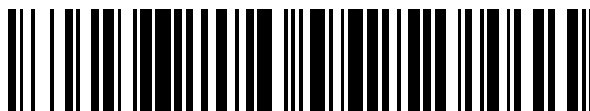


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 844**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2012 PCT/US2012/000446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2012 E 12837738 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2764090**

54 Título: **Generación de cepa mutante productora solo de PSA**

30 Prioridad:

03.10.2011 US 201161542549 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2018

73 Titular/es:

**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)**

**1200 E. California Blvd., MC 210-85
Pasadena, CA 91125, US y**

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

MAZMANIAN, SARKIS K.;

KASPER, DENNIS L. y

LEE, SUNG-EUN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 844 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).

DESCRIPCION

Generación de cepa mutante productora solo de PSA

Campo de la invención

La invención se refiere a cepas mutantes de *B. fragilis* que producen solo PSA.

5 Antecedentes

10 *Bacteroides fragilis* produce al menos 8 polisacáridos capsulares diferentes. Para facilitar la purificación de PSA de los otros 7 polisacáridos capsulares, otros han diseñado una cepa productora de PSA empleando la mutación de un gen regulador que controla la transcripción de genes de producción de polisacáridos, pero que deja intactos a los genes realmente requeridos para toda la síntesis de polisacáridos capsulares. Sin embargo, con posterioridad a la creación de dicha cepa, se demostró que mutaciones secundarias podrían producir la reversión a la producción de polisacáridos (1).

Sumario

15 Hemos creado una nueva cepa bacteriana para la producción de Polisacárido A (PSA). A fin de facilitar la purificación de PSA de entre los otros 7 polisacáridos capsulares, diseñamos una estrategia para mutar los genes requeridos en la producción de todos los polisacáridos conocidos excepto el PSA. Esto se consiguió mediante recombinación de ADN (tal como se describe más adelante) para eliminar los genes que codifican para proteínas que sintetizan todos los polisacáridos que no son PSA, asegurando que mutaciones adicionales no restaurarían la producción de otros polisacáridos. La estrategia previa para diseñar una cepa productora de PSA empleaba la mutación de un gen regulador que controla la transcripción de genes de producción de polisacáridos, pero que deja intactos los genes realmente requeridos para toda la síntesis de polisacáridos capsulares.

20 Sin embargo, con posterioridad a la creación de dicha cepa previa, se demostró que mutaciones secundarias podrían producir la reversión a la producción de polisacáridos (1). La estrategia actual de eliminar genes que son requeridos para la producción de polisacáridos solventaría este potencial problema, y aseguraría una cepa que es estable en este genotipo y fenotipo.

25 En una realización, se proporciona una célula bacteriana de *B. fragilis* productora de polisacárido A (PSA) capsular nativo, en donde la célula es incapaz de producir los polisacáridos capsulares PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH.

30 En un aspecto de cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, los genes biosintéticos de la célula para polisacáridos los capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.

En otro aspecto adicional de cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, no se ha modificado un promotor que controla la expresión de PSA.

35 En un aspecto de cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, el promotor de PSA presenta una o más regiones flanqueantes de repetición que rodean al promotor, y en donde dichas regiones flanqueantes no han sido modificadas.

En otro aspecto adicional de cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, la célula es administrada, como parte de un producto farmacéutico, a individuos que padecen una enfermedad o afección inflamatoria.

40 En un aspecto de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria se proporciona una composición que comprende un extracto bacteriano o fracción celular obtenidos de una célula bacteriana de *B. fragilis* que produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo, en donde la célula es incapaz de producir los polisacáridos capsulares PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH, en donde los genes biosintéticos de la célula para los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.

45 En otro aspecto adicional de cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un individuo con inflamación que comprende una cantidad efectiva de un producto farmacéutico que comprende una célula bacteriana aislada de *B. fragilis*, o un extracto o fracción celular de dicha célula, en donde la célula produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo; y en donde los genes biosintéticos de la célula para los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.

50 En otro aspecto adicional de cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, la fracción celular es una fracción vesicular de la membrana exterior.

En la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo con inflamación, que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva de un producto farmacéutico que comprende una célula bacteriana aislada de *B. fragilis*, o de un extracto o fracción celular de dicha célula, en donde la célula produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo; y en donde los genes biosintéticos de la célula para los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.

Breve descripción de las figuras

Figura 1; Muestra un gel que muestra el genotipo del mutante que expresa solo PSA (*B. fragilis*APSB-PSH) en comparación con la cepa de *B. fragilis* 9343 natural ("wild-type" o WT) mediante análisis PCR específico de CPS. La cepa natural (WT) se distingue del mutante de eliminación (A) en una localización dada usando los cebadores de la Tabla 2.

Figura 2: Muestra un análisis de inmunotinción que confirma la expresión de PSA por parte del mutante *B. fragilis*/sAPSB-PSH. Se usó antisuero anti-PSA de conejo con una dilución 1:1000 para sondear para PSA y se usó anticuerpo secundario anti-conejo de cabra a una dilución 1:5000. APSA se refiere a una cepa que ha sido eliminada solo de los genes requeridos para la biosíntesis de PSA. La falta de reactividad de esta muestra demuestra que el anticuerpo usado es específico para PSA y no para cualquier otra molécula producida por las bacterias.

Figura 3: Muestra un análisis de inmunotinción que confirma la expresión de PSA por parte los mutantes de *B. fragilis* CPS APSA, APSB, APSB-PSC, APSB-PSF y APSB-PSH. Se usó antisuero anti-PSA de conejo a una dilución de 1:3000 para sondear para PSA y se usó anticuerpo secundario anti-conejo de cabra a una dilución de 1:5000.

Figura 4: Muestra un análisis de inmunotinción con antisuero de PSA de célula entera (WC, del inglés "whole cell") y de extractos de vesículas de membrana exterior (OMV, del inglés "outer membrane vesicles") procedentes de la cepa natural *B. fragilis*, del mutante de eliminación de PSA, del mutante de eliminación de *Mpi* que expresa solo PSA, y del mutante de eliminación de PSB a PSH. Muestra que las tres cepas de *B. fragilis* productoras de PSA expresan PSA tanto en la superficie celular como en las OMV. El mutante de eliminación de PSA confirma la especificidad del antisuero de PSA.

Figura 5: muestra un espectro de RMN correspondiente a PSA (PSA12) procedente de una bacteria mutante que expresa solo PSA (8. /rag///sAPSB-PSH).

Figura 6: muestra la inducción de IL-10 a partir de cultivo in vitro de células dendríticas y células T tratadas con PSA purificado (PSA12 y PSA13) procedente de una bacteria mutante que expresa solo PSA (8. frag/7/sAPSB-PSH).

Descripción detallada

Un "promotor que controla la expresión de un polisacárido capsular" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un elemento genético no transcrito asociado a, y que controla, la transcripción de un gen de biosíntesis de polisacárido capsular. El gen de biosíntesis de polisacárido capsular puede aparecer como parte de una localización de biosíntesis de polisacárido capsular policistónica. Un promotor dado puede regular la transcripción de uno o más genes de biosíntesis de polisacárido capsular dentro de la localización de genes de biosíntesis de polisacárido capsular asociada. El promotor puede incluir regiones de repetición invertidas separadas por una secuencia interviniente. En una realización, el promotor está contenido entre regiones de repetición invertidas de la secuencia interviniente y es sometido a inversión, de tal modo que en una orientación el promotor es activo transcripcionalmente ("on") con respecto al gen de biosíntesis de polisacárido capsular, mientras que en la orientación opuesta o girada el promotor es inactivo transcripcionalmente ("off") con respecto al gen de biosíntesis de polisacárido capsular.

El término "nativo" cuando se usa en relación a materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedantes, células/cepas bacterianas y similares, se refiere a materiales tal cual se encuentran en la naturaleza y no manipulados por el hombre.

El término "aislado" cuando se usa en relación a materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células bacterianas, células hospedantes, células/cepas bacterianas y similares, se refiere a los materiales mencionados anteriormente aislados o purificados, donde dichos materiales no existen de forma natural y/o donde tienen características marcadamente diferentes o distintivas en comparación con los encontrados en el material nativo.

La expresión "polisacárido A" (o PSA, o ligando PSA) tal como se usa en la presente memoria indica una molécula producida por la localización de PSA de *Bacteroides fragilis* y los derivados de la misma, que incluyen, aunque sin limitación, polímeros de la unidad de repetición ($\rightarrow 3$) a-d-AAT Galp(1-4)-[p-d-Galf(1-3)] a-d-GalpNAc(1-3)-[4,6-piruvato] -p-d-Galp(1-3), donde AATGal es acetamido-amino-2,4,6-tridesoxigalactosa, y el residuo de galactopiranosilo está modificado con un sustituyente piruvato que extiende 0-4 y 0-6. El término "derivado" tal como se usa en la presente memoria en referencia a un primer polisacárido (p.ej., PSA), indica un segundo polisacárido que está relacionado estructuralmente con el primer polisacárido y que es derivable del primer

5 polisacárido mediante una modificación que introduce una característica que no está presente en el primer polisacárido a la vez que retiene las propiedades funcionales del primer polisacárido. Por consiguiente, un polisacárido derivado de PSA, habitualmente difiere del polisacárido original en la modificación de las unidades de repetición o del componente sacárido de una o más unidades de repetición que podrían estar o no asociadas a una función adicional no presente en el polisacárido original. Un polisacárido derivado de PSA retiene, sin embargo, una o más de las actividades funcionales descritas en la presente memoria en relación a PSA asociadas a la actividad anti-inflamatoria del PSA.

10 En una realización, PSA de bajo peso molecular (L-PSA), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de PSA con un peso molecular de entre 70 kDa y 200 kDa; y PSA de alto peso molecular (H-PSA), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de PSA cuyo peso molecular está por encima de 200 kDa.

15 En particular, en las realizaciones en las que la cepa/célula bacteriana aislada descrita en esta solicitud, u OMV o PSA obtenidos a partir de dicha cepa, se usa como compuesto anti-inflamatorio, la afección puede ser cualquier afección asociada a una inflamación o respuesta inflamatoria; o una afección descrita como enfermedad inflamatoria por sí misma. La expresión "asociada a" tal como se usa en la presente memoria en referencia a dos elementos indica una relación entre los dos elementos, de tal modo que la presencia de un primer elemento viene acompañada de la presencia del segundo elemento, lo que incluye, aunque sin limitación, una relación causa-efecto y una relación de señales/síntomas-enfermedad.

20 Las condiciones asociadas a una inflamación (o enfermedades inflamatorias) en humanos incluyen, aunque sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino, que incluye aunque sin limitación enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple (MS), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, alergia alimentaria y soriasis. El especialista en la técnica será capaz de identificar a los sujetos que padecen las enfermedades mencionadas usando los criterios clínicos apropiados.

25 En una realización, las composiciones, extractos o la composición farmacéutica que comprende la cepa/célula bacteriana aislada descrita en esta solicitud, u OMVs, extractos o PSA obtenidos a partir de dicha cepa, pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias, tales como, aunque sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa), asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple y soriasis.

30 El término "tratamiento" o "tratado" tal como se usa en la presente memoria indica cualquier actividad que sea parte de un cuidado médico, o no, o que trate una afección médicamente o quirúrgicamente en animales o humanos. Dichos tratamientos pueden ser administrados por parte de personal médico o no médico.

En algunas realizaciones, la composición se va a administrar a un individuo con otro compuesto/fármaco, y/o un vehículo/portador o excipiente farmacéuticamente aceptable o apropiado.

35 El término "excipiente" tal como se usa en la presente memoria indica una sustancia inactiva usada como vehículo farmacéuticamente aceptable o apropiado para los ingredientes activos de una medicación. Los excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen cualquier sustancia que potencie la capacidad del organismo de un individuo para absorber las vesículas descritas en la presente memoria. Los excipientes adecuados también incluyen cualquier sustancia que pueda usarse para construir formulaciones con las vesículas descritas en la presente memoria para permitir una dosificación conveniente y precisa. Además de su uso en cantidades de dosis unitarias, se pueden usar excipientes en el proceso de fabricación para ayudar en el manejo de las vesículas descritas en la presente memoria. Dependiendo de la ruta de administración, y de la forma de la medicación, se pueden usar diferentes excipientes. Los ejemplos de excipientes incluyen, aunque sin limitación, antiadherentes, aglomerantes, desintegrantes de recubrimiento, rellenos, aromatizantes (tal como edulcorantes) y colorantes, lubricantes, conservantes, absorbentes.

45 Los vehículos farmacéuticamente aceptables o apropiados pueden ser, aunque sin limitación, excipientes orgánicos o inorgánicos, sólidos o líquidos, que sean adecuados para el modo de aplicación seleccionado, tal como aplicación oral o inyección, y que se administren en la forma de una preparación farmacéutica convencional. Dicha preparación incluye sólidos tales como comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, y líquidos tales como una disolución, una emulsión, una suspensión y similares. Dicho vehículo incluye almidón, lactosa, glucosa, sacarosa, dextrina, celulosa, parafina, glicérido de ácidos grasos, agua, alcohol, goma arábiga, y otros similares. Si es necesario, también se pueden añadir agentes auxiliares, estabilizantes, emulsionantes, lubricantes, aglomerantes, controladores de ajuste de pH, agentes isotónicos y otros aditivos convencionales.

55 El vehículo farmacéuticamente aceptable o apropiado bien puede incluir otros compuestos que se sabe que son beneficiosos para una situación afectada del vientre (p.ej., antioxidantes, tales como Vitamina C, Vitamina E, Selenio o Zinc); o una composición alimentaria. La composición alimentaria puede ser, aunque sin limitación, leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados basados en leche, helados, productos basados en cereales fermentados, polvos basados en leche, fórmulas infantiles, comprimidos, suspensiones bacterianas líquidas, suplemento oral seco, o suplemento oral húmedo.

- 5 Un "extracto" tal como se usa en la presente memoria indica tanto el material insoluble como el material soluble obtenido de la célula bacteriana de *B. fragilis* usando diversos procedimientos químicos, inmunológicos, bioquímicos o físicos conocidos por los especialistas en la técnica, que incluyen, aunque sin limitación, precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía en columna y lisis con detergente. El extracto también puede cubrir PSA, la fracción vesicular de la membrana externa y/o la fracción de sobrenadante obtenida al cultivar dichas *B. fragilis*.
- El término "diluyente" tal como se usa en la presente memoria indica un agente diluyente que es empleado para diluir o transportar un ingrediente activo de una composición. Un diluyente adecuado incluye cualquier sustancia que pueda reducir la viscosidad de una preparación medicinal.
- 10 En determinadas realizaciones, las composiciones, compuestos y, en particular, las composiciones farmacéuticas/de extracto/celulares pueden formularse para administración entérica, que incluye, aunque sin limitación, i) bucal (oralmente) como comprimidos, cápsulas o gotas; ii) mediante tubo de alimentación gástrico, tubo de alimentación duodenal, o gastrostomía; y nutrición entérica; y iii) rectalmente como un supositorio.
- 15 En determinadas realizaciones, la célula de *B. fragilis* de la presente invención, o los extractos o PSA derivados de dicha célula, pueden usarse como productos farmacéuticos o como alimento para la administración entérica mencionada antes para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias, tales como, aunque sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple y soriasis.
- 20 En algunas realizaciones, la cepa/célula bacteriana descrita, o las OMVs derivadas de *B. fragilis* aislado (tal como se ha descrito), pueden usarse en un método para tratar o prevenir una afección en un individuo.
- El método comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de la composición o de la composición farmacéutica/extracto/célula/PSA que comprende, o que deriva de, la cepa de *B. fragilis* aislada (tal como se ha descrito en la presente memoria). El término "individuo" tal como se usa en la presente memoria incluye un organismo biológico individual en el que se puede producir inflamación, que incluye, aunque sin limitación, animales y en particular animales superiores y en particular vertebrados tales como mamíferos y en particular seres humanos.
- 25 La célula de *B. fragilis* aislada, o los extractos, OMVs o PSA derivados de *B. fragilis* aislada se pueden administrar como parte, o en la forma de, una composición nutricional, tal como, aunque sin limitación, un brebaje, bebida, aperitivo o producto lácteo, un producto de cereal tal como cereal de desayuno, un producto congelado para consumo tras calentamiento en un microondas o en un horno, un producto listo para consumir, una comida rápida o una fórmula nutricional (que abarca cualquier formulación nutricionalmente completa o suplementaria).
- 30 En realizaciones alternativas, la célula de *B. fragilis* aislada, o los extractos, OMVs o PSA derivados de *B. fragilis* aislada, pueden administrarse como parte de un producto nutracéutico; un probiótico solo (o en combinación con otros probióticos); o compuesto farmacéutico; una formulación medicinal, una crema o una loción.
- 35 El término nutracéutico, tal como se usa en esta solicitud, se refiere a un alimento, producto alimentario, alimento reforzado o suplemento dietético que proporciona beneficios médicos y de salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de la enfermedad.
- 40 La "cantidad efectiva", "cantidad efectiva para" o "cantidad de X efectiva para" se refieren a una cantidad del compuesto, composición o composición farmacéutica/de extracto/celular que es efectiva para tratar, aliviar, reducir o mejorar en cierto grado uno o más de los síntomas de la enfermedad que necesita tratamiento, o para retrasar la inicialización de marcadores clínicos o síntomas de una enfermedad que necesita prevención, cuando el compuesto es administrado. Por tanto, por ejemplo, una cantidad efectiva se refiere a una cantidad del ingrediente de compuesto/composición/producto farmacéutico que exhibe los efectos "mejorados", tal como se indica más adelante.
- 45 La "cantidad efectiva" puede determinarse empíricamente mediante experimentación con los compuestos implicados en sistemas modelo in vivo e in vitro conocidos para una enfermedad que necesita tratamiento. Una cantidad efectiva variará según el peso, sexo, edad e historial médico del individuo, así como la gravedad de la(s) afección(es) del paciente, el tipo de enfermedad(es), el modo de administración, y similares. Una cantidad efectiva puede determinarse directamente usando experimentación rutinaria, p.ej., mediante valoración (administración de dosis crecientes hasta obtener la dosis efectiva) y/o en referencia a cantidades que fueron efectivas para pacientes previos. De forma general, la cantidad efectiva de la presente invención se administrará en dosis que oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente.
- 50 Tal como se usa en la presente memoria, la frase "cantidad profilácticamente efectiva" incluye la cantidad de compuesto/composición/producto farmacéutico/extracto/composición celular que es suficiente para dar como resultado la prevención o la reducción del desarrollo, recurrencia o aparición de uno o más síntomas asociados a un trastorno (o para potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico(s) de otra terapia (p.ej., otro agente profiláctico).
- 55 Se contempla adicionalmente que el compuesto/composición/producto farmacéutico/extracto/composición celular de la presente invención puede usarse con uno o más medicamentos conocidos que son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias, tanto por separado como en combinación.

Por ejemplo, el compuesto/composición/producto farmacéutico/extracto/composición celular de la presente invención se puede combinar con uno o con una combinación de medicamentos/tratamientos que se sabe que son útiles para el tratamiento de IBD (enfermedad inflamatoria del intestino) tales como, aunque sin limitación, sulfasalazina (Azulfadina), mesalamina (Asacol, Pentasa), inmunosupresores (Imuran, 6-MP, ciclosporina); metotrexato, inhibidores de TNF-alfa (Remicade y Humira); y corticosteroides (Entocort y prednisona). Otros tratamientos (experimentales) para la colitis ulcerativa incluyen aloe vera, butirato, boswellia, probióticos, antibióticos, terapia con inmunosupresores, y nicotina.

Por ejemplo, el compuesto/composición/producto farmacéutico/extracto/célula/PSA de la presente invención puede combinarse con uno o con una combinación de medicamentos/tratamientos que se sabe que son útiles en el tratamiento de MS (esclerosis múltiple) tales como, aunque sin limitación, Avonex®, Betaseron® y Copaxone®, Rebif®, Extavia®, Novantrone® (mitoxantrona); Tysabri® (natalizumab) y Gilenya® (fingolimod). Otros fármacos incluyen terapia con inmunoglobulina intravenosa (IVIg), metotrexato, azatioprina (Imuran®) y ciclofosfamida (Cytoxan®); corticosteroides; cytoxan® (ciclofosfamida); Imuran® (azatioprina); metotrexato; intercambio de plasma; pulso de solu-medrol® (metil prednisolona IV); prednisona; Decadron® (dexametasona); Medrol® (metil prednisolona oral); Plasmaféresis (intercambio de plasma); terapia de inmunoglobulina intravenosa (IVIg).

Generación de la cepa mutante productora solo de PSA ("B. Fragilis aislada")

Para crear el mutante de B. fragilis que produce solo PSA a partir del repertorio de polisacáridos capsulares (CPS), se usó el mutante NCTC9343APSB (2) de B. fragilis como cepa progenitora, a partir de la cual se eliminaron una a una todas las localizaciones de biosíntesis de CPS (PSC-PSH) excepto la de PSA. Los segmentos de ADN por encima y por debajo de la región a eliminar fueron amplificados mediante PCR usando los cebadores presentados en la Tabla 1. Se llevó a cabo una segunda ronda de PCR usando los cebadores 1 (cebador directo del flanco izquierdo) y 4 (cebador inverso del flanco derecho) con la mezcla 1:1 de los dos productos de PCR como plantillas, para fusionar los fragmentos de ADN de los flancos izquierdo y derecho usando la región solapante de 18 pb diseñada en los cebadores 2 (cebador inverso del flanco izquierdo) y 3 (cebador directo del flanco derecho). El producto PCR fusionado fue digerido con BamHI y clonado en el sitio BamHI del vector pNJR6 suicida conyugal de Bacteroides. El plásmido fue introducido en Escherichia coli (E. coli) y posteriormente fue transferido conyugalmente a B. fragilis NCTC9343 y los cointegrados fueron seleccionados por resistencia a eritromicina codificada por pNJR6. La cepa cointegrada fue pasada en un medio no selectivo durante 5-8 días y a continuación se llevó a placa sobre medio no selectivo (BHIS). Las colonias resultantes fueron llevadas a placa por réplicas a BHIS que contenía eritromicina y se cribaron las colonias sensibles a eritromicina mediante PCR para distinguir los revertantes naturales de las cepas con la mutación deseada (Tabla 2).

Tabla 1. Cebadores usados para amplificar mediante PCR las regiones flanqueantes por encima y por debajo.

Nombre de cebador	Secuencia	Adición 5'	Propósito
SEQ ID NO. 1 Cebador PSC 1	AAATGCGTTGCTTTTGCTTT	GTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSC - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 2 Cebador PSC 2	TTCGAAATCGTTTTGCTTCA	AAACCATGG	Eliminar PSC - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 3 Cebador PSC 3	CCATGGTTTATGCTGGCTTT	GATTTGAA	Eliminar PSC - flanco derecho
SEQ ID NO. 4 Cebador PSC 4	AACACTACGCCTACCCGATG	TTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSC - flanco derecho
SEQ ID NO. 5 Cebador PSD 1	TACTGACCGAACCCACATCA	GTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSD - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 6 Cebador PSD 2	CGATCCGATCTGTCATAGCA	TAGCCGGTT	Eliminar PSD - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 7 Cebador PSD 3	AACCGGCTAAAAATGGAAGG	ATCGGATCG	Eliminar PSD - flanco derecho
SEQ ID NO. 8 Cebador PSD 4	ATCGGCACTCCAACAGACTT	TTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSD - flanco derecho
SEQ ID NO. 9 Cebador PSE 1	ACTTACGTTCAACGCCATCC	GT GGATCC (BamHI)	Eliminar PSE - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 10 Cebador PSE 2	GAGATTGCCTGGGTGAAAAA	CTTATGGAC	Eliminar PSE - flanco izquierdo

ES 2 662 844 T3

Nombre de cebador	Secuencia	Adición 5'	Propósito
SEQ ID NO. 11 Cebador PSE 3	GTCCATAAGCTTGACGCACA	GGCAATCTC	Eliminar PSE - flanco derecho
SEQ ID NO. 12 Cebador PSE 4	CGTGCAGGTAATGTGATTGG	TT GGATCC (BamHI)	Eliminar PSE - flanco derecho
SEQ ID NO. 13 Cebador PSF 1	TTTGTGAGCGTTTGCTCAAT	GTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSF - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 14 Cebador PSF 2	CATCCTCCCATGCCTAAAGA	GCACCGCAC	Eliminar PSF - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 15 Cebador PSF 3	GTGCGGTGCTGGTTTTTAAT	GGGAGGATG	Eliminar PSF - flanco derecho
SEQ ID NO. 16 Cebador PSF 4	CTATGCCAAGCGGAAAGAAG	TT GGATCC (BamHI)	Eliminar PSF - flanco derecho
SEQ ID NO. 17 Cebador PSG 1	CCCTATTGGCCGGTTTTATT	GTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSG - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 18 Cebador PSG 2	TTGGCTTTATCGTCCGTACC	TTGAAGTGG	Eliminar PSG - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 19 Cebador PSG 3	CCACTTCAACACCATTGACG	TAAAGCCAA	Eliminar PSG - flanco derecho
SEQ ID NO. 20 Cebador PSG 4	CCCCTCTCCAATATCAGCAA	TT GGATCC (BamHI)	Eliminar PSG - flanco derecho
SEQ ID NO. 21 Cebador PSH 1	ATTCCCGCAAGTGCAGATAG	GTGGATCC (BamHI)	Eliminar PSH - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 22 Cebador PSH 2	TTTAAGCGACGTGGAGGTTT	TGGGACTGA	Eliminar PSH - flanco izquierdo
SEQ ID NO. 23 Cebador PSH 3	TCAGTCCCACCCACACAGTA	TCGCTTAAA	Eliminar PSH - flanco derecho
SEQ ID NO. 24 Cebador PSH 4	CACTTACAGCCGTGAGCTTG	TT GGATCC (BamHI)	Eliminar PSH - flanco derecho

Tabla 2. Cebadores usados para distinguir entre revertantes naturales y cepas mutantes de eliminación.

Nombre de cebador	Secuencia	Diana	Tamaño de producto
SEQ ID NO. 25 PSAF	GCGCAAGCTTCTGGTTTAAG	PSA natural	1191 pb
SEQ ID NO. 26 PSAR	CTCCAAAGCCTTCACTTTCG		
SEQ ID NO. 27 delPSA F	GCTAAGACCGTTGCCAAAAT	Mutante de eliminación de PSA	1333 pb
SEQ ID NO. 28 delPSA R	ACCCGCAAACAGAAATGAC		
SEQ ID NO. 29 PSB F	AAATGCGTTGCTTTTGCTTT	PSB natural	1245 pb
SEQ ID NO. 30 PSB R	TTCGAAATCGTTTTGCTTCA		
SEQ ID NO. 31 delPSB F	CATGGAGAAAACATCGTTGG	Mutante de eliminación de PSB	802 pb
SEQ ID NO. 32 delPSB R	CCCAATATCGTTCAGCCAAA		

ES 2 662 844 T3

Nombre de cebador	Secuencia	Diana	Tamaño de producto
SEQ ID NO. 33 C127	GGAGGATGTTTGAATTGGTGG	PSC natural	979 pb
SEQ ID NO. 34 delPSC C	CCCGCTTAATGCCCTAAAAT		
SEQ ID NO. 35 C127	GGAGGATGTTTGAATTGGTGG	Mutante de eliminación de PSC	2825 pb
SEQ ID NO. 36 C121	TATCCTGATGTTCTGCTTTTCCG		
SEQ ID NO. 37 delPSD F	GTATCCCGACGTTACGAGGA	PSD natural	881 pb
SEQ ID NO. 38 delPSD R	CGAGGAATCTTGGCATTGAT		
SEQ ID NO. 39 delPSD F	GTATCCCGACGTTACGAGGA	Mutante de eliminación de PSD	1037 pb
SEQ ID NO. 40 delPSD R	CCATTTGGATAGGCGAGAAA		
SEQ ID NO. 41 delPSE C	CTGAAAGCGCATTTCACA	PSE natural	940 pb
SEQ ID NO. 42 delPSE R	TGCATTCATGGAGGAACAA		
SEQ ID NO. 43 delPSE F	TTGATGGGGAATGAATGGTT	Mutante de eliminación de PSE	1687 pb
SEQ ID NO. 44 delPSE R	TGCATTCATGGAGGAACAA		
SEQ ID NO. 45 delPSF F	GCCCATGTCAGATTTGCTTT	PSF natural	958 pb
SEQ ID NO. 46 delPSF C	TAGGCAAAATATCCGGCATC		
SEQ ID NO. 47 delPSF F	GCCCATGTCAGATTTGCTTT	Mutante de eliminación de PSF	1281 pb
SEQ ID NO. 48 delPSF R	ATGAATGAAGCCGAAAATCG		
SEQ ID NO. 49 delPSG F	AATGCCGTTGTTTTGGTTA	PSG natural	802 pb
SEQ ID NO. 50 delPSG C	ACAGAACCTGCTCCCCTGT		
SEQ ID NO. 51 delPSG F	AATGCCGTTGTTTTGGTTA	Mutante de eliminación de PSG	930 pb
SEQ ID NO. 52 delPSG R	CGGATCATAAAATCGGCAAC		
SEQ ID NO. 53 delPSH F	CGGGTAAACTCTGCCATA	PSH natural	923 pb
SEQ ID NO. 54 delPSH C	GCTCGTATGGATGCTGATGA		
SEQ ID NO. 55 delPSH F	CGGGTAAACTCTGCCATA	Mutante de eliminación de PSH	829 pb
SEQ ID NO. 56 delPSH R	AGGTGCTTTCGTGATTGCTT		

5 Determinamos si el PSA podía ser detectado en extractos de vesículas de la membrana exterior (OMV) de nuestra cepa. Para este propósito se prepararon extractos de vesículas de membrana exterior (OMV) en base a una modificación de un protocolo descrito previamente para la preparación de OMVs de *E. coli* (Amanda L. Horstman y Meta J. Kuehn. (2000) "Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles". *J Biol Chem.* 275: 12489-12496). Resumidamente, se crecieron *B. fragilis* enriquecidas en capa densa de electrones (EDL) en MM ajustado. Se recuperaron las OMVs del sobrenadante libre de bacterias del cultivo mediante centrifugación a 40.000 g durante 2h a 4°C y adicionalmente se lavaron dos veces con PBS y se filtraron a través de columnas de giro de 0,45 µm (Millipore n°20-218). Se determinó la concentración total de proteína de las OMVs purificadas mediante un ensayo Bradford (Biorad n°500-0205). Se prepararon OMVs marcadas con FITO como se ha descrito previamente (Nicole C. Kesty y Meta J. Keuhn. (2004) "Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles". *J. Biol Chem.* 279: 2069-2076). Resumidamente, se incubaron las OMVs en el tampón de tinción (1 mg/mL de FITC (Thermo Scientific n°46424), NaCl 100 mM, Na₂CO₃ 50 mM, pHJ 9,2) durante 1 h a temperatura ambiente. Las OMVs marcadas fueron recuperadas mediante centrifugación a 40.000 g durante 30 min a 4°C y se lavaron dos veces con PBS + NaCl 200 mM.

10 La Figura 4 muestra un análisis de inmunotinción para la producción de PSA a partir de lisatos celulares enteros y de OMVs. Se han analizado 4 cepas bacterianas: bacterias naturales (control positivo), muñante de PSA (APSA); control negativo para especificidad de anticuerpo), mpi44 (la cepa de producción de PSA usada previamente) y AB-H (la cepa recién creada en esta solicitud). Como puede observarse, el PSA es producido según lo esperado en la cepa AB-H tanto en células enteras como en extractos de vesículas de membrana exterior (OMV); confirmando esto último que el PSA es clasificado activamente en las OMVs de nuestra cepa.

15 La cepa/célula bacteriana descrita puede usarse para tratar o prevenir una variedad de enfermedades, tales como, aunque sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple (MS), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, 25 alergia alimentaria y soriasis. De esta manera, las realizaciones vivas, viables o liofilizadas de la célula bacteriana descrita que expresan solo PSA se pueden administrar solas o como parte de un producto farmacéutico; o en conjunción con cualquier otro agente terapéutico útil en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente. En otras realizaciones, las OMVs procedentes de la cepa/célula bacteriana descrita pueden administrarse solas o como parte de un producto farmacéutico; o en conjunción con cualquier otro agente 30 terapéutico útil en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Debería mencionarse que investigadores previos han descrito una célula bacteriana aislada de *Bacteroides fragilis* que produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo, que tiene un promotor nativo que controla la expresión de los genes biosintéticos de PSA nativos y promotores nativos que controlan la expresión de los genes biosintéticos nativos de los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH, en donde el promotor que controla la expresión de los genes biosintéticos nativos de los polisacáridos capsulares nativos seleccionados del grupo que consiste en: PSB, PSD, PSE, PSF y PSH están desactivados, en donde el promotor que controla la expresión de los genes biosintéticos nativos de PSA está activado mediante la eliminación del gen que codifica para una ADN recombinasa que invierte promotores. Tras la eliminación de este gen, a saber invertasa de promotor múltiple (mpi), los elementos bacterianos aislados fueron cribados en busca de una cepa que tuviera el promotor de PSA en la orientación activada, pero el resto de promotores en la orientación desactivada. En ese estudio, el promotor que controla la expresión de un polisacárido capsular está "activado" cuando el promotor invertible está en su orientación transcripcionalmente activa y no se puede invertir a la orientación transcripcionalmente inactiva. El promotor puede estar activado debido a que no está presente una enzima específica de secuencia que normalmente invierte el promotor o ha sido desactivada. Alternativamente, el promotor se puede activar debido a que se ha alterado al menos una unidad de repetición invertida que flanquea la región invertible del promotor, p.ej., ha sido eliminada, de tal modo que la inversión no es posible. Alternativamente, el promotor que controla la expresión de un polisacárido capsular está "desactivado" cuando el promotor invertible está en su orientación transcripcionalmente inactiva y no puede invertirse a la orientación transcripcionalmente activa. El promotor puede estar desactivado porque no esté presente una enzima específica de secuencia que normalmente invierte el promotor, o que esté desactivada. Alternativamente, el promotor puede estar desactivado porque esté alterada al menos una unidad de repetición invertida que flanquea a la región invertible del promotor, p.ej., haya sido eliminada, de tal modo que la inversión no es posible.

La Figura 5 muestra que la bacteria mutante que solo expresa PSA (*B. fragilis*APSB-PSH) cumple con su propósito para facilitar la purificación de PSA, como evidencia el RMN.

55 La Figura 6 muestra la inducción de IL-10 de cultivos in vitro de células dendríticas y células T tratadas con PSA purificado a partir de la bacteria mutante productora solo de A (*B. fragilis*APSB-PSH) (PSA12 y PSA13). Ambos PSA tienen una apariencia similar.

Referencias (que se incorporan todas a modo de referencia en su plenitud).

1. Liu CH, Lee SM, Vanlare JM, Kasper DL, Mazmanian SK. 2008. Regulation of Surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3951-6
- 5 2. Coyne MJ, Kalka-Möll W, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. 2000. *Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci. *Infect Immun* 68: 6176-81

ES 2 662 844 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Mazmanian, Sarkis
<120> Generación de cepa mutante productora solo de PSA
5 <130> 7920-112
<140> US 13/573,695
<141> 03-10-2012
10 <160> 56
<170> PatentIn versión 3.5
15 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Cebador PCR
<400> 1
aaatgcgttg ctttgctt 20
25 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<223> Cebador PCR
<400> 2
ttcgaaatcg tttgctca 20
35 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
40 <220>
<223> Cebador PCR
<400> 3
ccatggtta tgctggctt 20
45 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
55 <400> 4
aacactacgc ctaccgatg 20
<210> 5
<211> 20
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR

ES 2 662 844 T3

	<code><400>5</code>	
	<code>tactgaccga acccacatca</code>	20
5	<code><210> 6</code>	
	<code><211> 20</code>	
	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia Artificial</code>	
10	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador PCR</code>	
	<code><400>6</code>	
	<code>cgatccgac tgcatagca</code>	20
15	<code><210> 7</code>	
	<code><211> 20</code>	
	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia Artificial</code>	
20	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador PCR</code>	
	<code><400>7</code>	
25	<code>aaccggctaa aaatggaagg</code>	20
	<code><210> 8</code>	
	<code><211> 20</code>	
	<code><212> ADN</code>	
30	<code><213> Secuencia Artificial</code>	
	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador PCR</code>	
35	<code><400>8</code>	
	<code>atcggcactc caacagactt</code>	20
	<code><210> 9</code>	
	<code><211> 20</code>	
40	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia Artificial</code>	
	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador PCR</code>	
45	<code><400>9</code>	
	<code>acttacgttc aacgcatcc</code>	20
	<code><210> 10</code>	
50	<code><211> 20</code>	
	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia Artificial</code>	
	<code><220></code>	
55	<code><223> Cebador PCR</code>	
	<code><400> 10</code>	
	<code>gagattgctt ggtgaaaaa</code>	20
60	<code><210> 11</code>	
	<code><211> 20</code>	
	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia Artificial</code>	
65	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador PCR</code>	

<400> 11
 gtccataagc ttgacgcaca 20

5 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 ~~<220>~~
 <223> Cebador PCR

<400> 12
 cgtgcaggta atgtgattgg 20

15 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 13
 tttgtgagcg tttgctcaat 20

25 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 14
 catcctccca tgcctaaaga 20

35 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 15
 gtgcggtgct ggttttaat 20

45 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 16
 ctatgccaag cggaaagaag 20

55 <210> 17
 ~~<211> 20~~
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador PCR

65 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 17
 ccctattggc cggttttatt 20
 5 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
10 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 18
 ttggcttat cgtccgtacc 20
 15 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 19
 25 ccacttcaac accattgacg 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 35 <400> 20
 cccctctcca atatcagcaa 20
 <210> 21
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 45 <400> 21
 attcccgcaa gtgcagatag 20
 <210> 22
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Cebador PCR
 <400> 22
 ttaagcgac gtggaggttt 20
 60 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Cebador PCR

ES 2 662 844 T3

<400> 23
 tcagtccac ccacacagta 20

5 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 24
 cacttacagc cgtgagcttg 20

15 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 25
 gcgcaagctt ctggttaag 20

25 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 26
 ctccaaagcc ttcacttcg 20

35 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 27
 gctaagaccg ttgcaaaaat 20

45 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 28
 acccgcaaaa cagaaatgac 20

60 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 29
 aaatgcgttg ctttgctt 20
 5 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
10 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 30
 15 ttcgaaatcg ttttgctca 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 31
 25 catggagaaa acatcgttg 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 32
 35 cccaatatcg tcagccaaa 20
 <210> 33
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 45 <400> 33
 ggaggatggt tgaattggtg g 21
 <210> 34
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Cebador PCR

 <400> 34
 cccgcttaat gccctaaaat 20
 60 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 35
 ggagatggt tgaattggtg g 21

5 <210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 36
 tatcctgatg ttctgctttt ccg 23

15 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 37
 gtatcccgac gttacgagga 20

25 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 38
 cgaggaatct tggcattgat 20

35 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 39
 gtatcccgac gttacgagga 20

45 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 40
 ccatttgat aggcgagaaa 20

55 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador PCR

65 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 41
 ctgaaagcgc atttcaaca 20

5 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 42
 tgcatttcat ggaggaacaa 20

15 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 43
 ttgatgggga atgaatggtt 20

25 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 44
 tgcatttcat ggaggaacaa 20

35 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 45
 gcccatgtca gatttgctt 20

45 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 46
 taggcaaaat atccggcatc 20

55 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador PCR

65 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 47
 gcccatgtca gatttgctt 20

5 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 48
 atgaatgaag ccgaaaatcg 20

15 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 49
 aatgccggtt gttttggta 20

25 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 50
 acagaacctg ctcccactgt 20

35 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 51
 aatgccggtt gttttggta 20

45 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 52
 cggatcataa aatcggaac 20

55 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador PCR

65 <220>
 <223> Cebador PCR

ES 2 662 844 T3

<400> 53
cgggtaaac tctgccata 20

5 <210> 54
<211> >20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 54
gctcgatgg atgctgatga 20

15 <210> 55
<211> >20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 55
cgggtaaac tctgccata 20

25 <210> 56
<211> >20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador PCR

35 <400> 56
agggtcttc gtgattgctt 20

REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana de *B. fragilis* que produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo, en donde la célula es incapaz de producir los polisacáridos capsulares PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH.
- 5 2. La célula de la reivindicación 1, en donde los genes biosintéticos de la célula correspondientes a los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.
3. La célula de la reivindicación 1, en donde el PSA es expresado sobre las vesículas de la membrana exterior de la célula.
4. La célula de la reivindicación 1, en donde no se ha modificado un promotor que controla la expresión de PSA.
- 10 5. La célula de la reivindicación 4, en donde el promotor de PSA tiene una o más regiones de repetición flanqueantes que rodean al promotor, y en donde dichas regiones flanqueantes no han sido modificadas.
6. La célula de la reivindicación 1, en donde la célula es administrada, como parte de un producto farmacéutico, a individuos que padecen una enfermedad o afección inflamatoria.
7. La célula de la reivindicación 3, en donde las vesículas de membrana exterior de la célula son administradas, como parte de un producto farmacéutico, a individuos que padecen una enfermedad o afección inflamatoria.
- 15 8. Una composición que comprende un extracto bacteriano o fracción celular obtenidos de una célula aislada de *B. fragilis* que produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo, en donde los genes biosintéticos de dicha célula aislada de *B. fragilis* correspondientes a los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.
- 20 9. La composición de la reivindicación 8, en donde un promotor que controla la expresión de PSA no ha sido modificado en la célula de *B. fragilis*.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde el promotor de PSA tiene una o más regiones de repetición flanqueantes que rodean al promotor, y en donde dichas regiones flanqueantes no han sido modificadas en la célula de *B. fragilis*.
- 25 11. La composición de la reivindicación 8, en donde la fracción celular es una fracción vesicular de membrana exterior.
12. Una composición para uso en el tratamiento de un individuo con inflamación que comprende una cantidad efectiva de un producto farmacéutico que comprende una célula aislada de *B. fragilis*, o un extracto o fracción celular obtenidos de dicha célula aislada de *B. fragilis*, en donde la célula aislada produce un polisacárido A (PSA) capsular nativo, y en donde los genes biosintéticos de dicha célula aislada correspondientes a los polisacáridos capsulares nativos PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG y PSH han sido eliminados del genoma de la célula.
- 30 13. La composición para uso según la reivindicación 12, en donde la fracción celular es una fracción vesicular de membrana exterior.

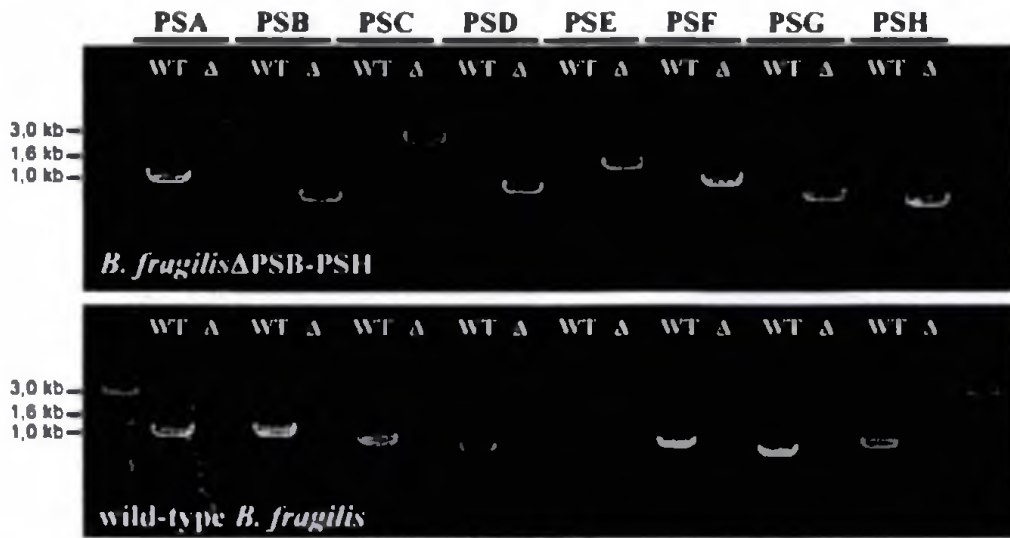


Figura 1

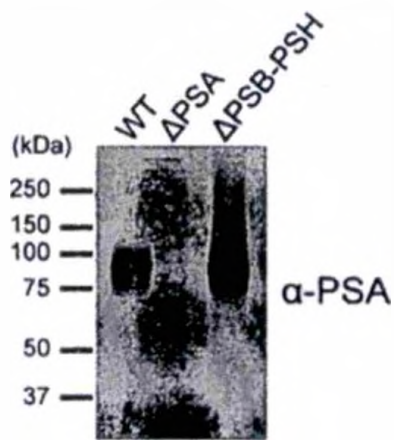


Figura 2

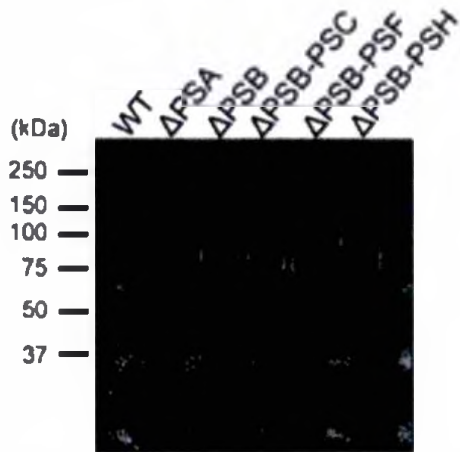
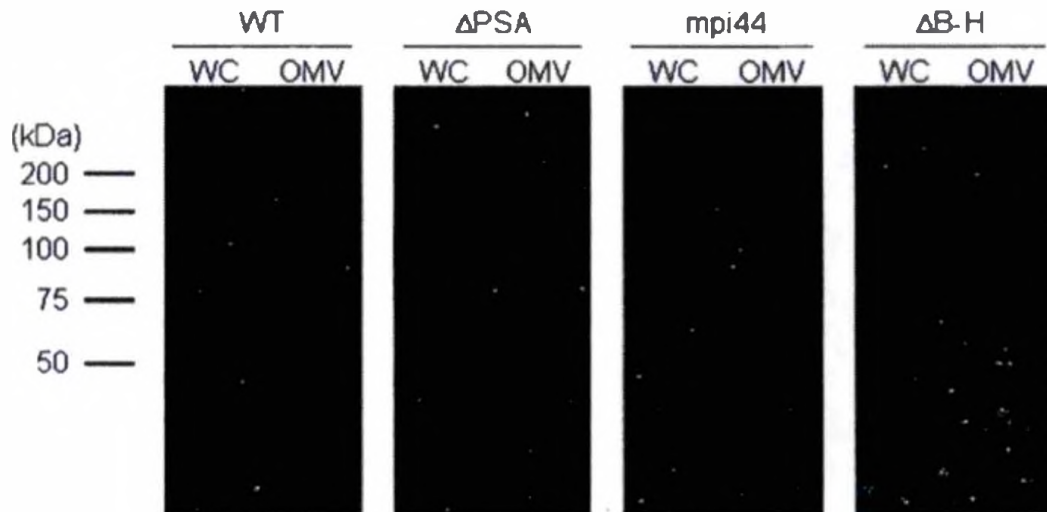


Figura 3



WC - extracto celular entero; OMV - vesículas de membrana exterior

Figura 4

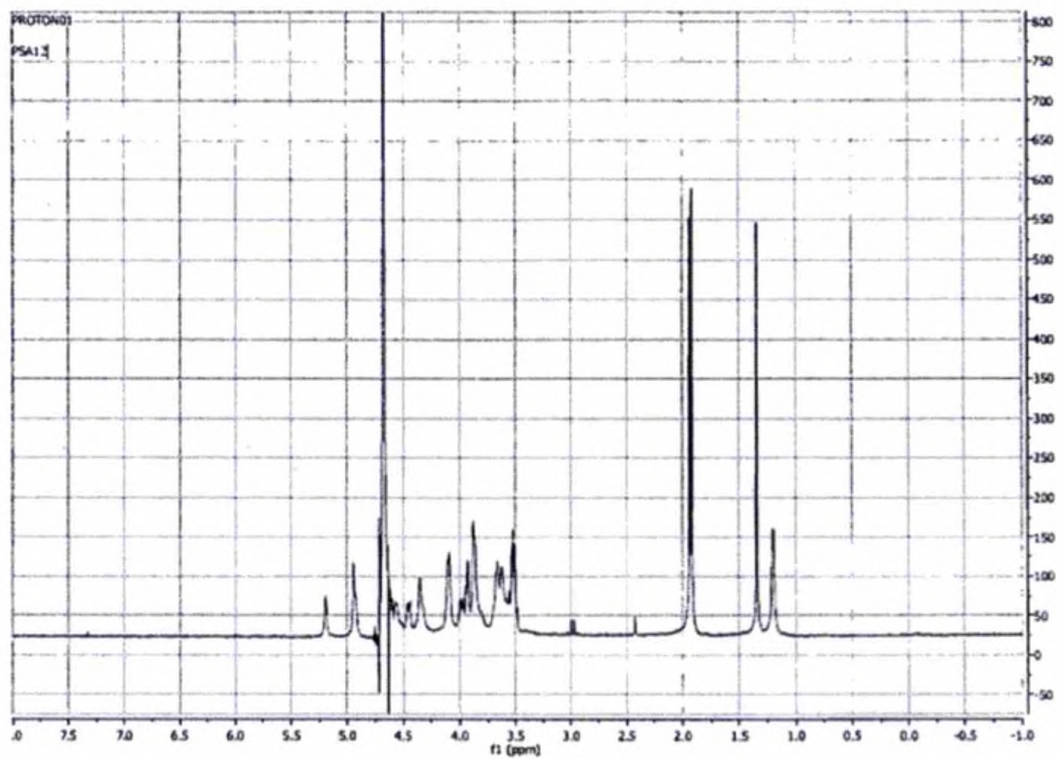


Figura 5

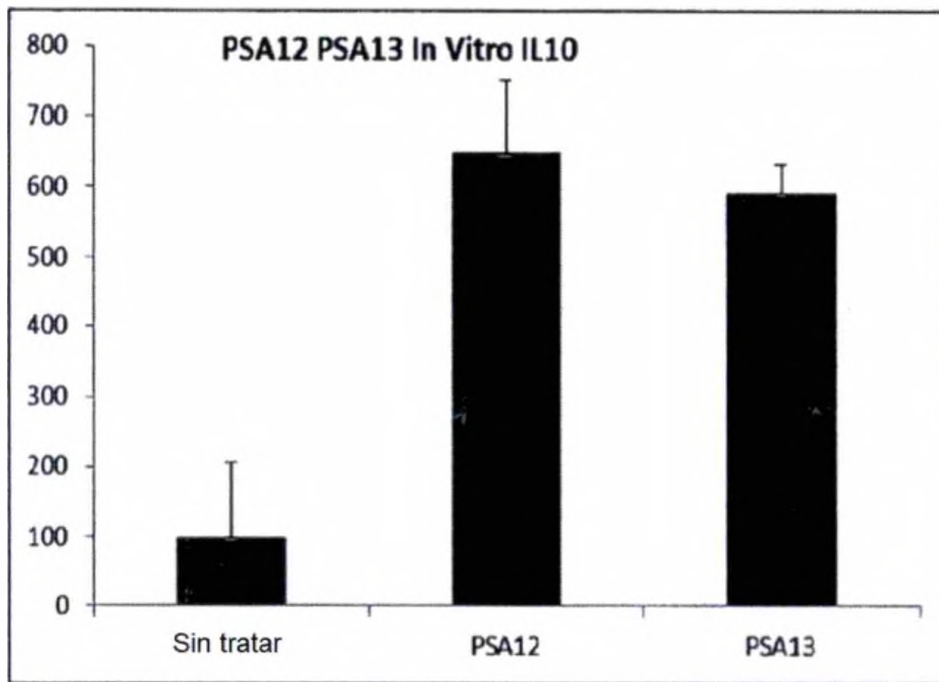


Figura 6