAAAATGCAGTTTGGCCAATGA
SEQID6	<u>g</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGA ATAGGAAGGTCGACGGATCCCCGGAAT <u>g</u>
SEQID7	<u>T</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT <u>g</u>
SEQID8	<u>C</u> TATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAATAGGAA CTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACAC <u>C</u>
SEQID9	<u>C</u> TATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAATAGGAA CTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACAC <u>C</u>
SEQID10	<u>A</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT <u>g</u>
SEQID11	<u>T</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG

ES 2 611 833 T3

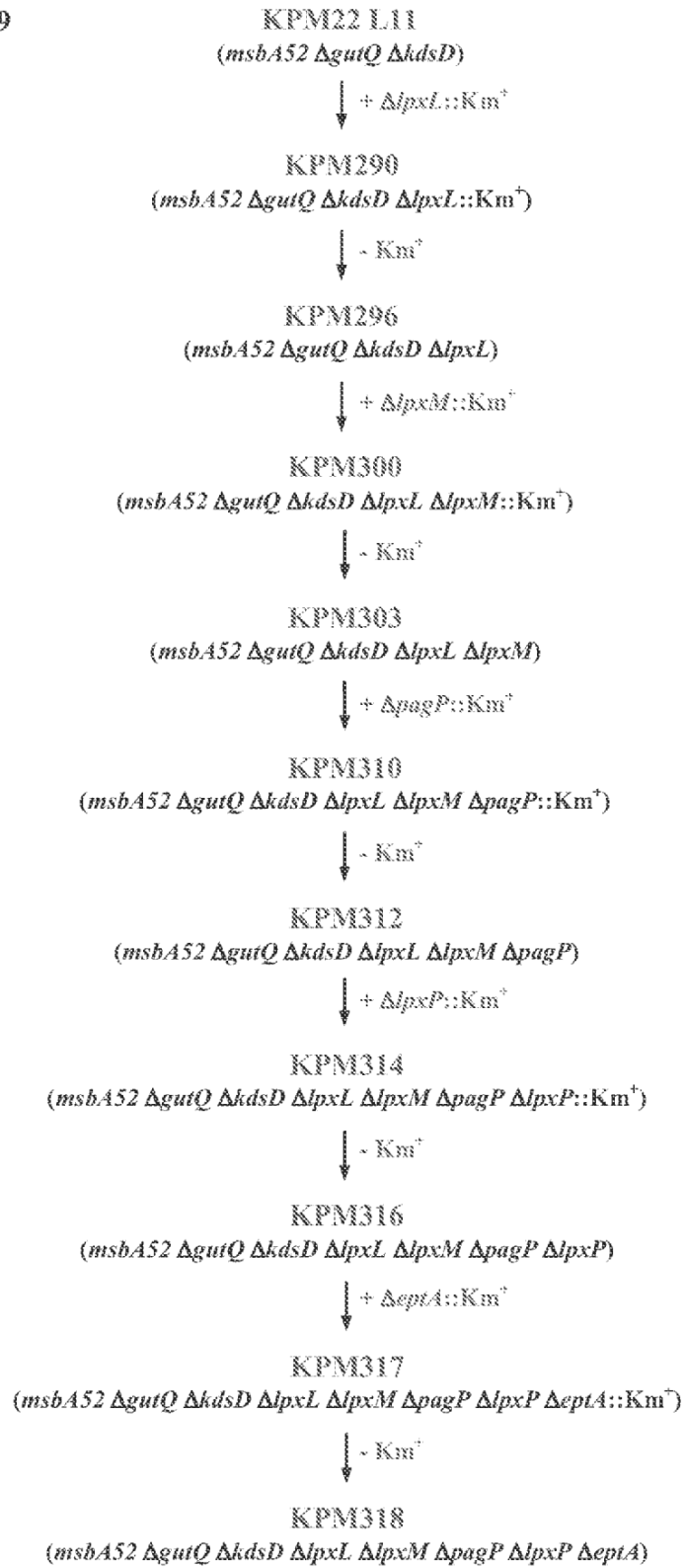
	AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC
SEQID12	ATGCATAACGACAAAGATCTCTACGTGGCAGACATTCCGCCGACTGTGGCAACC ATTGCGCCTTTCAAAGCGGGTCTGATCGTGGCGGGCGTAGCGTTAATCCTCAACGCA GCCAGCGATACCTTCATGTTATCGCTCCTTAAGCCACTTCTTGATGATGGCTTTGGTA AAACAGATCGCTCCGTGCTGGTGTGGATGCCGCTGGTGGTATCGGGCTGATGATT TTACGTGGTATCACCAGCTATGTCTCCAGCTACTGTATCTCCTGGGTATCAGGAAAG GTGGTAATGACCATGCGTCGCCGCTGTTTGGTACATGATGGGAATGCCAGTTTCA TTCTTTGACAAACAGTCAACGGGTACGCTGTTGTACAGTATTACCTACGATTCCGAAC AGGTTGCTTCTTCTTCCGGCGCACTGATTACTGTTGTGCGTGAAGGTGCGTCGA TCATCGGCCTGTTTCATCATGATGTTCTATTACAGTTGGCAACTGTCGATCATTTTGATT GTGCTGGCACCATTGTTTCGATTGCGATTGCGGTTGTATCGAAGCGTTTTCGCAAC ATCAGTAAAAACATGCAGAACCACATGGGGCAGGTGACCACCAGCGCAGAACAAT GCTGAAGGGCCACAAGAAGTATTGATTTTCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT CTTTGATAAAGTCAGCAACCGAATGCGTCTTCAGGGGATGAAAATGGTTTTAGCCTC TTCCATCTCTGATCCGATCATTACGCTGATCGCCTCTTTGGCGCTGGCGTTTTGTTCTG TATGCGGCGAGCTTCCCAAGTGTGATGGATAGCCTGACTGCCGGTACGATTACCGTT GTTTTCTTCAATGATTGCACTGATGCGTCCGCTGAAATCGCTGACCAACGTTAACG CCCAGTTCCAGCGCGGTATGGCGGCTTGTGACAGCGTGTACCATTCTGGACAGTG AGCAGGAGAAAGATGAAGGTAAGCGCGTATCGAGCGTGGCAGTGGCGACGTGGA ATTCCGCAATGTCACCTTACTTATCCGGGACGTGACGTACCTGCATTGCGTAACATC AACCTGAAAATCCGGCAGGGAAGACGGTTGCTCTGGTTGGACGCTCTGGTTCCGG TAAATCAACCATCGCCAGCCTGATCAGCGTTTTTACGATATTGATGAAGGCCAAATC CTGATGGATGGTCACGATCTGCGCGAGTATACCCTGGCGTACGTTACGTAACCAGTT GCTCTGGTGTGCGAGAATGCCATCTGTTTAAAGTACGTTGCTAACAACATTGCTT ACGCACGGACTGAACAGTACAGCCGTGAGCAAATTGAAGAAGCGGCGCGTATGGCC TACGCCATGGACTTCATCAATAAGATGGATAACGGTCTCGATACAGTATTGGTAAA ACGGCGTGCTGCTCTGCGGGTACGCGTACGCGTATTGCTATCGCTCGAGCCTTG TTGCGTATAGCCCGATTCTGATTCTGGACGAAGCTACCTCGGCTCTGGATACCGAA TCCGAACGTGCGATTACAGGCGGCACTGGATGAGTTGCAGAAAAACCGTACCTCTCTG GTGATTGCCACCGCTTGTCTACCATTGAAAAGGCAGACGAAATCGTGGTCTGCGAG GATGGTGTATTGTGGAACGCGGTACGCATAACGATTTGCTTGAGCACCGCGCGTT TACGCGCAACTTCACAAAATGCAGTTTGGCCAATGA
SEQID13	CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGA ATAGGAAGGTCGACGGATCCCCGGAATG
SEQID14	IGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC
SEQID15	CTATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAATATAGGAA CTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACC
SEQID16	GTATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAATATAGGAA CTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACC
SEQID17	AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC
SEQID18	IGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGC
SEQID19	ICATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAATATAGG AACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACC
SEQID20	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P 1* P-EtN
SEQID21	1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 4* P 1* P-EtN 1* Rha

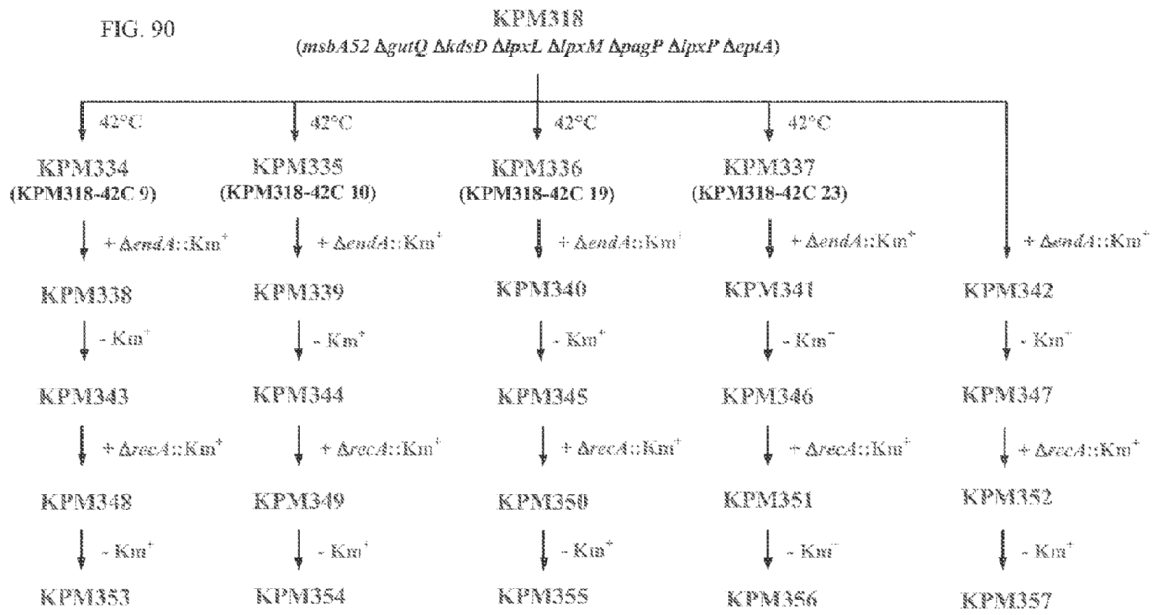
ES 2 611 833 T3

SEQID22	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P 1* P-EtN 1* Na
SEQID23	1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 4* P 1* P-EtN 1* Rha 1* Na
SEQID24	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* P-EtN
SEQID25	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P
SEQID26	1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* P-EtN 1* Na
SEQID27	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* Na
SEQID28	1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 5* P 1* P-EtN 1* Rha 1* Na
SEQID29	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 3* P 1* P-EtN
SEQID30	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 3* P
SEQID31	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 3* P 2* Na
SEQID32	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 4* P 1* P-EtN
SEQID33	1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 4* P 1* P-EtN 1* Rha 1* HexA 1* Ara4N
SEQID34	1* Gal 2* Glc 3* Hep 3* Kdo 5* P 1* P-EtN 1* HexA 1* Ara4N
SEQID35	1*GlcNAc 1* Gal 3* Glc 4* Hep 2* Kdo 5* P 1* P-EtN 1* Ara4N

FIG. 88

FIG. 89





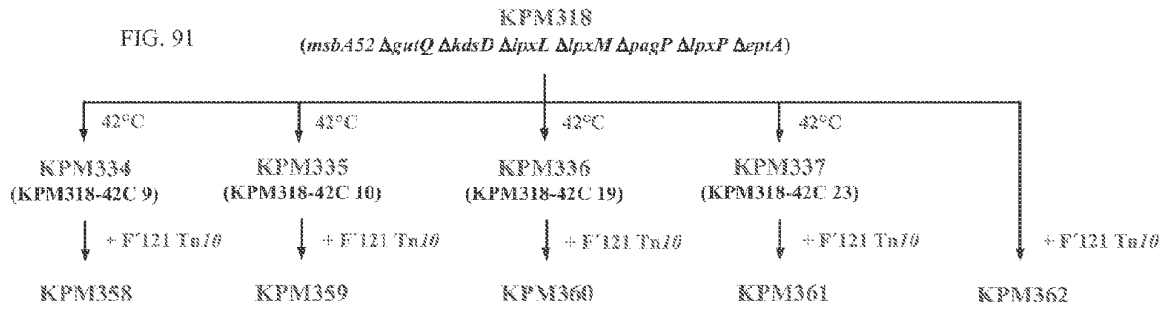


Fig. 92a

Células HEK-Blue™-hTLR4

Células 293 indicadoras de SEAP que expresan el gen humano TLR4
nº de catálogo hkb-htr4

Únicamente para su uso en investigación

Versión: # 11C68-MM

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Contenido y conservación

- 1 vial de las células HEK-Blue™-hTLR4 (5-7 x 10⁶ células) en medio de congelación
- **IMPORTANTE:** las células se envían congeladas. Si las células no están congeladas a su llegada, póngase en contacto inmediatamente con InvivoGen.
- 1 vial de 250X de HEK-Blue™ Selection. Una solución que contiene varios antibióticos seleccionados. HEK-Blue™ Selection puede conservarse a 4 °C durante 6 meses o a -20 °C durante 12 meses.
- 1 ml de Normocin™ (50 mg/ml). Normocin™ es una formulación de tres antibióticos activa contra los micoplasmas, las bacterias y los hongos. Conservar a -20 °C. El producto es estable durante 18 meses cuando se conserva a -20 °C.
- 1 bolsita de QUANTI-Blue™, medio de detección de fosfatasa alcalina. Almacenar la bolsita a la temperatura ambiente. Almacenar el QUANTI-Blue™ reconstituido a 4 °C durante 2 semanas.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Las células HEK-Blue™-hTLR4 están diseñadas para el estudio de la estimulación del TLR4 humano (hTLR4) mediante la monitorización de la activación del NF-κB. El TLR4, el primer TLR humano identificado, es el receptor del lipopolisacárido bacteriano (LPS)¹ y del lípido A, su fracción tóxica. Sin embargo, el TLR4 solo no es suficiente para conferir sensibilidad al LPS, el TLR4 requiere la MD-2, una molécula secretada, para interactuar funcionalmente con el LPS2. Adicionalmente se ha demostrado que una tercera proteína, denominada CD14, participa en la señalización del LPS, dando lugar a la activación del NF-κB y a la producción de citocinas proinflamatorias.

Las células HEK-Blue™-hTLR4 se obtuvieron mediante una co-transfección de los genes co-receptores hTLR4, MD-2/CD14 y el gen indicador de una fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) en células HEK293. El gen indicador de la SEAP se coloca bajo el control de un promotor mínimo de IL-12 p40 fusionado con cinco sitios de unión de NF-κB y AP-1. La estimulación con un ligando del TLR4 activa el NF-κB y la AP-1, lo que induce la producción de la SEAP. Los niveles de la SEAP puede ser determinados fácilmente con HEK-Blue™ Detection o con QUANTI-Blue™, un medio de detección que se vuelve de color púrpura/azul en presencia de fosfatasa alcalina. El HEK-Blue™ Detection está diseñado para la detección de alto rendimiento de la SEAP, mientras que QUANTI-Blue™ es más sensible y está diseñado para la detección y la cuantificación de la SEAP.

Las células HEK293 expresan unos niveles endógenos de TLR3, TLR5 y NOD1.

Nota: la línea celular parental de las células HEK-Blue™-hTLR4 es la de las células HEK-Blue™-Null2 (células indicadoras de SEAP que no expresan el hTLR4).

1. Chow J. et al., 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274: 10689-92. 2. Shimazti R et al., 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 189 (11): 1777-82. 3. Shuto T. et al., 2005. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4

Manipulación de las células tras su llegada

Recomendamos encarecidamente que propague las células mediante el uso del procedimiento proporcionado tan pronto como sea posible. Esto asegurará la mejor viabilidad celular y rendimiento del ensayo. Las células congeladas pueden colocarse en nitrógeno líquido hasta que estén preparados para descongelarlas y propagarlas, sin embargo, esto puede reducir la viabilidad de las células.

Garantía del producto

InvivoGen garantiza que las células deben ser viables después de su envío desde InvivoGen durante un periodo de treinta días, siempre que hayan sido adecuadamente conservadas y manipuladas durante este periodo.

Estabilidad de la línea celular

Las células experimentarán unos cambios genotípicos que darán como resultado una reducción en la sensibilidad con el tiempo en unas condiciones de cultivo celular normales. La inestabilidad genética es un fenómeno biológico que se produce en todas las células transfectadas de forma estable. Por lo tanto, es crítico que se prepare un número adecuado de reservas congeladas en fases tempranas.

Las células HEK-Blue™-hTLR4 no deben pasarse más de 20 veces para que permanezcan completamente eficaces. Las células HEK-Blue™-hTLR4 deben ser mantenidas en un Medio de Cultivo según se describe a continuación en presencia de Normocin™ (100 µg/ml) y de 1X de HEK-Blue™ Selection. Se requiere una presión antibiótica con HEK-Blue™ Selection para mantener los plásmidos que codifican el hTLR4, el MD-2/CD14 y la SEAP.

RESTRICCIONES DE USO

Estas células se distribuyen únicamente con fines de investigación

Este producto está cubierto por una Licencia de Uso Limitado. Al usar este producto, el comprador acepta los términos y las condiciones de todas las Licencias de Uso Limitado de Etiqueta aplicables. Para un uso fuera de la investigación, tal como un cribado, un control de calidad o un desarrollo clínico, póngase en contacto con info@invivogen.com

Medio de cultivo celular requerido

* medio de cultivo: DMEM, 4,5 g/l de glucosa, 10 % (v/v) de suero bovino fetal, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 100 µg/ml de Normocin™, L-glutamina 2 mM

* medio de congelación: DMEM, 4,5 g/l de glucosa, 20 % (v/v) de suero bovino fetal, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 100 µg/ml de Normocin™, L-glutamina 2 mM, 10 % (v/v) de DMSO

* medio de ensayo (para su uso con QUANTI-Blue™): DMEM, 4,5 g/l de glucosa, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 100 µg/ml de Normocin™, L-glutamina 2 mM, 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado con calor (30 min a 56 °C)

SOPORTE TÉCNICO

Gratuito (Estados Unidos): 888-457-5873
Fuera de los Estados Unidos: (+1) 858-457-5873
Europa: +33 562-71-69-39
Correo electrónico: info@invivogen.com
Sitio web: www.invivogen.com



3950 Sorrento Valley Blvd. Suite 11
San Diego, CA 92121 - USA

FIG. 92b

Procedimiento de cultivo inicial

La primera propagación de las células debe ser para la generación de reservas para un uso futuro. Esto asegura la estabilidad y el rendimiento de las células para experimentos posteriores.

- 1- descongelar el vial mediante una agitación suave en un baño de agua a 37 °C. Para reducir la posibilidad de contaminación, mantener el cierre anular y la tapa fuera del agua. La descongelación debe ser rápida.
- 2- retirar el vial del baño de agua tan pronto como el contenido se haya descongelado, y descontaminarlo sumergiéndolo en, o pulverizándolo con, etanol al 70 % (v/v)

Nota: todas las etapas de este punto deberían llevarse a cabo en unas condiciones asépticas estrictas.

- 3- transferir las células a un vial mayor que contenga 15 ml de Medio de Crecimiento precalentado. **No añadir antibióticos selectivos hasta que las células se hayan pasado dos veces.**
- 4- centrifugar el vial a 1.000-1.200 RPM (RCF 200-300 g) durante 5 minutos.
- 5- retirar el sobrenadante que contiene el agente crioprotector y resuspender las células en 1 ml de Medio de Crecimiento sin antibióticos selectivos.
- 6- transferir el contenido del vial a un matraz de cultivo tisular de 25 cm² que contenga 5 ml de Medio de Crecimiento sin antibióticos selectivos.
- 7- colocar el matraz que contiene las células HEK-Blue™-hTLR4 a 37 °C en un 5% de CO₂.

Preparación de la reserva congelada

- 1- resuspender las células a una densidad de 5-7 x 10⁶ células/ml en Medio de Congelación recién preparado con Medio de Crecimiento frío.

Nota: un matraz de cultivo T-75 produce típicamente células suficientes para la preparación de 3-4 viales congelados.

- 2- colocar una alícuota de 1 ml de las células en viales criogénicos.
- 3- colocar los viales en un recipiente de congelación (Nalgene) y almacenar a -80 °C durante la noche.
- 4- transferir los viales a nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo.

Nota: si se conservan apropiadamente, las células deberían permanecer estables durante años.

Mantenimiento de las células

- 1- mantener y subcultivar las células en Medio de Crecimiento suplementado con 1X de HEK-Blue™ Selection.
- 2- renovar el Medio de Crecimiento 2 veces por semana.
- 3- las células deberían pasarse cuando se alcance una confluencia del 70-80 %, desprender las células en presencia de PBS golpeando suavemente el matraz mediante el uso de un raspador celular. No permitir que las células crezcan hasta una confluencia del 100 %.

Nota: la respuesta de las células HEK-Blue™-hTLR4 puede ser alterada por la acción de la tripsina. No utilizar tripsina para desprender las células HEK-Blue™-hTLR4.

Determinación de la estimulación del TLR4 mediante el uso de HEK-Blue™ Detection

Para la detección en tiempo real de la SEAP o para aplicaciones de alto rendimiento recomendamos el uso de medio HEK-Blue™ Detection (no proporcionado).

- 1- añadir 20 µl de cada muestra por pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano.
- 2- añadir 20 µl de un control positivo (tal como LPS-EK Ultrapure, 100 ng/ml) a un pocillo.
- 3- añadir 20 µl de un control negativo (tal como agua estéril exenta de endotoxina) a un pocillo.
- 4- retirar las células HEK-Blue™-hTLR4 de la estufa de incubación y desechar el Medio de Crecimiento. Aclarar las células con PBS, añadir PBS (5-10 ml para un matraz T-75) y colocar las células a 37 °C durante 1-2 min, desprender las células golpeando suavemente el matraz.

Nota: no añadir medio HEK-Blue™ Detection en este punto del protocolo, ya que puede dar lugar a elevadas lecturas de fondo o a falsos positivos.

- 5- contar las células.
- 6- preparar una suspensión de células de ~ 140.000 células por ml en medio HEK-Blue™ Detection y añadir inmediatamente 180 µl de la suspensión de células (~ 25.000 células) por pocillo.
- 7- incubar la placa 37 °C en un 5% de CO₂ durante 6-16 h. La SEAP puede determinarse a simple vista o mediante el uso de un espectrofotómetro a 620-655 nm.

Determinación de la estimulación del TLR4 mediante el uso de QUANTI-Blue™
QUANTI-Blue™ es 10 veces más sensible que el medio HEK-Blue™ Detection y puede usarse para cuantificar la actividad de la SEAP.

Día Uno:

- 1- añadir 20 µl de cada muestra por pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano.
- 2- añadir 20 µl de un control positivo (tal como LPS-EK Ultrapure, 100 ng/ml) a un pocillo.
- 3- añadir 20 µl de un control negativo (tal como agua estéril exenta de endotoxina) a un pocillo.
- 4- retirar las células HEK-Blue™-hTLR4 de la estufa de incubación y desechar el Medio de Crecimiento. Aclarar las células con PBS, añadir PBS (5-10 ml para un matraz T-75) y colocar las células a 37 °C durante 1-2 min, desprender las células golpeando suavemente el matraz.
- 5- contar las células.
- 6- preparar una suspensión de células HEK-Blue™-hTLR4 a ~ 140.000 células por ml en Medio de Ensayo que contiene un 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado con calor (FBS).

Nota: algunos sueros bovinos fetales (FBS) pueden contener fosfatasa alcalina que pueden interferir en la cuantificación de la SEAP. Para asegurar que estas enzimas termosensibles están inactivas, usar FBS inactivado con calor (30 min a 56 °C). El FBS inactivado con calor también está disponible comercialmente.

- 1- añadir 180 µl de la suspensión de células (~ 25.000 células) por pocillo.
- 8- incubar la placa a 37 °C en una estufa de incubación de CO₂ durante 20-24 h.

Día Dos:

- 1- preparar el QUANTI-Blue™ siguiendo las instrucciones de la bolsita.
- 2- añadir 180 µl de QUANTI-Blue™ resuspendido por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano.
- 3- añadir 20 µl del sobrenadante de las células HEK-Blue™-hTLR4 inducidas.
- 4- incubar la placa a 37 °C en una estufa de incubación durante 1-3 h.
- 5- determinar los niveles de la SEAP mediante el uso de un espectrofotómetro a 620-655 nm.

Especificidad de las células HEK-Blue™-hTLR4

Dado que las células HEK293 expresan unos niveles endógenos de TLR3, de TLR5 y de NOD1, las células HEK-Blue™-hTLR4 responderán a sus ligandos análogos, tales como poli(I:C), flagelina e iE-DAP, respectivamente. Con objeto de identificar las respuestas específicas al TLR4, recomendamos el uso de células HEK-Blue™-Null2 como línea celular de control. Adicionalmente puede usarse un anticuerpo neutralizante anti-hTLR4 para asegurar la especificidad de la respuesta al TLR4

Nota: las células HEK-Blue™-hTLR4 pueden ser estimuladas de una forma independiente del TLR4, ya que el NFκB/AP-1 puede ser activado por una amplia variedad de estímulos (por ejemplo, el TNF-α y el PMA).

PRODUCTOS RELACIONADOS

Producto	Código de catálogo
células HEK-Blue™-Null2	Hkb-null2
HEK-Blue™ Selection 250X	Hb-sel
QUANTI-Blue™ (5 bolsitas)	Rep-qb1
HEK-Blue™ Detection (2 bolsitas)	Hb-det1
Normocin™	Ant-nr1
Anti-hTLR4-IgA (monoclonal)	Maba2-t1r4
PAb-hTLR4 (policlonal)	Pab-hstr4
LPS-EB ultrapure (<i>E. coli</i> 0111:B4)	Tirl-pelps
LPS-EK ultrapure (<i>E. coli</i> K12)	Tirl-pek1ps
MPLAs (monofosforil lípido A sintético)	Tirl-mp1s

SOPORTE TÉCNICO

Gratuito (Estados Unidos): 888-457-5873
Fuera de los Estados Unidos: (+1) 858-457-5873
Europa: +33 562-71-69-39
Correo electrónico: info@invivogen.com
Sitio web: www.invivogen.com



3950 Sorrento Valley Blvd. Suite 11
San Diego, CA 92121 - USA