

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 100**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/133</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/127</b>	(2006.01)	<b>C12N 5/0783</b>	(2010.01)
<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)	<b>A23L 33/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/69</b>	(2007.01)
<b>A61K 39/02</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/10</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/715</b>	(2006.01)		
<b>C08B 37/00</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2011 PCT/US2011/031606**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11127302**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2011 E 11766746 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2555753**

54 Título: **Vehículo para distribuir un compuesto en una membrana mucosa y composiciones, procedimientos y sistemas relacionados**

30 Prioridad:

**14.05.2010 US 345039 P**  
**07.04.2010 US 321527 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.12.2018**

73 Titular/es:

**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY**  
**(100.0%)**  
**1200 East California Boulevard, M/S 201-85**  
**Pasadena, CA 91125, US**

72 Inventor/es:

**SHEN, YUE y**  
**MAZMANIAN, SARKIS K.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 694 100 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**

Vehículo para distribuir un compuesto en una membrana mucosa y composiciones, procedimientos y sistemas relacionados

**Declaración de subvención del gobierno**

5 El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la presente invención en virtud de la subvención N.º DK078938 otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud.

**Campo de la invención**

10 La presente divulgación se refiere a un vehículo para distribuir un compuesto en composiciones de membrana mucosa, procedimientos y sistemas. En particular, la presente divulgación se refiere a vehículos para distribuir un compuesto en una membrana mucosa del tracto digestivo.

**Antecedentes de la invención**

La distribución eficaz de un compuesto o sustancia deseada en la membrana mucosa ha supuesto un reto, en particular cuando se hace referencia a la distribución en el tracto digestivo, y, en particular, en el tracto gastrointestinal humano.

15 El tracto gastrointestinal humano alberga un número extraordinario de microbios (conocidos como microbiota intestinal) que tienen un efecto profundo en el desarrollo y la función del sistema inmunológico. De las innumerables especies de bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal de los mamíferos, Los bacteroidetes son el filo bacteriano gramnegativo más abundante.

20 La identificación de microorganismos y compuestos inmunomoduladores es de particular interés. En particular, *Bacteroides fragilis* es un microorganismo comensal humano que ha demostrado tener propiedades inmunomoduladoras. En particular, las propiedades inmunomoduladoras de *Bacteroides fragilis* se han asociado a la producción de polisacárido A (PSA) por la bacteria. A este respecto, se observa que la solicitud de patente de Estados Unidos US 2004/0219160 se refiere a "inmunomoduladores zwitteriónicos para el tratamiento del asma y la alergia" (título) y el documento US 2009/0124573 se refiere a "compuestos inmunomoduladores y a composiciones y procedimientos relacionados" ( título).

25 Las bacterias gramnegativas han desarrollado intrincados mecanismos para exportar productos bacterianos; sistemas de secreción de tipo III (T3SS), T4SS y T6SS, que ensamblan apéndices complejos de superficie que translocan los efectores bacterianos después del contacto directo con las células huésped. Otra estrategia de secreción son las vesículas de membrana externa (VME) que se distribuyen desde la superficie de las bacterias gramnegativas y distribuyen un conjunto de carga molecular a células diana distantes. Aunque muchas bacterias gramnegativas (si no todas) parecen producir VME, las secuencias genómicas de las bacterias comensales humanas revelan una ausencia universal de T3SS, T4SS y T6SS. A este respecto, se observa que D. J. Chen y col., se refieren a "distribución de antígenos extraños mediante vacunas de vesículas de membrana externa diseñadas por ingeniería" (título) en PNAS vol. 107, n.º 7, 16 de febrero de 2010, páginas 3099-3104.

35 Sin embargo, la identificación del mecanismo y/o los desencadenantes moleculares mediante los cuales *B. fragilis* (o cualquier bacteria comensal) distribuye moléculas microbianas beneficiosas al sistema inmunitario y realiza las propiedades inmunomoduladoras ha supuesto un reto.

40 Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, representan trastornos graves por los cuales una inflamación intestinal descontrolada conduce a una patología grave del tracto digestivo. La EII afecta aproximadamente a 1 millón de personas en Estados Unidos. Además de la carga médica y social de la EII, la incidencia de la enfermedad está aumentando de manera alarmante en las sociedades "occidentales" y las terapias actuales son en gran medida inadecuadas. Aunque la causa o causas de la EII siguen siendo enigmáticas incluso después de décadas de investigación, los defectos en la regulación inmune hacia las bacterias intestinales parecen desempeñar un papel importante en la enfermedad<sup>3</sup>.

45 **Breve resumen de la invención**

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción que se presenta a continuación. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, de las reivindicaciones.

50 En el presente documento, los inventores desvelan que el PSA se administra al huésped por medio de vesículas de membrana externa (VME), estructuras de secreción que dirigen moléculas bacterianas a las células huésped. Las VME que contienen PSA son internalizadas por las células dendríticas del sistema inmunitario del huésped. Tras la captación de las VME, el PSA programa las células dendríticas para inducir la diferenciación de los linfocitos T reguladores (Treg) que expresan Foxp3 y la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10). El desarrollo de Treg por las VME requiere la expresión del receptor de tipo toll 2 (TLR2) y la producción de IL-10 por las células dendríticas.

- De manera destacable, las VME purificadas dirigen la diferenciación *in vitro* de los Treg funcionales con una potente actividad supresora de una manera dependiente de PSA. El tratamiento de animales con VME que contienen PSA previene la colitis experimental y suprime las respuestas de citocinas proinflamatorias en el intestino. Estos hallazgos revelan que las bacterias comensales proporcionan factores microbianos beneficiosos a través de la secreción de vesículas, un procedimiento que puede convertirse en un enfoque novedoso para la administración de terapias probióticas para la EII.
- 5 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica para administrar un compuesto a una membrana mucosa, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, la vesícula que comprende un ligando de PSA; y un vehículo farmacéuticamente apropiado.
- 10 En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica para administrar un compuesto a una membrana mucosa, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, la vesícula que comprende un ligando de PSA; y un transportador farmacéuticamente apropiado, en la que la membrana lipídica deriva de la membrana externa de *B. fragilis*.
- 15 En una realización más particular de la composición para su uso de acuerdo con el párrafo [0011], el ligando de PSA es L-PSA.
- En aún otra realización de la composición para su uso de acuerdo con el párrafo [0011], la composición farmacéutica comprende además uno o más medicamentos o tratamientos que se sabe que son útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 20 En una realización, un procedimiento para tratar una enfermedad inflamatoria o inflamación en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, la vesícula que comprende un ligando de PSA, en la que la membrana lipídica deriva de la membrana externa de *Bacteroides fragilis*.
- En una realización particularizada del procedimiento en el párrafo [0015], la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria intestinal.
- 25 En aún otra realización, una vesícula para administrar un compuesto a una membrana mucosa, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula un ligando de PSA.
- En una realización más particularizada de la vesícula en el párrafo [0017], la vesícula comprende además un compuesto distinto de PSA.
- 30 En otra realización, se proporciona un procedimiento para dirigir la diferenciación de Treg funcionales con una potente actividad supresora, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula un ligando de PSA.
- En una realización más particularizada del procedimiento en el párrafo [0019], los linfocitos Treg inhiben la proliferación de linfocitos T y/o suprimen adicionalmente a inmunidad al reducir la activación de las células dendríticas.
- 35 En otra realización del procedimiento en el párrafo [0019], el procedimiento comprende adicionalmente proporcionar CD para el cocultivo, en el que se produce IL-10 y la producción de IL-10 depende de la presencia de expresión de TLR2 en las CD, en comparación con la actividad de PSA solo (en ausencia de VME) en la producción en CD de IL-10 donde no se requiere la expresión de TLR2 en las CD.
- 40 En otra realización, se proporciona un procedimiento para identificar compuestos que reducen la inflamación o mejoran los síntomas de una enfermedad inflamatoria *in vitro*, que comprende proporcionar un compuesto candidato e incubar el compuesto con linfocitos Treg; proporcionando además linfocitos T y, a continuación, determinando si dichos linfocitos Treg inhiben la activación de los linfocitos T.
- 45 En una realización más particularizada del procedimiento en el párrafo [0022], el procedimiento comprende además células dendríticas y/o en el que los linfocitos Treg expresan Foxp3.
- En otra realización, se proporciona una composición bacteriana para su uso como un medicamento, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula un ligando de PSA.
- 50 En una realización más particularizada de la composición para su uso de acuerdo con el párrafo [0024], la sustancia bacteriana comprende además un excipiente y/o uno o más medicamentos que se sabe que son útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- En otra realización, se proporciona una composición bacteriana para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria o inflamación que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica

que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula un ligando de PSA.

En una realización más particularizada de la composición para su uso de acuerdo con el párrafo [0026], la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria intestinal.

5 En otra realización, una composición para dirigir la diferenciación de Treg funcional con potente actividad supresora, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula un ligando de PSA.

En una realización más particularizada de la composición para su uso de acuerdo con el párrafo [0028], los Treg inhiben la activación de los linfocitos T y/o en la que los linfocitos Treg expresan Foxp3.

10 También se proporcionan en el presente documento procedimientos y sistemas para detectar microorganismos y sustancias relacionadas que tienen propiedades inmunomoduladoras y, en particular, antiinflamatorias. En particular, en el presente documento se proporcionan procedimientos y sistemas que, en varias realizaciones, permiten la identificación de sustancias bacterianas que pueden inducir en un individuo una respuesta inmunomoduladora comparable a la de *Bacteroides fragilis*.

15 De acuerdo con otra realización, se describe un procedimiento para identificar una sustancia bacteriana que tiene capacidad inmunomoduladora. El procedimiento comprende poner en contacto una sustancia bacteriana candidata con un linfocito T solo o en presencia de una célula presentadora de antígeno, y detectar la expresión de al menos uno de uno o más biomarcadores antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IL-10, Foxp3, TGFβ1, TGFβ2, perforina y granzima B, y uno o más biomarcadores inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IFNγ, IFNα, IFNβ, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 o TNFα. El procedimiento  
20 comprende además determinar una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata mediante la detección de un aumento de la expresión de uno o más biomarcadores antiinflamatorios o una disminución de la expresión de uno o más biomarcadores inflamatorios después del contacto.

25 De acuerdo con aún otra realización, se describe un procedimiento para identificar una sustancia bacteriana que tiene capacidad inmunomoduladora. El procedimiento comprende poner en contacto una sustancia bacteriana candidata con una célula presentadora de antígeno e incubar la célula presentadora de antígeno con un linfocito T después de la puesta en contacto. El procedimiento comprende además detectar la expresión de al menos uno de uno o más biomarcadores antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IL-10, Foxp3, TGFβ1, TGFβ2, perforina y granzima B, y uno o más biomarcadores inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IFNγ, IFNα, IFNβ, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 o TNFα. El procedimiento comprende  
30 además determinar una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata mediante la detección de un aumento de la expresión de uno o más biomarcadores antiinflamatorios o una disminución de la expresión de uno o más biomarcadores inflamatorios después de la incubación.

35 De acuerdo con otro aspecto, se describe un procedimiento para identificar una sustancia bacteriana que tiene capacidad inmunomoduladora en animales. El procedimiento comprende tratar un marcador transgénico de un animal no humano con una sustancia bacteriana candidata, estando el marcador transgénico de animal no humano modificado genéticamente para expresar al menos uno de uno o más biomarcadores antiinflamatorios marcados seleccionados del grupo que consiste en IL-10, Foxp3, TGFβ1, TGFβ2, perforina y granzima B, y uno o más biomarcadores inflamatorios marcados seleccionados del grupo que consiste en IFNγ, IFNα, IFNβ, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 o TNFα. El procedimiento comprende además detectar la expresión  
40 en el marcador transgénico de animales no humanos de al menos uno de los uno o más biomarcadores antiinflamatorios o al menos uno de los biomarcadores inflamatorios después del tratamiento y la determinación de una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata a través de la detección de un aumento de la expresión de uno o más biomarcadores antiinflamatorios o una disminución de la expresión de los uno o más biomarcadores inflamatorios después del tratamiento.

45 De acuerdo con otro aspecto, se describe un sistema para seleccionar una sustancia bacteriana. El sistema comprende al menos dos de un linfocito T, una célula presentadora de antígeno y reactivos para la detección de al menos uno de uno o más biomarcadores antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IL-10, Foxp3, TGFβ1, TGFβ2, perforina y granzima B, y uno o más biomarcadores inflamatorios marcados seleccionados del grupo que consiste en IFNγ, IFNα, IFNβ, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 o TNFα, para  
50 el uso simultáneo, combinado o secuencial en un procedimiento para identificar una sustancia bacteriana antiinflamatoria descrita en el presente documento.

55 Los procedimientos y sistemas descritos en el presente documento pueden usarse en relación con aplicaciones médicas, farmacéuticas, veterinarias así como estudios biológicos fundamentales y diversas aplicaciones que un experto podrá identificar tras la lectura de la presente divulgación, en la que es deseable investigar la capacidad inmunomoduladora y, en particular, la capacidad antiinflamatoria de una sustancia.

**Breve descripción de los dibujos**

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y forman parte de esta especificación, ilustran una o más realizaciones de la

presente divulgación y, junto con la descripción detallada y las secciones de ejemplo, sirven para explicar los principios e implementaciones de la divulgación.

La figura 1 muestra que las vesículas de membrana externa (VME) de *Bacteroides fragilis* contienen PSA. La figura 1a muestra VME producidas por *B. fragilis* de tipo silvestre y ΔPSA de *B. fragilis* que se detectaron mediante microscopia electrónica de transmisión de *B. fragilis* enriquecida con EDL (capa electrodensa). La figura 1b muestra un análisis de inmunotransferencia de células enteras (CE) y extractos de vesículas de membrana externa (VMO) de bacterias de tipo silvestre y mutantes para SA. La figura 1c muestra el marcaje inmunológico de VME purificadas, teñidas con anti-PSA y conjugado de anti-IgG-oro coloidal (5 nm), analizado por microscopia electrónica. La figura 1d muestra una tinción con glicoproteínas de preparaciones de polisacáridos capsulares a partir de células enteras y VME.

La figura 2 ilustra los resultados de ejemplo que muestran que las VME protegen a los animales de la colitis experimental y la inflamación intestinal de una manera dependiente de PSA. La figura 2a muestra un diagrama que notifica la pérdida de peso en grupos de animales tras la inducción de colitis TNBS (día 0) medida como la reducción desde el peso inicial hasta el día del sacrificio (día 4). Todos los grupos contenían al menos 4 animales, con barras de error que indican el error estándar de la media (SEM). Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. Los valores de p se determinan mediante ANOVA de una vía: \* p<0,05; \*\*\*p<0,001. La figura 2b muestra imágenes de dos colon no manipulados inmediatamente después de la resección y la cuantificación de la longitud (gráfico) del grupo tratado con vehículo (EtOH) y TNBS (n = 4 animales/grupo). Las barras de error indican SEM. Los resultados se muestran a partir de 3 experimentos combinados realizados independientemente. Los valores de p se determinaron mediante un ANOVA de una vía: \*\*\*p<0,001. NS: no significativo. La figura 2c muestra imágenes de secciones de colon teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) representativas de cada grupo de tratamiento. La figura 2d muestra las puntuaciones de colitis de animales asignados por un anatomopatólogo con enmascaramiento (G.W.L) de acuerdo con un sistema de puntuación estándar (PROCEDIMIENTOS EN LÍNEA) (Scheiffele y Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology. 1.19.1-15.19.14) Cada símbolo representa un animal individual. Los resultados se muestran a partir de 3 experimentos combinados realizados independientemente. \*\*\*p<0,001. NS: no significativo. Las figuras 2e y f muestran diagramas que ilustran el análisis de transcripción de citocinas mediante qRT-PCR a partir del ARN recuperado de dos colon enteros (Figura 2e) o linfocitos T CD4+ purificados de ganglios linfáticos mesentéricos (Figura 2f). Las barras de error indican SEM de 4 animales/grupo. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes.

La figura 3 muestra resultados que indican que las VME que contienen PSA inducen la producción de IL-10 y la expresión de Foxp3 de linfocitos T co-cultivados con CD tratadas. La Figura 3a muestra el análisis por citometría de flujo (CF) de la internalización de VME por las CD. Las VME se marcaron con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y se incubaron con CD cultivadas varias veces (como se indica). Las células se tiñeron con anti-CD11c. Los porcentajes muestran poblaciones de CD11c + VME +. La figura 3b muestra las representaciones de CF de las CD incubadas con SV-VME y ΔPSA-VME varias veces (según se indica) y teñidas con anti-CD11c y anti-MHCII. Los porcentajes muestran poblaciones MHCII+ entre las células CD11c+. La Figura 3c muestra el análisis ELISA para IL-10 de sobrenadantes de cultivos de CD o cocultivos de células CD-T, donde las CD se pulsaron con VME durante 18 horas, se lavaron y se incubaron con linfocitos T CD4+ primarios o no. Los sobrenadantes se recogieron el día 4 de cultivo. Las muestras de medios indican CD que no recibieron pulsos de VME, pero por lo demás se trataron de manera idéntica. Se añadió anti-CD3 a algunas muestras para aumentar las respuestas de los linfocitos T. Las barras de error indican SEM de muestras por triplicado. Los resultados son representativos de más de 5 ensayos independientes. \* p<0,05; \*\* p < 0,01. La figura 3d (panel izquierdo) muestra un análisis ELISA similar a la figura 3c, pero también incluye CD diferenciadas de animales IL-10-/. Las barras de error indican SEM de muestras por triplicado. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. \* p<0,05. NS: no significativo. La figura 3d (panel derecho) muestra un análisis ELISA similar a la figura 3c, pero también incluye CD diferenciadas de animales TLR2-/. SEA: enterotoxina A estafilocócica. Las barras de error indican SEM de muestras por triplicado. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. \* p<0,05. NS: no significativo. La figura 3e muestra los niveles de transcripción de IL-10 (izquierda) y Foxp3 (derecha) según lo determinado mediante qRT-PCR del ARN recibido de los subconjuntos de linfocitos T purificados después de un cultivo *in vitro* con CD. Los cocultivos se establecieron como en (c-e); el día 4, los linfocitos T CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- se purificaron mediante separación con perlas magnéticas (> 95 % de pureza) y se extrajo el ARN con un mini kit RNeasy. Los valores relativos se normalizaron respecto a β-actina. Las barras de error indican SEM de muestras por triplicado. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. \* p<0,05; \*\*\*p<0,001. NS: no significativo. La figura 3f muestra cocultivos configurados como en (c-e), pero utilizando linfocitos T CD4+ de ratones Foxp3-GFP. Tras 4 días de cultivo con CD con pulsos de VME, las células se tiñeron con anti-CD4 y Foxp3 se detectó mediante la expresión de GFP usando FC. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes.

La figura 4 muestra resultados de ejemplo que indican la generación *in vitro* de la función supresora de Treg por VME que contienen PSA. La Figura 4a muestra los histogramas de FC de la expresión de IL-10 por subconjuntos de linfocitos T CD4+ después de un cocultivo de 4 días con CD tratados con VME. Los linfocitos T CD4+ de bazo se purificaron en ratones IL-10-GFP, se tiñeron con anti- CD4 y anti-CD25 tras el cocultivo y se midió la expresión de IL-10 mediante la expresión de GFP. Los porcentajes muestran las poblaciones de IL-10+ entre las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25-. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. La figura 4b muestra la supresión *in vitro* de células respondedoras intactas por linfocitos T CD4+ CD25+ purificadas después del

5 cocultivo con CD tratadas con medios (control), SV-VME y  $\Delta$ PSA-VME. La proliferación celular se midió mediante FC de dilución de CFSE. Se indican las relaciones Treg:Tef y los porcentajes muestran las células en proliferación totales. No Treg: solo las células CD4+CD25-. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. La figura 4c muestra la cuantificación del porcentaje de linfocitos T CD4+ en cada pico de proliferación (marcado como 1,2, 3, 4, 5 en la figura 4b). Los resultados se muestran a partir de 3 experimentos combinados realizados independientemente. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ . NS: no significativo.

10 La figura 5 muestra que *B. fragilis* de tipo salvaje y mutante con delección de PSA de *B. fragilis* producen una cantidad similar de VME durante el cultivo *in vitro*. La cantidad de proteína total recuperada de cada preparación de VME normalizada por DO600 del cultivo en el momento de la cosecha. Las barras de error indican SEM. El resultado se muestra a partir de > 10 experimentos combinados preformados independientemente. El valor p se determinó mediante la prueba t de Student. NS: no significativo.

15 La figura 6 muestra que las VME mayoritarias purificadas a partir de *B. fragilis* de tipo salvaje contienen PSA. El marcaje Immunogold de PSA en VME purificadas muestra que el 60 % de las SV-VME observadas entre muestras aleatorias de 10 áreas (1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ ) de muestra están asociadas con PSA, pero ninguna de las  $\Delta$ PSA-VME observadas se tiñen positivamente para el PSA. (El marcaje Immunogold de las SV-VME con oro anti-IgG-oro solo confirma la especificidad del marcaje).

20 La figura 7 muestra las VME de *B. fragilis* salvaje o mutante con delección de PSA no muestran una diferencia significativa en la composición proteica. La espectrometría de masas de proteomas muestra una superposición del 100 % de las proteínas identificadas (> 1 péptido único identificado para cada proteína) entre SV-VME y  $\Delta$ PSA-VME. Entre todas las proteínas identificadas, los inventores compararon de forma semicuantitativa la cantidad de esas proteínas relativamente abundantes según el número de péptidos únicos identificados para cada una de ellas. La mayoría de ellas no muestran diferencias realizadas de forma independiente. Los errores indican SEM. El valor p se determinó mediante la prueba t de Student. \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; NS: no significativo.

25 La figura 8 muestra que se requiere polimerización de actina para la captación de VME por parte de las CD. Análisis de citometría de flujo de la internalización de VME por CD pretratadas con citochalasina D. Las VME se marcaron con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y se incubaron con CD cultivadas varias veces (como se indica). Las células se tiñeron con anti-CD11c. Los porcentajes muestran poblaciones de CD11c + VME +.

30 La figura 9 muestra que las SV-VME o  $\Delta$ PSA-VME están internalizadas y localizadas en el citoplasma de las CD. Micrografías fluorescentes de la internalización de VME (SV o  $\Delta$ PSA) por las CD. Las VME se marcaron con FITC (flecha gris) y se incubaron con CD cultivadas durante 2 horas. Las células se fijaron y la membrana celular se tiñó con aglutinina de germen de trigo (WGA)-tetrametilrodamina (flecha negra). Barra de escala: 7,5  $\mu\text{m}$ .

35 La figura 10 muestra que las SV-VME y PSA-VME regulan por aumento la molécula coestimuladora para la activación de CD. Los diagramas de FC de las CD se incubaron con SV-VME y  $\Delta$ PSA-VME varias veces (como se indica) y se tiñeron con anti-CD11c y anti-CD86. Los porcentajes muestran poblaciones CD86+ entre las células CD11c+.

La figura 11 muestra la expresión de biomarcadores inducida por PSA en una realización descrita en el presente documento. Los datos ilustrados en cada diagrama son representativos de tres experimentos independientes. Las barras claras indicaron células derivadas de ratones tratados con PBS y barras oscuras de ratones tratados con PSA.

#### 40 **Descripción detallada de la invención**

Los vehículos se describen en el presente documento que son adecuados para administrar un compuesto a una membrana mucosa.

Los términos "VME de tipo salvaje", "VME que contienen PSA" y "PSA-VME", se usan indistintamente en el presente documento.

45 El término "vehículo" en el sentido de la presente divulgación indica un medio en el que se administra un compuesto, y en el que el compuesto está comprendido, se expresa y/o se muestra. Los vehículos de ejemplo comprenden cualquiera de los diversos medios que actúan generalmente como disolventes, vehículos o aglutinantes para principios activos, con particular referencia a fármacos.

50 El término "administrar" y que administra" en referencia a un compuesto o sustancia en el sentido de la presente divulgación indica el paso del compuesto o sustancia desde una ubicación de origen a una ubicación de destino, y, en particular, a una ubicación formada por una o más células, tejidos u órganos de un individuo. En particular, un compuesto se administra en el sentido de la presente divulgación cuando el paso se realiza de modo que al menos una actividad asociada al compuesto administrado se pueda ejercer sobre una o más células, tejidos u órganos del individuo.

55 El término "compuesto" como se usa en el presente documento indica cualquier sustancia química que comprende

- 5 uno o más elementos químicos y comprende varias sustancias, moléculas o componentes que incluyen, entre otros, biomoléculas y, en particular, fármacos. El término "biomolécula", como se usa en el presente documento, indica un compuesto o componente de sustancia asociado a una actividad biológica que incluye, entre otros, azúcares, aminoácidos, proteínas de péptidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, polipéptidos, moléculas orgánicas, haptenos, epítomos, células biológicas, partes de células biológicas, vitaminas, hormonas y similares. El término "fármaco", tal como se usa en el presente documento, indica la sustancia que, cuando se absorbe en el cuerpo de un organismo vivo, altera la función corporal normal. En particular, los fármacos en el sentido de la presente divulgación incluyen una sustancia química utilizada en el tratamiento, la cura, la prevención o el diagnóstico de enfermedad o utilizado para mejorar el bienestar físico o mental.
- 10 Si el PSA es, por ejemplo, el "compuesto" anterior, también podrían administrarse compuestos diferentes adicionales, además de PSA, por la vesícula.
- 15 La expresión "membrana mucosa" en el sentido de la presente divulgación indica un revestimiento de origen principalmente endodérmico, cubierto de epitelio, que están involucrados en la absorción y secreción. En un individuo, las membranas mucosas recubren varias cavidades corporales que están expuestas al ambiente externo y a los órganos internos. Las membranas mucosas se encuentran en varios lugares continuos con la piel: en las fosas nasales, la boca, los labios, los párpados, las orejas, el área genital y el ano.
- En las composiciones y los procedimientos y sistemas relacionados descritos en el presente documento, el vehículo está formado por una vesícula que comprende uno o más compuestos que se van a administrar.
- 20 Una "vesícula" en el sentido de la presente divulgación es un complejo supramolecular formado por un lípido formador de membrana y moléculas adicionales ensambladas en un ambiente acuoso. En particular, en las vesículas descritas en el presente documento, los lípidos formadores de membrana están dispuestos en una capa lipídica que encierra un ambiente acuoso interno en el presente documento también indicado como citosol.
- 25 La expresión "lípido formador de membrana" o "lípido anfipático" como se usa en el presente documento indica un lípido que posee propiedades hidrófilas e hidrófobas que en un ambiente acuoso se ensamblan en una estructura de capa lipídica que consiste en una o dos capas opuestas de moléculas anfipáticas conocidas como lípidos polares. Cada lípido polar tiene un resto hidrófilo, es decir, un grupo polar tal como, un fosfato derivatizado o un grupo sacárido, y un resto hidrófobo, es decir, una cadena larga de hidrocarburo. Los lípidos polares de ejemplo incluyen fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos, lípidos de éter, esteroides y alquilfosfolípidos. Los lípidos anfipáticos incluyen, entre otros, lípidos de membrana, es decir, lípidos anfipáticos que son constituyentes de una membrana biológica, tales como fosfolípidos como dimirisoilfosfatidilcolina (DMPC) o dioleoilfosfoetanolamina (DOPE) o dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). La membrana de la vesícula está formada por una bicapa lipídica que simula una membrana plasmática (una membrana biológica que separa el interior de una célula del ambiente exterior y encierra un ambiente acuoso), es decir, la membrana externa de *B. fragilis*.
- 30
- 35 Las vesículas descritas en el presente documento también comprenden un lipopolisacárido (LPS) asociado con la membrana de la vesícula o que está comprendido en el ambiente acuoso de la vesícula. El término "lipopolisacárido" como se usa en el presente documento indica moléculas grandes que consisten en un lípido y un polisacárido unidos por un enlace covalente; se encuentran en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, actúan como endotoxinas y provocan respuestas inmunes fuertes en los animales. Las vesículas descritas en el presente documento comprenden uno o más LPS de *B. fragilis* que un experto puede identificar.
- 40 Las vesículas descritas en el presente documento también pueden comprender un peptidoglicano asociado con la membrana de la vesícula o comprendido en el ambiente acuoso de la vesícula. El término "peptidoglicano", como se usa en el presente documento, indica un polímero que consiste en azúcares y aminoácidos que forman una capa similar a una malla fuera de la membrana plasmática de las bacterias (Eubacteria, no Archaeobacteria), formando la pared celular. En particular, las vesículas descritas en el presente documento comprenden uno o más peptidoglicanos de *B. fragilis* que puede identificar un experto.
- 45
- Compuestos adicionales que pueden estar comprendidos en las vesículas comprenden proteínas de membrana, lípidos de membrana, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, y en particular, proteínas de membrana, lípidos de membrana, hidratos de carbono y ácidos nucleicos de *B. fragilis*.
- 50 Las vesículas de ejemplo en el sentido de la presente divulgación comprenden pequeños sacos encerrados en membranas que pueden almacenar o transportar sustancias. Las vesículas pueden formarse de modo natural debido a las propiedades de la membrana que forma el lípido o pueden prepararse a partir de membranas bacterianas. La mayoría de las vesículas tienen funciones especializadas dependiendo de los materiales que contienen en la membrana y/o el ambiente acuoso.
- 55 En una realización, las vesículas descritas en el presente documento están formadas por porciones de membranas de bacterias. En una realización, las vesículas están formadas por las vesículas de membrana externa (VME) de las bacterias.
- Las vesículas descritas en el presente documento están formadas por porciones de membranas de *B. fragilis*, a

saber, de la VME de *B. fragilis* como se ilustra en la sección de Ejemplos.

5 En una realización, el compuesto administrado puede ser un fármaco, un fármaco candidato, un suplemento (un producto tomado por vía oral que contiene uno o más ingredientes (como vitaminas o aminoácidos) que se pretende que complementen la dieta y no se consideran alimentos) o cualquier otro compuesto cuya administración a la membrana mucosa se desee. Uno o más de esos compuestos pueden incluirse en las vesículas descritas en el presente documento en una dosis adecuada que el experto en la materia puede determinar a la vista del compuesto específico que se va a administrar.

El compuesto comprende uno o más polisacáridos zwitteriónicos, a saber, el polisacárido A.

10 La expresión "polisacárido zwitteriónico" como se usa en el presente documento indica polímeros sintéticos o naturales que comprenden uno o más monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos, e incluyen al menos un resto cargado positivamente y al menos un resto cargado negativamente. Los polisacáridos zwitteriónicos incluyen, entre otros, polímeros de cualquier longitud, desde un polímero monosacárido o disacárido hasta polímeros que incluyen cientos o miles de monosacáridos. En algunas realizaciones, un polisacárido zwitteriónico puede incluir unidades de repetición en las que cada unidad de repetición incluye de dos a diez monosacáridos, un resto cargado positivamente (por ejemplo, un resto amino cargado positivamente libre) y un resto cargado negativamente (tal como sulfonato, sulfato, fosfato y fosfonato). En alguna realización, los PZ pueden tener un peso molecular comprendido entre 500 Da y 2.000.000 Da. En algunas realizaciones, los PZ pueden tener un peso molecular comprendido entre 200 y 2.500. Los ejemplos de PSZ incluyen, entre otros, PSA y PSB de *Bacteroides Fragilis*, CP5/CD8 de *Staphylococcus aureus* y Sp1/CP1 de *Streptococcus pneumoniae*. Los polisacáridos zwitteriónicos pueden aislarse de fuentes naturales y, en particular, de fuentes bacterianas, por ejemplo, mediante purificación. Los polisacáridos zwitteriónicos también pueden producirse por procedimientos químicos o bioquímicos, así como mediante tecnologías de microorganismos recombinantes, todas identificables por un experto. Por lo tanto, dichos procedimientos y tecnologías no se describirán más detalladamente en el presente documento.

25 La expresión "polisacárido A" (o PSA, o ligando de PSA), como se usa en el presente documento, indica una molécula producida por el locus de PSA de *Bacteroides fragilis* y sus derivados, que incluyen, entre otros, polímeros de la unidad de repetición  $\{\rightarrow 3\} \alpha\text{-d-AAT Galp (1} \rightarrow 4) - [\beta\text{-d-Galf (1} \rightarrow 3)] \alpha\text{-d-GalpNAc (1} \rightarrow 3) - [4,6\text{-piruvato}] \beta\text{-d-Galp (1} \rightarrow )$ , donde AATGal es acetamido-amino-2,4,6-tridesoxigalactosa y el residuo galactopiranosilo se modifica por un sustituyente piruvato que abarca 0-4 y 0-6. El término "derivado", como se usa en el presente documento con referencia a un primer polisacárido (por ejemplo, PSA), indica un segundo polisacárido que está relacionado estructuralmente con el primer polisacárido y se puede derivar del primer polisacárido mediante una modificación que introduce una característica que no está presente en el primer polisacárido al tiempo que retiene las propiedades funcionales del primer polisacárido. Por consiguiente, un polisacárido derivado de PSA, por lo general, difiere del polisacárido original por la modificación de las unidades de repetición o del componente sacárido de una o más de las unidades de repetición que pueden o no estar asociadas con una función adicional que no está presente en el polisacárido original. Un polisacárido derivado de PSA conserva, sin embargo, una o más actividades funcionales que se describen en el presente documento en relación con el PSA en asociación con la actividad antiinflamatoria del PSA.

En una realización, el PSA de bajo peso molecular (L-PSA) tiene de 70 kDa a 200 kDa y el PSA de alto peso molecular (H-PSA) está por encima de 200 kDa.

40 En una realización, la membrana mucosa es una membrana mucosa del tracto digestivo de un individuo, y, en particular, de la mucosa intestinal, la mucosa gástrica, la mucosa esofágica, la mucosa bucal, la mucosa oral y/o la mucosa bucal.

En una realización, las vesículas descritas en el presente documento se pueden usar en relación con procedimientos y aplicaciones como las descritas en la solicitud provisional de Estados Unidos S/N 61/321,527.

45 En una realización, las vesículas descritas en el presente documento se pueden usar en relación con procedimientos y sistemas como los descritos en el documento US 2010/0275282.

50 En una realización, las vesículas descritas en el presente documento se pueden usar en un procedimiento para administrar el compuesto a una membrana mucosa de un individuo. En particular, el procedimiento comprende poner en contacto una vesícula que comprende el compuesto con la membrana mucosa durante un tiempo y en condiciones para permitir el contacto de la sustancia con la membrana. En el procedimiento, la vesícula está formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso y el compuesto que se va a administrar está comprendido en el ambiente acuoso de la vesícula.

55 En otra realización, una composición o composición farmacéutica que comprende la vesícula o VME se pone en contacto con la membrana mucosa durante un tiempo y en condiciones que permitan el contacto de la sustancia con la membrana.

El término "contactar" o "incubar" como se usa en el presente documento indica acciones dirigidas a la creación de una relación espacial entre dos elementos proporcionados durante un tiempo y en condiciones tales que se pueda

- 5 ejercer al menos una de las acciones recíprocas o no recíprocas o influencia entre los dos elementos. En particular, la incubación se puede realizar entre una vesícula y una membrana mucosa y puede dar lugar a un contacto directo y/o interacción entre la vesícula y la membrana mucosa o puede dar lugar a una modificación de la membrana mucosa después de una acción indirecta de la vesícula (por ejemplo, tras la activación o modificación de otra sustancia que interactúa directamente con la membrana).
- Las condiciones adecuadas para realizar el contacto o la incubación son identificables por un experto en la lectura de la presente divulgación en vista del compuesto, la membrana mucosa y el diseño experimental.
- 10 En una realización, las vesículas descritas en el presente documento pueden estar comprendidas en una composición para administrar un compuesto a una membrana mucosa. La composición comprende una o más vesículas descritas en el presente documento opcionalmente en combinación con un vehículo adicional que actúa como disolvente, vehículo, aglutinante o diluyentes para las vesículas.
- 15 El término "afección", cuando se refiere al estado de un animal o un ser humano, como se usa en el presente documento, indica generalmente el estado físico del cuerpo de un individuo, en conjunto o de una o más de sus partes, que no se ajuste a un estado físico del individuo, en conjunto o de una o más de sus partes, que se asocia con un estado de físico completo, bienestar mental y posiblemente social. Las afecciones descritas en el presente documento incluyen, entre otras, trastornos y enfermedades en las que el término "trastorno" indica una afección del individuo vivo que está asociada a una anomalía funcional del cuerpo o de cualquiera de sus partes, y el término "enfermedad" indica una afección del individuo vivo que perjudica el funcionamiento normal del cuerpo o de cualquiera de sus partes y se manifiesta típicamente por signos y síntomas distintivos. Las afecciones de ejemplo 20 incluyen, entre otras, lesiones, discapacidades, trastornos (incluyendo trastornos mentales y físicos), síndromes, infecciones, comportamientos desviados del individuo y variaciones atípicas de la estructura y funciones del cuerpo de un individuo o partes del mismo.
- 25 En particular, en realizaciones en las que el compuesto se usa como un compuesto antiinflamatorio, la afección puede ser cualquier afección asociada a una inflamación o respuesta inflamatoria; o una afección descrita como una enfermedad inflamatoria en sí misma. La expresión "asociado a" como se usa en el presente documento con referencia a dos elementos indica una relación entre los dos elementos, de manera que la aparición de un primer elemento se acompaña de la aparición del segundo elemento, que incluye, pero sin limitaciones, a una relación causa-efecto y una relación enfermedad-signo/síntomas.
- 30 Las afecciones asociadas con una inflamación (o enfermedades inflamatorias) en los seres humanos incluyen, aunque sin limitaciones, enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo, pero sin limitaciones, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple (EM) y psoriasis. Un experto en la materia podría identificar a tales sujetos que padecen las enfermedades mencionadas anteriormente utilizando los criterios clínicos apropiados.
- 35 En una realización, las composiciones, la composición farmacéutica que comprende VME que contienen PSA se pueden usar para la prevención de enfermedades inflamatorias, tales como, pero sin limitaciones, enfermedades inflamatorias intestinales (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple y psoriasis.
- 40 El término "tratamiento" o "tratado" como se usa en el presente documento indica cualquier actividad, ya sea parte de una atención médica, o no, o trata una afección médica o quirúrgicamente en animales o seres humanos. Tales tratamientos pueden ser administrados por personal médico o no médico.
- 45 En algunas realizaciones, cuando la composición se administre a un individuo, la composición puede ser una composición farmacéutica, y comprende una o más vesículas que comprenden cada una PSA. En una realización más particular, la composición farmacéutica puede comprender una o más vesículas, cada una de las cuales comprende PSA y uno o más de otro compuesto, y/o un transportador/vehículo farmacéuticamente aceptable o apropiado.
- En otra realización, la composición farmacéutica anterior, que comprende una o más vesículas, cada una de las cuales comprende PSA y uno o más de otro compuesto, y/o un transportador/vehículo farmacéuticamente aceptable o apropiado, en la que un individuo/sujeto con una afección inflamatoria o inflamación dada esta composición muestra una mejora.
- 50 En algunas realizaciones, las vesículas descritas en el presente documento pueden incluirse en composiciones farmacéuticas junto con un excipiente o diluyente. En particular, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen vesículas descritas en el presente documento en combinación con uno o más vehículos compatibles y farmacéuticamente aceptables, y, en particular, con diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 55 El término "excipiente" como se usa en el presente documento indica una sustancia inactiva usada como un transportador farmacéuticamente aceptable o apropiado para los principios activos de un medicamento. Los excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen cualquier

5 sustancia que mejore la capacidad del cuerpo de un individuo para absorber las vesículas descritas en el presente documento. Los excipientes adecuados también incluyen cualquier sustancia que pueda usarse para aumentar las formulaciones con vesículas descritas en el presente documento para permitir una dosificación conveniente y precisa. Además de su uso en la cantidad de dosis única, los excipientes se pueden usar en el procedimiento de fabricación para ayudar en la manipulación de las vesículas descritas en el presente documento. Dependiendo de la vía de administración y la forma de medicación, se pueden usar diferentes excipientes. Los excipientes de ejemplo incluyen, entre otros, antiadherentes, aglutinantes, disgregantes de recubrimientos, cargas, sabores (tales como edulcorantes) y colores, sustancias de deslizamiento, lubricantes, conservantes, sorbentes.

10 Los transportadores farmacéuticamente aceptables o apropiados pueden ser, pero sin limitaciones, excipientes orgánicos o inorgánicos, sólidos o líquidos adecuados para el modo de aplicación seleccionado, tal como aplicación oral o inyección, y se administran en forma de una preparación farmacéutica convencional. Tal preparación incluye sólidos tales como comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, y líquidos tales como solución, emulsión, suspensión y similares. Dicho transportador incluye almidón, lactosa, glucosa, sacarosa, dextrina, celulosa, parafina, glicérido de ácido graso, agua, alcohol, goma arábiga y similares. Si es necesario, se pueden añadir adyuvantes, estabilizantes, emulsionantes, lubricantes, aglutinantes, controladores para ajustar el pH, agentes isotónicos y otros aditivos convencionales.

15 El transportador farmacéuticamente aceptable o apropiado puede incluir otros compuestos que se sabe que son beneficiosos para una situación deteriorada del intestino, (por ejemplo, antioxidantes, tales como vitamina C, vitamina E, selenio o cinc); o una composición alimentaria. La composición alimentaria puede ser, aunque sin limitaciones, leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, helados, productos a base de cereales fermentados, polvos a base de leche, fórmulas infantiles, comprimidos, suspensiones bacterianas líquidas, suplemento oral seco o suplemento oral húmedo.

20 El término "diluyente", como se usa en el presente documento, indica un agente diluyente que se emite para diluir o transportar un principio activo de una composición. El diluyente adecuado incluye cualquier sustancia que pueda disminuir la viscosidad de una preparación medicinal.

25 En determinadas realizaciones, las composiciones, compuestos y, en particular, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración enteral, incluidas, pero sin limitaciones, i) por boca (oral) en forma de comprimidos, cápsulas o gotas; ii) por sonda de alimentación gástrica, sonda de alimentación duodenal o gastrostomía; y nutrición enteral; y iii) por vía rectal como supositorio.

30 En algunas realizaciones, las vesículas descritas en el presente documento que comprenden PSA se pueden usar en un procedimiento para tratar o prevenir una afección en un individuo.

35 El procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la composición o composición farmacéutica. El término "individuo", tal como se usa en el presente documento, incluye un único organismo biológico en el que puede producirse una inflamación, incluyendo, aunque sin limitaciones, animales y, en particular, animales superiores y, en particular, vertebrados tales como mamíferos y en particular seres humanos.

40 La "cantidad eficaz", "cantidad efectiva para" o "cantidad de X eficaz para" se refiere a una cantidad del compuesto, composición o composición farmacéutica que sea eficaz para tratar, aliviar, reducir o mejorar hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la enfermedad que necesitan tratamiento, o retrasar la iniciación de marcadores clínicos o síntomas de una enfermedad que necesita prevención, cuando se administra el compuesto. Por lo tanto, por ejemplo, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad del compuesto/composición/ingrediente farmacéutico que exhibe los efectos "mejorados", como se indica a continuación.

45 La "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente experimentando con los compuestos en cuestión en sistemas de modelos conocidos *in vivo* e *in vitro* para una enfermedad que necesita tratamiento. Una cantidad eficaz variará según el peso, el sexo, la edad y el historial médico del individuo, así como la gravedad de la o las afecciones del paciente, el tipo de enfermedad o enfermedades, el modo de administración y similares. Una cantidad eficaz puede determinarse fácilmente mediante experimentación de rutina, por ejemplo, mediante titulación (administración de dosis crecientes hasta que se encuentre una dosis eficaz) y/o por referencia a cantidades que fueron eficaces para pacientes anteriores. En general, la cantidad eficaz de la presente invención se administrará a dosis que oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente.

50 Como se utiliza en el presente documento, la frase "cantidad profilácticamente eficaz" incluye la cantidad del compuesto/composición/composición farmacéutica que es suficiente para dar como resultado la prevención o reducción del desarrollo, recurrencia o aparición de uno o más síntomas asociados con un trastorno (o para potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos de otra terapia (por ejemplo, otro agente profiláctico).

55 Se contempla además que el compuesto/composición/composición farmacéutica de la presente invención se puede usar con uno o más medicamentos conocidos que se sabe que son útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias, ya sea por separado o en combinación.

Por ejemplo, el compuesto/composición/composición farmacéutica de la presente invención se puede combinar con

5 uno o una combinación de medicamentos/tratamientos que se sabe que son útiles en el tratamiento de la EII, tales como, pero sin limitaciones, sulfasalazina (Azulfadine), mesalamina (Asacol, Pentasa), inmunosupresores (Imuran, 6-MP, ciclosporina); metotrexato, inhibidores del TNF-alfa (Remicade y Humira); y corticosteroides (Entocort y prednisona). Otros tratamientos (experimentales) para la colitis ulcerosa, incluyen aloe vera, butirato, boswellia, probióticos, antibióticos, terapia inmunosupresora y nicotina.

10 Por ejemplo, el compuesto/composición/composición farmacéutica de la presente invención se puede combinar con uno o una combinación de medicamentos/tratamientos que se sabe que son útiles en el tratamiento de la EM, tal como, pero sin limitaciones, Avonex®, Betaseron® y Copaxone®. Rebif®; Extavia® Novantrone® (mitoxantrona); Tysabri® (natalizumab) y Gilenya® (fingolimod). Otros fármacos incluyen la terapia de inmunoglobulina intravenosa (IVIg), metotrexato, azatioprina (Imuran®) y ciclofosfamida (Cytoxan®); corticoesteroides; cytoxan® (ciclofosfamida); Imuran® (azatioprina); metotrexato; intercambio de plasma; pulso de solu-medrol® (metilprednisolona IV); prednisona; Decadron® (dexametasona); Medrol® (metilprednisolona oral); plasmaféresis (intercambio de plasma); terapia de inmunoglobulina intravenosa (IgIV).

15 En otra realización, es posible que estos otros medicamentos puedan expresarse o administrarse dentro de las propias VME.

20 Como se utiliza en el presente documento, "mejorado/a", "mejora", y otras variantes gramaticales, incluyen cualquier cambio beneficioso en el individuo/sujeto que resulte de un tratamiento. Un cambio beneficioso es cualquier forma en que el estado del paciente sea mejor de lo que hubiera sido en ausencia del tratamiento. "Mejorado/a" incluye, aunque sin limitaciones, prevención de una afección no deseada, ralentización de la velocidad a la que empeora una afección, retraso del desarrollo de una afección no deseada, restauración a una condición esencialmente normal; hacer que el paciente entre en remisión con más frecuencia o permanezca en remisión durante períodos más prolongados que sin tratamiento (es decir, cuando el grado de inflamación en el paciente es menor (o está ausente); o la persona normalmente está sin síntomas); reducción en el número y/o gravedad de las recaídas; y reducción del desarrollo de nuevas áreas de inflamación, como se ve en las imágenes de resonancia magnética (IRM).

25 De manera más particular, la mejora en la EII abarca una reducción en la gravedad o la duración de uno o más síntomas clínicos de la EII, tales como, pero sin limitaciones, calambres abdominales y dolor; heces con sangre; diarrea; urgencia por movimientos intestinales; fiebre; pérdida de apetito; pérdida de peso; mucosidad en las heces; ulceración del intestino grueso; y anemia (por pérdida de sangre). Por ejemplo, la mejora en la EM abarca una reducción en la gravedad o la duración de uno o más síntomas clínicos de EM, tales como, pero sin limitaciones, fatiga; trastornos visuales; entumecimiento; mareos/vértigo; disfunción vesical e intestinal; debilidad; temblor; movilidad alterada; disfunción sexual; habla confusa; espasticidad (rigidez de la pierna); trastornos de la deglución; dolor crónico; depresión; dificultades cognitivas y de memoria leves

35 Además, "mejorado/a", "mejora", y otras variantes gramaticales incluyen cualquier cambio que resulte en la reducción de la gravedad, la duración y/o el riesgo de desarrollar complicaciones de la enfermedad inflamatoria. Para la EII, "mejorado/a" podría significar, por ejemplo, un riesgo reducido de que el sujeto con EII desarrolle hemorragia profusa de las úlceras; perforación (rotura) del intestino; estenosis y obstrucción; fístulas (pasaje anormal) y enfermedad perianal; megacolon tóxico (dilatación aguda no obstructiva del colon); y neoplasia maligna (por ejemplo, cáncer de colon).

40 En una realización, al menos dos de los lípidos formadores de membrana, vesículas, PSA y uno o más compuestos adicionales para administrar pueden estar comprendidos en un sistema posiblemente junto con otros reactivos adecuados para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

45 Los sistemas se pueden proporcionar en forma de kits de piezas. En un kit de piezas, los lípidos formadores de membrana, vesículas, PSA, compuestos de adición, medicamentos y otros reactivos pueden incluirse en una o más composiciones, o cada lípido, vesículas, PSA, compuestos de adición, los medicamentos compuestos y reactivos pueden estar en una composición junto con un vehículo adecuado.

Los componentes adicionales pueden incluir moléculas marcadas y, en particular, agentes de captura marcados específicos para un biomarcador antiinflamatorio o inflamatorio o una molécula asociada a su expresión, un chip microfluído, patrones de referencia y componentes adicionales identificables por un experto al leer la presente divulgación.

50 La expresión "agente de captura" como se usa en el presente documento indica un compuesto que se puede unir específicamente a un objetivo. La expresión "específica" "específicamente" o "especificidad" como se usa en el presente documento con referencia a la unión de una primera molécula a una segunda molécula se refiere al reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre la primera molécula y la segunda molécula, junto con sustancialmente menos o ningún reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre cada una de la primera molécula y la segunda molécula con otras moléculas que puedan estar presentes. Los enlaces específicos de ejemplo son interacción anticuerpo-antígeno, interacciones celulares receptor-ligando, hibridación de polinucleótidos, interacciones enzima-sustrato, etc. Por "complejo estable" se entiende un complejo que es detectable y no requiere ningún nivel arbitrario de estabilidad, aunque generalmente se prefiere mayor estabilidad.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender polinucleótidos marcados o anticuerpos marcados.

Los componentes del kit pueden proporcionarse con las instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar los procedimientos descritos en el presente documento. El kit normalmente contendrá las composiciones en recipientes separados. Las instrucciones, por ejemplo, instrucciones escritas o de audio, en papel o soporte electrónico, tales como cintas o CD-ROM, para la realización del ensayo, habitualmente se incluirán en el kit. El kit también puede contener, dependiendo del procedimiento particular utilizado, otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares).

El término "inmunomodulador" como se usa en el presente documento indica la capacidad de estimular un estado asociado con la ausencia de una respuesta inflamatoria. Las propiedades inmunomoduladoras particulares comprenden propiedades antiinflamatorias, en las que el término antiinflamatorio se refiere a la propiedad de una sustancia o tratamiento que previene o reduce la inflamación.

El término "inflamación", "estado inflamatorio" o "respuesta inflamatoria" como se usa en el presente documento indican la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares de un individuo a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes, e incluye la secreción de citocinas y, más particularmente, de citocinas proinflamatorias, es decir, las citocinas que son producidas predominantemente por células inmunes activadas, tales como la microglía, y están involucradas en la amplificación de las reacciones inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias de ejemplo incluyen, pero sin limitaciones, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL21 e IL23. Las inflamaciones de ejemplo incluyen inflamación aguda e inflamación crónica. La expresión "inflamación aguda", como se usa en el presente documento, indica un procedimiento a corto plazo caracterizado por los signos clásicos de inflamación (hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función) debido a la infiltración de los tejidos por plasma y leucocitos. Una inflamación aguda normalmente se produce siempre que el estímulo perjudicial esté presente y cese una vez que se haya eliminado el estímulo, degradado o envuelto por la cicatrización (fibrosis). La expresión "inflamación crónica", como se usa en el presente documento, indica una afección caracterizada por una inflamación activa concurrente, destrucción de tejidos e intentos de reparación. La inflamación crónica no se caracteriza por los signos clásicos de inflamación aguda mencionados anteriormente. En cambio, el tejido inflamado crónicamente se caracteriza por la infiltración de células inmunitarias mononucleares (monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), destrucción de tejidos e intentos de cicatrización, incluyendo angiogénesis y fibrosis.

El término "sustancia", como se usa en el presente documento, indica una cuestión de constitución química particular o definida. La expresión "sustancia bacteriana" indica materia de origen bacteriano tal como, una bacteria viva, bacterias muertas y, en particular, bacterias muertas por calor, extractos bacterianos, moléculas purificadas de bacterias, una combinación de moléculas purificadas de bacterias, o vesículas que contienen una molécula o una combinación de moléculas purificadas de bacterias o vesículas purificadas de bacterias. En particular, la sustancia bacteriana puede estar formada por, o comprende, las vesículas de membrana externa (VME), que son vesículas distribuidas desde la superficie de las bacterias y distribuyen un conjunto de carga molecular a células diana distantes. Aún más particularmente, la sustancia bacteriana puede estar formada por, o comprende, las VME de *B. Fragilis*, y, más particularmente, dichas VME están además compuestas por PSA.

La sustancia bacteriana comprende una sustancia derivada de las mismas bacteria y sustancias derivadas de dos o más bacterias diferentes.

El término "bacteria", como se usa en el presente documento, indica un gran grupo de microorganismos unicelulares procariotas, por lo general, de unos pocos micrómetros de longitud y con una amplia gama de formas. En particular, las bacterias en el sentido de la presente divulgación comprenden bacterias de la flora humana, es decir, el ensamblaje de microorganismos que residen en la superficie y en tejidos humanos y fluidos corporales, tales como capas profundas de la piel, en la saliva, la mucosa oral o vaginal, y en el tracto gastrointestinal. La flora bacteriana comprende flora intestinal (bacterias detectables en el tracto digestivo de seres humanos), flora vaginal (bacterias detectables en el tracto tubular fibromuscular que va desde el útero al exterior del cuerpo en seres humanos) y flora de la piel (bacterias detectables en la piel humana). De manera más específica, las bacterias en el sentido de la presente divulgación pueden estar formadas por uno o más bacteroides de la flora intestinal y, en particular, uno o más bacteroides, un género de bacterias bacilos gramnegativas, anaerobias no formadoras de endosporas, simbióticas con seres humanos e identificables por un experto. Un bacteroides representativo es *B. fragilis*.

La expresión "animal no humano marcador transgénico" como se usa en el presente documento, se refiere a un animal que contiene material genético no nativo que se ha transferido de forma natural o mediante una serie de técnicas de ingeniería genética. Tal material genético no nativo (o transgén) puede actuar como "biomarcador" (como se define en el presente documento) y/o retener la capacidad de producir ARN o proteína en el animal no humano.

El término "célula T" como se usa en el presente documento indica un subgrupo de linfocitos (un tipo de glóbulo blanco o leucocito) que incluye diferentes tipos de células identificables por un experto. los linfocitos T auxiliares de acuerdo con la presente divulgación e incluyen linfocitos T<sub>h</sub> efectores (tales como Th1, Th2 y Th17), es decir, linfocitos Th que secretan citocinas, proteínas o péptidos que estimulan o interactúan con otros leucocitos, incluidos los linfocitos T<sub>h</sub> y los linfocitos Th supresores (como los Treg), es decir, los linfocitos Th que suprimen la

activación del sistema inmunitario y, por lo tanto, mantienen la homeostasis del sistema inmunitario y la tolerancia a los antígenos propios.

5 La expresión "célula presentadora de antígeno" como se usa en el presente documento indica una célula que muestra un complejo de antígeno extraño con un complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en su superficie. En particular, las células presentadoras de antígeno comprenden células dendríticas, macrófagos, células B y células adicionales identificables por un experto.

10 El término "contactar" o "incubar" como se usa en el presente documento indica acciones dirigidas a la creación de una relación espacial entre dos elementos proporcionados durante un tiempo y en condiciones tales que se pueda ejercer al menos una de las acciones recíprocas o no recíprocas o influencia entre los dos elementos. En particular, la incubación se puede realizar entre una sustancia bacteriana y una célula y puede resultar en un contacto directo y/o interacción entre la sustancia bacteriana y la célula o puede resultar en una modificación de la célula después de una acción indirecta de la sustancia bacteriana (por ejemplo, después de la activación). o modificación de otra sustancia que interacciona directamente con la célula).

15 El "tratamiento" se puede realizar administrando la sustancia bacteriana, el compuesto, la composición o la composición farmacéutica mediante administración tópica o sistémica. La administración sistémica incluye la administración enteral (por ejemplo, administración oral, administración por sonda de alimentación gástrica, administración por sonda de alimentación duodenal, gastrostomía, nutrición enteral y administración rectal) y administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intraperitoneal e infusión intravesical. La administración tópica incluye, pero sin limitaciones, administración epicutánea, administración por inhalación (por ejemplo, en medicamentos para el asma), enema, gotas para los ojos (por ejemplo, en la conjuntiva), gotas para el oído, vía intranasal (por ejemplo, aerosoles nasales descongestivos) y administración vaginal.

20 De forma similar, la cantidad de composición farmacéutica administrada a individuos que padecen una enfermedad inflamatoria tal como, pero sin limitaciones, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, asma, dermatitis, artritis, miastenia gravis, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, o psoriasis, puede determinarla el experto experimentalmente.

25 La incubación de ejemplo de una célula presentadora de antígeno con un linfocito T se puede realizar *in vitro* mezclando un cultivo celular que comprende la célula presentadora de antígeno con un cultivo celular que comprende el linfocito T, añadiendo una célula presentadora de antígeno purificada a un cultivo de linfocitos T, o añadiendo un linfocito T purificado a un cultivo de células presentadoras de antígeno. Una incubación de ejemplo adicional entre un linfocito T y una célula presentadora de antígeno *in vivo* comprende trasplantar la célula presentadora de antígeno aun tejido de un individuo, comprendiendo el tejido linfocitos T, o trasplantar linfocitos T aun tejido de un individuo, comprendiendo el tejido células presentadoras de antígeno. En una realización, el individuo es un animal transgénico distinto de seres humanos genéticamente modificados para expresar un biomarcador inflamatorio o antiinflamatorio marcado.

30 Un experto puede identificar procedimientos y técnicas adicionales adecuados para realizar el contacto entre una sustancia y un linfocito T o célula presentadora de antígeno y la incubación entre una célula presentadora de antígeno y un linfocito T *in vitro* o *in vivo* tras la lectura de la presente divulgación.

35 En los procedimientos y sistemas descritos en el presente documento, la detección de la expresión de un biomarcador inflamatorio o antiinflamatorio se puede realizar *in vitro* e *in vivo* mediante técnicas identificables por un experto que comprenden el uso de moléculas marcadas, incluyendo biomarcadores marcados o moléculas marcadas específicas para el biomarcador o molécula asociada a ellos.

40 El término "detectar" o "detección" como se usa en el presente documento indica la determinación de la existencia, presencia o hecho de un analito o señal relacionada en una porción limitada de espacio, incluyendo, pero sin limitaciones, una muestra, una mezcla de reacción, un complejo molecular y un sustrato. Una detección es "cuantitativa" cuando se refiere, se relaciona o implica la medición de la cantidad o el monto del analito o señal relacionada (también denominada cuantificación), que incluye, pero sin limitaciones, cualquier análisis diseñado para determinar las cantidades o proporciones del analito o la señal relacionada. Una detección es "cualitativa" cuando se refiere, se relaciona o implica la identificación de una calidad o tipo de analito o señal relacionada en términos de abundancia relativa respecto a otro analito o señal relacionada, que no está cuantificado.

45 Los términos "marcador" y "molécula marcada" o, como se usan en el presente documento como un componente de un complejo o molécula en referencia a una molécula capaz de detección, incluyendo, pero sin limitaciones, isótopos radiactivos, fluoróforos, colorantes quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, colorantes, iones metálicos, nanopartículas, soles metálicos, ligandos (tales como biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término "fluoróforo" se refiere a una sustancia o porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en una imagen detectable. Como consecuencia, la palabra "señal" o "señal de marcaje" como se usa en el presente documento indica la señal emitida por el marcador que permite la detección del marcador, incluyendo, pero sin limitaciones, radiactividad, fluorescencia,

quimioluminiscencia, producción de un compuesto en el resultado de una reacción enzimática y similares.

La detección se puede realizar detectando los niveles de expresión del biomarcador, un precursor o análogo del mismo, y/o de un analito asociado al mismo. La expresión "asociado a" como se usa en el presente documento con referencia a dos elementos indica una relación entre los dos elementos, de manera que la aparición de un primer elemento se acompaña de la aparición del segundo elemento, que incluye, pero sin limitaciones, a una relación causa-efecto y una relación enfermedad-signo/síntomas. En particular, la detección se puede realizar de forma cualitativa o cuantitativa y puede implicar la detección de moléculas tales como ARN, proteína, sus precursores, diferentes tipos (es decir, ARNm, ARNt y ARNr) y/o productos de degradación, y/o detección o propiedades medibles asociadas a los mismos. Las técnicas y procedimientos para realizar la detección son identificables por un experto tras la lectura de la presente divulgación.

Los procedimientos de ejemplo para la detección de la expresión de biomarcadores comprenden procedimientos conocidos por un experto que incluyen, entre otros, ELISA, Q-PCR y tinción intracelular de citocinas detectada por FACS. En algunas realizaciones, la expresión de un biomarcador puede detectarse mediante lecturas basadas en fluorescencia en un cultivo celular realizado utilizando un anticuerpo específico para el biomarcador o molécula asociada al mismo, marcado con fluoróforo, que incluye, pero no exhaustivamente, colorantes moleculares pequeños, cromóforos de proteínas, puntos cuánticos y nanopartículas de oro. En una realización, la expresión de un biomarcador puede detectarse detectando la expresión de un marcador bajo el control transcripcional de un promotor de biomarcador *in vivo* (por ejemplo, en un tejido animal) o *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo celular). En algunas de esas realizaciones, el biomarcador puede ser, en particular, IL-10 o Foxp3. Las técnicas adicionales son identificables por un experto en la materia al leer la presente divulgación y no se analizarán adicionalmente con detalle.

En los procedimientos y sistemas descritos en el presente documento, se puede determinar una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata mediante la detección de un aumento de la expresión de uno o más biomarcadores antiinflamatorios o una disminución de la expresión de uno o más biomarcadores inflamatorios después del contacto y/o la incubación. La determinación del aumento y/o la disminución de la expresión de un biomarcador se puede realizar comparando la expresión detectada del biomarcador después del contacto y/o la incubación, con una expresión detectada predeterminada del mismo biomarcador en ausencia de contacto y/o incubación. La determinación del aumento y/o disminución de la expresión de un biomarcador puede realizarse comparando el marcador de expresión detectado con la expresión detectada del mismo biomarcador en una célula de control en ausencia de contacto y/o incubación.

Se hace referencia a la sección de Ejemplos en la que aumenta la expresión de los biomarcadores antiinflamatorios IL-10, Foxp3, TGFβ1, TGFβ2, perforina y la granzima B y la disminución de la expresión en los biomarcadores inflamatorios TNF-α y IL-17A están asociados con el mecanismo de acción de *Bacteroides fragilis* que apoya la asociación entre el patrón de expresión anterior y las actividades biológicas de *Bacteroides fragilis*, con particular referencia a las habilidades antiinflamatorias. Las habilidades antiinflamatorias de *Bacteroides fragilis* son identificables por un experto y se describen en varias publicaciones y patentes, incluidos, pero sin limitaciones, los documentos US05679654, US07083777, US2004092433, WO07092451 y WO2009062132, Un experto entenderá que la capacidad antiinflamatoria específica de la sustancia bacteriana candidata posiblemente se determinará basándose en la determinación adicional del conjunto específico de citocinas producidas y las células activadas por la sustancia bacteriana candidata identificada por los procedimientos descritos en el presente documento.

En una realización, la detección de un aumento en la expresión del antiinflamatorio o la detección de una disminución en la expresión de un biomarcador inflamatorio indica la capacidad de una sustancia para inducir moléculas antiinflamatorias, tales como IL-10, Foxp3, TGFβ1 o TGF-β2, perforina y granzima B o una combinación de las mismas, o suprimir citocinas inflamatorias, tales como IFNγ, IFNα, IFNα, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 o TNFα o una combinación de los mismos.

En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una sustancia bacteriana candidata *in vitro* y/o *in vivo* con un linfocito T solo o en presencia de una célula presentadora de antígeno, y detectar la expresión de al menos un biomarcador antiinflamatorio seleccionado del grupo que consiste en IL-10, Foxp3, TGFβ1, TGFβ2, perforina y granzima B, en el que un aumento de la expresión del biomarcador antiinflamatorio después del contacto indica una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata. En particular, en algunas de esas realizaciones, la expresión de IL-10, TGFβ1, TGFβ2 perforina y/o granzima B se pueden realizar en linfocitos T que expresan Foxp3, y, más particularmente, en linfocitos Treg que expresan Foxp3.

En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una sustancia bacteriana candidata con una célula presentadora de antígeno, e incubar la célula presentadora de antígeno con un linfocito T después de la puesta en contacto. El procedimiento comprende además detectar la expresión de al menos un biomarcador antiinflamatorio seleccionado del grupo que consiste en Foxp3, IL-10, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ2, perforina y granzima B, en el que la detección de un aumento de la expresión del biomarcador después de la incubación indica una capacidad antiinflamatoria de la sustancia candidata. En particular, en algunas de esas realizaciones, la expresión de IL-10, perforina y/o granzima B se pueden realizar en linfocitos T que expresan Foxp3, y, más particularmente, en linfocitos Treg que expresan Foxp3.

5 En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una sustancia bacteriana candidata con un linfocito T solo o en presencia de una célula presentadora de antígeno, y detectar la expresión de al menos un biomarcador inflamatorio seleccionado del grupo que consiste en IL-17 y TNF $\alpha$ , en el que una disminución de la expresión del biomarcador antiinflamatorio después del contacto indica una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata.

10 En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una sustancia bacteriana candidata con una célula presentadora de antígeno, e incubar la célula presentadora de antígeno con un linfocito T después de la puesta en contacto. El procedimiento comprende además detectar la expresión de al menos un biomarcador inflamatorio seleccionado del grupo que consiste en IL-17 y TNF $\alpha$ , en el que una disminución de la expresión del biomarcador antiinflamatorio después del contacto indica una capacidad antiinflamatoria de la sustancia bacteriana candidata.

15 En una realización, la sustancia bacteriana candidata comprende bacterias en un grupo puro. En otras realizaciones, la sustancia bacteriana candidata comprende bacterias en un grupo mixto. Las bacterias pueden ser bacterias vivas, bacterias muertas, extractos o productos aislados de bacterias, o combinaciones de cada uno. Las bacterias también pueden ser de cepas de laboratorio, aislados de depósitos, tales como la ATCC, aislados de animales, aislados de seres humanos, o combinaciones de cada uno.

20 En una realización, el aislado de los animales se aísla de heces. El aislado también puede provenir de contenidos intestinales o combinaciones de heces y otros contenidos intestinales. En una realización, el aislado de seres humanos se aísla de heces. El aislado también puede provenir de contenidos intestinales o combinaciones de heces y otros contenidos intestinales.

25 En una realización, el procedimiento comprende tratar un marcador transgénico de un animal no humano y, en particular, un mamífero marcador transgénico, tal como un ratón o una rata, con una sustancia candidata, el animal marcador transgénico no humano modificado genéticamente para expresar un biomarcador antiinflamatorio o inflamatorio marcado seleccionado del grupo que consiste en IL-10 y Foxp3, pero también perforina y granzima B, IL17 y TNF $\alpha$ ; y detectar la expresión de biomarcadores en el animal marcador transgénico después del tratamiento.

30 En particular, en una realización, los modelos animales no humanos transgénicos mencionados anteriormente pueden tratarse por vía oral o intravenosa con la sustancia, o colonizarse permanentemente con bacterias vivas por sonda oral y la cantidad de expresión del biomarcador Foxp3 o IL-10 se controlará en los diversos compartimentos del ratón incluyendo el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos, el intestino delgado y grueso, los pulmones, el páncreas y la médula ósea como medida de la capacidad inmunomoduladora de la sustancia.

35 En una realización, las células dendríticas, los linfocitos T, los linfocitos T reguladores, los linfocitos B o los macrófagos pueden purificarse o diferenciarse de ratones en los que la expresión de IL-10 (o Foxp3 en el caso de análisis de linfocitos T) está marcada por la proteína fluorescente verde fluorófora (GFP). En esas realizaciones, la sustancia bacteriana candidata se pone en contacto con uno de los tipos de células mencionados anteriormente y la cantidad de expresión de GFP se determinará indicando la capacidad inmunomoduladora de la sustancia que se está analizando. Como alternativa, las células dendríticas u otras células presentadoras de antígenos pueden incubarse con la sustancia, la sustancia se puede eliminar mediante lavado y las células dendríticas se pueden incubarse posteriormente con linfocitos T para determinar la capacidad de las células dendríticas para provocar actividad inmunomoduladora de los linfocitos T. La expresión de GFP se puede determinar utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o un lector de microplacas.

45 En una realización, un linfocito T, célula presentadora de antígeno y reactivos para la detección de al menos uno de uno o más biomarcadores antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IL-10, Foxp3, TGF $\beta$ 2, perforina y granzima B, y uno o más biomarcadores inflamatorios marcados seleccionados del grupo que consiste en IL-17 y TNF $\alpha$ , puede estar comprendido en un sistema para identificar una sustancia bacteriana que tiene capacidad inmunomoduladora de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

En una realización, el sistema comprende: células dendríticas, linfocitos T, linfocitos T reguladores, linfocitos B y/o macrófagos que, en algunas realizaciones, se pueden purificar o diferenciar de ratones en los que la expresión de IL-10 (o Foxp3 en el caso de análisis de linfocitos T) está marcada por la proteína fluorescente verde fluorófora (GFP).

50 Los sistemas se pueden proporcionar en forma de kits de piezas. En un kit de piezas, el agente de captura multi-ligando y otros reactivos para realizar el procedimiento pueden incluirse en el kit de forma independiente. La célula presentadora de antígeno, el linfocito T y los reactivos pueden incluirse en una o más composiciones, y cada célula y reactivo pueden estar en una composición junto con un vehículo adecuado.

55 Los componentes adicionales pueden incluir moléculas marcadas y, en particular, agentes de captura marcados específicos para un biomarcador antiinflamatorio o inflamatorio o una molécula asociada a su expresión, un chip microfluidado, patrones de referencia y componentes adicionales identificables por un experto al leer la presente divulgación.

Un experto en la técnica puede identificar más detalles sobre la identificación del agente transportador o agente

auxiliar adecuado de las composiciones y, en general, sobre la fabricación y el embalaje del kit a la luz de la lectura de la presente divulgación.

### Ejemplos

5 Las vesículas, composiciones y procedimientos y sistemas relacionados descritos en el presente documento se ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes.

En particular, los siguientes ejemplos ilustran ejemplos de cultivos celulares, procedimientos para poner en contacto con las VME que comprenden PSA (o ligando de PSA) con células y la detección de la expresión de un biomarcador. Un experto en la técnica apreciará la aplicabilidad de las características descritas con detalle para las VME y el PSA y *Bacteroides fragilis* para vesículas adicionales y la administración de sustancias además de PSA en las VME u otras vesículas de acuerdo con la presente divulgación.

Se usaron los siguientes materiales y procedimientos para todos los procedimientos y sistemas para la detección de sustancias inmunomoduladoras ilustradas en el presente documento.

15 Cepas bacterianas y condiciones del cultivo y ratones La cepa de *B. fragilis* NCTC 9343 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo, se han descrito su mutante isogénico por delección de PSA y el mutante mpi44 (solo produce PSA pero ningún otro polisacárido) (M.J. Coyne, A.O. Tzianabos, B.C. Mallory, V.J. Carey, D.L. Kasper y L.E. Comstock, (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*, Infect. Immun. 69: 4342-4350.) Las bacterias se cultivaron en un medio rico que contenía 37 g de BHI (BD n.º 237200), 0,5 µg/ml de hemina (Sigma H5533) y 0,5 µg/ml de vitamina K (Sigma V3501) en 1 l de ddH<sub>2</sub>O o un medio mínimo (MM) adaptado, que contenía 8 g de glucosa, FBS al 1 %, 0,5 µg/ml de hemina y 0,5 µg/ml de vitamina K en 1 l de RPMI (Invitrogen SKU n.º 11835-030). Los ratones SPF de las cepas C57BL/6 y Balb/c se adquirieron en Taconic Farms (Germantown, NY). Los ratones defectivos para TLR2 y los ratones defectivos para IL-10 se adquirieron en Jackson laboratories. Los ratones IL-10GFP se adquirieron en el laboratorio de Christopher Karp en el hospital médico de Cincinnati Children, y los ratones Foxp3GFP fueron un obsequio del laboratorio de Talal Chatila de la Universidad de California en Los Ángeles.

30 Aislamiento de la población bacteriana enriquecida con EDL. Se usó centrifugación por gradiente de densidad en Percoll (GE Healthcare n.º 17-0891-01) para el aislamiento de EDL tanto de *B. fragilis* de tipo salvaje como de *B. fragilis* ΔPSA (Patrick S, Reid JH. (1983) Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteroides fragilis* on a discontinuous density gradient. J Med Microbiol. 16(2): 239-41.) En resumen, se creó un gradiente de Percoll al 20 %, 40 %, 60 %, 80 % (diluido con PBS) en un tubo de ensayo de 14 ml (2 ml para cada capa). A continuación, el cultivo de *B. fragilis* resuspendido en PBS se añadió cuidadosamente sobre la capa de Percoll al 20 %. Posteriormente, el gradiente se centrifugó a 800 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las bacterias enriquecidas con EDL se pueden recuperar de la interfaz al 40 % -60 % del gradiente después de la separación.

35 Purificación y marcaje de VME. Este procedimiento se adapta de un protocolo descrito previamente para la preparación de VME 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.) En resumen, *B. fragilis* enriquecido con EDL se cultivó en MM adaptado. Las VME se recuperaron del sobrenadante libre de bacterias del cultivo mediante centrifugación a 40.000 g durante 2 horas a 4 °C y luego se lavaron dos veces con PBS y se filtraron a través de columnas de centrifugación de 0,45 µm (Millipore n.º 20-218). La concentración de proteínas totales de las VME purificadas se determinó mediante el ensayo de Bradford (Biorad n.º 500-0205). Las VME marcadas con FITC se prepararon como se ha descrito anteriormente (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). En resumen, las VME se incubaron en el tampón de tinción (1 mg/ml de FITC (Thermo Scientific n.º 46424), NaCl 100 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9,2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las VME marcadas se recogieron por centrifugación a 40.000 g durante 30 minutos a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS + NaCl 200 mM.

50 Microscopia electrónica de sección bacteriana ultrafina. Las secciones ultrafinas de *B. fragilis* enriquecidas con EDL se prepararon como se ha descrito anteriormente (Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. Microb Pathog. 20(4): 191-202.) En resumen, las muestras se fijaron en glutaraldehído (Sigma, G5882) al 2,5 % (v/v) en tampón de cacodilato durante la noche a 4 °C, seguido de una fijación adicional en tetróxido de osmio (1 %, p/v) durante 3 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se incluyó rojo de rutenio (1 mg/ml, Sigma R2751) en ambos procedimientos de fijación. A continuación, las muestras fijadas se incluyeron en resina epoxi después de la deshidratación en una serie graduada de alcoholes. Las secciones ultrafinas (100 ~ 200 nm) se cortaron y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo en rejillas de cobre recubiertas de formvar/carbono (EMS n.º FCF200-Cu) antes de la visualización por TEM.

Marcaje Immunogold de VME purificadas. Este procedimiento se adaptó de un protocolo previamente descrito (Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic

activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb Pathog.* 20(4):191-202.) En resumen, se aplicó una pequeña gota de VME purificada a las rejillas de oro recubiertas de formvar/carbono (EMS n.º FF200-Au) y se secó al aire. El marcaje Immunogold se realizó a temperatura ambiente mediante la flotación de estas rejillas con "VME", al lado de una serie de pequeñas gotas de anticuerpo y soluciones de lavado. Particularmente, las muestras se bloquearon en FBS al 10 % durante 10 minutos después de 5 minutos de incubación en glicina al 0,12 %. Después de bloquear, las muestras se incubaron adicionalmente con anticuerpo contra PSA diluido en FBS al 10 % durante 20 minutos, seguido de 5 lavados x 3 minutos con PBS. Posteriormente, se aplicó a las muestras el conjugado anticuerpo secundario-IgG con oro de 5 nm (regalo del Dr. Paul Webster, House Ear Institute, Los Ángeles) durante 20 minutos, seguido de nuevo por 5 lavados x 4 min con PBS. Después de marcar, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 1% durante 5 minutos y se lavaron exhaustivamente transfiriendo las rejillas a gotas de PBS 4x1min y H<sub>2</sub>O 4x1min. Se realizó contratinción colocando las rejillas en gotas de acetato de uranilo al 3-5 % en metilcelulosa al 2 % durante 10 minutos en hielo. Finalmente, se retiraron las rejillas de la solución de tinción mediante un asa de alambre y se secaron al aire. Las muestras cubiertas por una película delgada de metilcelulosa se retiraron del asa y se usaron para visualizar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Ensayo de glicoproteínas. El PSA purificado a partir de extractos de células enteras o VME (del mutante mpi44 de *B. fragilis*) se sometió a SDS-PAGE y el gel se tiñó posteriormente con un kit de tinción con glicoproteína (G bioscience n.º 786-254) para mostrar la presencia de PSA.

Colitis experimental inducida por sustancias químicas (TNBS). Este protocolo está adaptado de un procedimiento descrito anteriormente (Scheiffele y Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. *Current Protocols in Immunology.* 15.19.1-15.19.14.) En resumen, se trató a los ratones macho de tipo salvaje (Balb/c) por vía oral con PBS, SV-VME (5 µg) o ΔPSA-VME (5 µg) en días alternos durante una semana antes de la administración de TNBS. Se anestesió a los ratones tratados con isofluoreno y se aplicó administración rectal de TNBS al 2 % (en EtOH al 50 %, Sigma P2297) a través de un catéter 3,5F (Instech Solomon; SIL-C35). El tratamiento oral continuó otras dos veces después de la administración de TNBS y los ratones se analizaron 1-2 días después del último tratamiento.

En un ejemplo profético, los mismos ratones pueden tratarse con el TNBS, como se ha indicado anteriormente, antes de tratar oralmente a los ratones con PBS, SV-VME (5 µg) o ΔPSA-VME (5 µg) en días alternos durante una semana antes de la administración de TNBS. A continuación, se anestesió a los ratones tratados con isofluoreno y se les administró por vía rectal TNBS al 2 % (en EtOH al 50 %, Sigma P2297) aplicados a través de un catéter 3,5F (Instech Solomon; SIL-C35). El tratamiento oral continuaría otras dos veces después de la administración de TNBS y, después, los ratones se analizaron 1-2 días después del último tratamiento. Los inventores esperan que, usando este protocolo, el grado de colitis en estos ratones mejoraría, se reduciría o se curaría. Esta expectativa se basa en el hecho de que los estudios anteriores de los inventores que utilizaron PSA solo (Round y col., 2010) tanto antes como después del tratamiento con TNBS han prevenido y reducido la colitis, respectivamente; y el hecho de que algunos de los actuales resultados de los inventores muestran que su efecto de las VME en estos ratones depende de la dosis de PSA.

Análisis de patología tisular Los colonos de ratón se fijaron en formalina al 10 % tamponada neutra (ScyTek Laboratories n.º CAS 50-00-0) y se procesaron mediante Pacific Pathology para la tinción con H y E. Las puntuaciones de colitis para cada sección de colon fueron evaluadas de forma ciega por un anatomopatólogo (Dr. Gregory Lawson, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Ángeles). Se tomaron imágenes histológicas utilizando microscopía óptica (Zeiss) con un aumento de 20x.

PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN se recolectó de tejidos de ratón utilizando Trizol (Invitrogen n.º 15596-018) o de células purificadas usando RNeasy Mini Kit (Qiagen n.º 74104). Se utilizó el kit de síntesis de ADNc iSCRIPT (BioRad n.º 170-8890) para la conversión del ADNc y se usó supermix IQ SYBR Green supermix (BioRad n.º 172-8882) para la PCR en tiempo real. Los cebadores utilizados en este estudio son: TNF (F- 5'ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC 3' (SEQ ID NO:1); R- 5' GTG GGT GAG GAG CAC GTA GT 3') (SEQ ID NO 2); IL-17 (F- 5' TTA AGG TTC TCT CCT CTG AA 3'(SEQ ID NO:3); R- 5' TAG GGA GCT AAA TTA TCC AA 3') (SEQ ID NO: 4) IL-10 (F- 5' GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA 3' (SEQ ID NO:5); R- 5' ACC TGC TCC ACT GCT TGC T 3') (SEQ ID NO: 6) Foxp3 (F- 5' GCA ATA GTT CCT TCC CAG AGT TCT 3'(SEQ ID NO: 7); R- 5' GGA TGG CCC ATC GGA TAA G 3' (SEQ ID NO: 8)) actina (F-5' TTC GTT GCC GGT CCA CA 3'(SEQ ID NO:9); R-5' ACC AGC GCA GCG ATA TCG-3' (SEQ ID NO: 10)).

Microscopía de fluorescencia Las CDMO diferenciadas *in vitro* se colocaron en un portaobjetos de cámara de 8 pocillos Lab-Tek II (Nunc n.º 154534) a 50.000 células/pocillo. Las VME marcadas con FITC se añadieron al cultivo celular a 10 µg/ml. Después de 2 horas de incubación, las células se fijaron en PFA al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados x 5 min con PBS, la membrana celular se tiñó con 1 µg/ml de conjugado de tetrametilrodamina de WGA (Invitrogen W849) durante 1 hora a 4° C. Se aplicó a la muestra el reactivo anti-desvanecimiento ProLong Gold (P36930) tras lavados extensos después de la tinción de la membrana. Se tomaron imágenes fluorescentes utilizando el microscopio LSM 510 y el objetivo de aceite Plan-Neofluar 63x/1,25.

Citometría de flujo y tinción. Las CDMO del ensayo de captación de VME o el ensayo de activación se recogieron y se bloquearon en suero de ratón al 5 % durante 30 minutos en hielo. Después de bloquear, las células se tiñeron con

anti-CD11c-CPA, anti-MHCII-FITC o anti-CD86-PE (ebioscience) durante 30 minutos en hielo y se lavaron 2x con tampón de FACS (HBSS (sin Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), FBS al 1 %, EDTA 2mM, HEPES 10 mM) a 4 °C antes del análisis de citometría de flujo. De forma similar, las células del cocultivo de CDMO-linfocitos T *in vitro* se bloquearon y se tiñeron con anti-CD4-CPA/anti-CD25-PE de la misma manera, excepto que las células se volvieron a estimular usando PMA/Ionomicina durante 4-4,5 horas antes de la recolección. Toda la citometría de flujo se realizó con BD FACSCalibur y los resultados se analizaron con FlowJo.

Cocultivo *in vitro* de CDMO-linfocitos T. La médula ósea se recogió de diferentes tinciones de ratones y se diferenciaron *in vitro* en presencia de 20 ng/ml de GM-CSF (Miltenyi Biotec n.º 9517571) durante 8 días como se ha descrito anteriormente (Mazmanian, Liu, Tzianabos y Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. Cell 122:1 107-118.). (La pureza celular fue > 90 %.) los linfocitos T esplénicos CD4<sup>+</sup> se aislaron mediante purificación de microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec # 130-090-860) (la pureza celular es > 95 %). Las CDMO con pulsos de VME (10 µl/ml de VME, 100.000 células/ml, 12 h-24 h) se lavaron con HBSS y después se incubaron con linfocitos T CD4<sup>+</sup> (1.000.000 células/ml) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo con la adición de 0,01 µl/ml de anti-CD3 (día 0, figura 3c como se indica, 3d, e, f, figura 4a), 2 ng/ml de TGFβ (día 0, figura 3c, d y f, figura 4a) y 5 ng/ml de IL-2 (día 1 y día 3, todos los ensayos de cocultivo de CD-linfocitos T *in vitro*). Después de un total de 4 días de cultivo, los sobrenadantes se recolectaron para el ELISA (ebioscience n.º 88-7104-77) o las células se recolectaron para tinción y análisis de citometría de flujo.

Ensayo de supresión *in vitro*: Se usaron células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> purificadas de cocultivo de CDMO (pulsadas con SV-VME o ΔPSA-VME)-linfocitos T como fuente de Treg (Miltenyi Biotec, n.º 130-091-041). Los esplenocitos de ratón con depleción de CD4 tratados con mitomicina C (Sigma M4278) se utilizaron como CPA (100.000 células/ml). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> purificados directamente de bazo de ratón se pulsaron con CFSE durante 10 minutos a 37 °C, seguido de un primer lavado con PBS y un segundo lavado con medios de cultivo y se usaron inmediatamente (500.000 células/ml) como células respondedoras (Tef). Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos de fondo redondo con una adición de 5 µg/ml de anti-CD3 (ebioscience n.º 16-0031-86) en un volumen de 200 µl. Se tituló la relación Tef:Treg y las células se recogieron después de 2-3 días de cultivo para el análisis FACS.

Análisis estadísticos: Se aplicaron la prueba T de Student y un ANOVA de una vía para comparaciones pareadas y comparaciones entre > 2 grupos, respectivamente. Las diferencias significativas entre los grupos detectadas por ANOVA se analizaron mediante la prueba de Newman-Keuls como prueba post-hoc para identificar grupos que muestran diferencias estadísticamente significativas. Todas las barras de error indican SEM. NS: no significativo; \* p<0,05; \*\*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,001.

#### **Ejemplo 1: El polisacárido capsular inmunomodulador PSA se clasifica activamente en VME de *B. fragilis*.**

Las secciones ultrafinas de *B. fragilis* enriquecidas con EDL se prepararon como se describe en los materiales y procedimientos y se tomaron imágenes mediante microscopia electrónica de transmisión.

Los resultados ilustrados en la Figura 1a muestran que las VME eran producidas abundantemente por bacterias y se pudieron observar brotando de la envoltura bacteriana (Figura 1a, mayor aumento). Los estudios previos de los solicitantes han demostrado que la delección de PSA anula la capacidad inmunomoduladora de *B. fragilis* (Mazmanian, Liu, Tzianabos y Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. Cell 122:1 107-118.) (Mazmanian, Round y Kasper (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature. 453 (7195) 620-625. Las micrografías electrónicas de una cepa mutante de PSA (*B. fragilis*ΔPSA) no ilustran ningún defecto en la síntesis de VME, y el tamaño, la forma y la abundancia de las VME producidas no se distinguían de las de las bacterias de tipo salvaje (Figura 1a y Figura 5). En particular, los resultados ilustrados en la figura 1a revelan que las vesículas están brotando activamente de la superficie de las bacterias.

Para determinar si el PSA está asociado con VME de *B. fragilis*, Las vesículas purificadas de bacterias de tipo salvaje y ΔPSA se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se describe en la sección de materiales y procedimientos.

Los resultados ilustrados en la Figura 1b muestran que las vesículas de tipo natural mostraban inmunorreactividad para PSA, a diferencia de las VME de *B. fragilis*ΔPSA. *B. fragilis* produce al menos 8 polisacáridos capsulares distintos que recubren la superficie de las células bacterianas, denominados PSA, PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG, y PSH. Mientras que también se detectó PSB en preparaciones de vesículas, el PSG estaba ausente, lo que demuestra selectividad para ciertos polisacáridos para su empaquetado en VME (Figura 1b). Por consiguiente, los resultados de la Figura 1b muestran que el PSA y el PSB están asociados con vesículas, mientras que el PSG solo se encuentra en la superficie bacteriana. Los mutantes de delección para los polisacáridos capsulares confirman la especificidad de cada anti-suero.

Los resultados del análisis de inmunotransferencia se confirmaron mediante experimentos de marcaje inmunogold realizado como se describe en la sección de materiales y procedimientos. Los resultados del marcaje Immunogold de las vesículas purificadas ilustradas en la Figura 1c y confirman que el PSA está asociado físicamente con las VME, y que la gran mayoría de las VME de *B. fragilis* de tipo salvaje se tiñen positivamente para el PSA (Figura 6).

Para verificar que la ausencia de PSA no alteraba la composición molecular de las VME, se realizó un análisis proteómico por espectrometría de masas que no reveló diferencias cualitativas o cuantitativas importantes en la composición proteica entre las vesículas de bacterias de tipo salvaje o mutantes de PSA (Figura 7).

5 El PSA es un polímero heterogéneo de subunidades que se repiten. Se realizó separación por tamaño del PSA recuperado de extractos de células enteras mediante cromatografía, así como un análisis inmunotransferencia con anti-PSA de preparaciones de polisacárido capsular de células enteras y V,E purificadas como se indica en Materiales y procedimientos.

10 Los resultados relevantes ilustrados en la figura 1d muestran, sorprendentemente, solo la especie de bajo peso molecular, L-PSA, está asociada con VME, lo que ilustra la especificidad del empaquetado del PSA en vesículas. En particular, los resultados de la Figura 1d muestran que solo el PSA de bajo peso molecular (L-PSA) se empaqueta en vesículas, al contrario que la especie de alto peso molecular (H-PSA) que permanece asociada con la cubierta de la célula bacteriana.

Conjuntamente, los resultados anteriores revelan que el polisacárido capsular inmunomodulador PSA se clasifica de forma activa en VME de *B. fragilis*.

15 **Ejemplo 2: Las VME protegen a los animales frente a la colitis experimental y a la inflamación intestinal de una manera dependiente de PSA.**

Para investigar si las VME pueden mejorar los síntomas clínicos de la enfermedad, se trató a los ratones con sonda con VME durante la inducción de colitis por TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico).

20 Los resultados ilustrados en la Figura 2a indican que los animales de control perdieron peso rápidamente después de la administración rectal de TNBS (Figura 2a; TNBS+PBS), que no se recuperaron en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 2a; ETOH+PBS). De manera destacable, las VME administradas por vía oral a animales TNBS protegieron significativamente frente a la pérdida de peso (Figura 2a; TNBS+SV-VME). Más importante, cuando se administraron VME de *B. fragilis*ΔPSA, la pérdida de peso fue indistinguible de los animales TNBS (Figura 2a; TNBS+ΔPSA-VME), TNBS + ΔPSA-VME), lo que demuestra que el PSA es responsable de prevenir la enfermedad por emaciación.

Los esfuerzos de los inventores para detectar vesículas intactas en el colon después de una sonda intragástrica fueron confundidos por observaciones de vesículas derivadas del huésped, incluso en ratones libres de gérmenes (estériles) como se ha informado anteriormente (datos no mostrados).

30 Dado que la reducción en la longitud del colon es un rasgo distintivo de la colitis TNBS, la detección de la longitud del colon se realizó en colonos no manipulados inmediatamente después de la resección del ciego al recto y la cuantificación de la longitud (gráfico) del vehículo tratado (EtOH) y los grupos TNBS (n = 4 animales/grupo). En particular, la medición se realizó en el momento del sacrificio (día 4 después de la inducción de la enfermedad).

Los resultados ilustrados en la Figura 2b mostraron longitudes intestinales normales en animales tratados con vesículas que contienen PSA, pero no en animales tratados con VME deficientes en PSA (Figura 2b).

35 La colitis experimental produce alteraciones patológicas graves en la arquitectura intestinal. Por consiguiente, Se proporcionaron secciones de colon teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) representativas de cada grupo de tratamiento y se muestran en la Figura 2c. Las imágenes de la Figura 2c muestran que en el análisis histológico de los tejidos colónicos se observó una enfermedad significativa en los animales tratados con TNBS que mejoraron con la administración oral de vesículas que contienen PSA.

40 Los resultados de la Figura 2c se confirmaron mediante las puntuaciones de colitis de animales asignados por un anatomopatólogo enmascarado. La colitis por TNBS se manifiesta en lesiones focales en todo el colon que imitan la patología observada en la enfermedad de Crohn. Para evaluar cuantitativamente la enfermedad, los síntomas clínicos fueron evaluados por un anatomopatólogo enmascarado utilizando un sistema de puntuación estándar (Scheiffele y Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology.15.19.1-15.19.14.) Los resultados ilustrados en la figura 2d indican que aunque todos los animales tratados con TNBS y ΔPSA-VME se vieron gravemente afectados, las SV-VME redujeron significativamente la enfermedad en la mayoría de los animales. Los animales tratados con VME de bacterias de tipo salvaje tuvieron muchos menos signos focales de patología, y cuando se observaron lesiones, eran más pequeñas y conservaban una arquitectura tisular considerablemente normal en comparación con los animales que recibieron ΔPSA-VME.

50 Los resultados anteriores establecen que el PSA es necesario para la actividad protectora de la enfermedad de las VME.

**Ejemplo 3: Las VME que contiene PSA inhiben TNF-α/IL-17, potencian la expresión de IL-10.**

La producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias canónicas asociadas con colitis se midió en ratones tratados como se ilustra en el Ejemplo 2. En particular, el análisis de transcripción de citocinas se realizó mediante

qRT-PCR a partir del ARN recuperado de dos colon enteros o linfocitos T CD4+ purificados de ganglios linfáticos mesentéricos.

Los resultados relevantes representativos de 3 ensayos independientes se indican en la Figura 2e (colon completos) y en la Figura 2f (linfocitos T CD4+ purificados de los ganglios linfáticos mesentéricos). Esos resultados muestran que los niveles de transcripción de biomarcadores proinflamatorios/citocinas, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-17A, se elevaron en animales tratados con TNBS, pero se redujeron mediante la administración de VME de una manera dependiente de PSA (Figura 2e). Consistente con la protección de la patología, las VME provocaron la producción de mayores niveles de biomarcadores antiinflamatorios/citocinas IL-10 en comparación con los animales administrados por vía oral  $\Delta$ PSA-VME (Figura 2f). El análisis de la producción de citocinas por linfocitos T CD4+ purificados de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) confirmó que los linfocitos T en realidad estaban produciendo IL-10 en respuesta al PSA (Figura 2f). La infiltración de linfocitos Th17, que son necesarios para la enfermedad, fue reducida significativamente por las VME, al igual que los niveles del potente marcador proinflamatorio TNF- $\alpha$  (Figura 2f). Los inventores concluyeron que el empaquetamiento de PSA en VME de *B. fragilis* protege a los animales de las manifestaciones patológicas e inmunológicas de la colitis experimental.

15 **Ejemplo 4: Las VME que contienen PSA de *B. fragilis* inducen respuestas de las células dendríticas.**

Las células dendríticas (CD) extienden las protrusiones en la luz intestinal y las partículas intestinales de la muestra y, posteriormente, miran a los GLM con el fin de iniciar las reacciones de los linfocitos T. De hecho, el PSA administrado por vía oral a los animales se asocia con las CD CD11c+ en los GLM. Por consiguiente, Los solicitantes buscaron analizar si las VME que contenían PSA también pueden ser captadas por las CD.

20 Los resultados ilustrados en la figura 3a muestran que las CD derivadas de la médula ósea internalizaron rápidamente las VME de una manera dependiente de la actina, ya que el tratamiento de las células con citochalasina D inhibió significativamente la captación de vesículas (Figura 3a y Figura 8). La localización intracelular se confirmó mediante microscopía confocal (Figura 9).

25 También se investigó la inducción mediada por PSA en las CD de los marcadores de activación de linfocitos T. Los resultados ilustrados en la Figura 3b indicaron que la expresión de los marcadores de activación de linfocitos T (MHCII, CD86) se elevó igualmente después de la internalización de ambos SV-VME y  $\Delta$ PSA-VME (Figura 3b y Figura 10). El aumento de la expresión de MHC y las moléculas coestimuladoras indican que las VME que contienen PSA de *B. fragilis* puede influir en las respuestas de los linfocitos T.

30 **Ejemplo 5: Las VME que contienen PSA inducen la expresión de IL-10 en linfocitos T CD4+ a través de la expresión de IL-10 en CD.**

A la luz del papel protector de las VME que contienen PSA en la colitis mostrado con los experimentos ilustrados en los Ejemplos 1 a 3, se analizaron los efectos biológicos de las VME en la inducción de respuestas de linfocitos T supresores. En particular, dado que se sabe que varias poblaciones de linfocitos T reguladores (Treg) inhiben la colitis, se analizó la capacidad de las VME para promover el desarrollo de Treg.

35 Los resultados ilustrados en la Figura 3c indican que las SV-VME inducían la expresión de IL-10 a partir de cocultivos *in vitro* de CD-linfocitos T, mientras que no se produjo IL-10 a partir de CD solas en estas condiciones. Las vesículas purificadas a partir de *B. fragilis* $\Delta$ PSA indujeron significativamente menos IL-10 que SV-VME, aunque se detectó un aumento sobre los controles de medios. Se sabe que la producción de IL-10 a partir de CD apoya el desarrollo de linfocitos CD4+IL-10+ *in vivo* e *in vitro*. Por consiguiente, se realizó el análisis de ELISA similar a aquel cuyos resultados se ilustran en la Figura 3c incluyendo CD diferenciadas de animales IL-10 -/-.

40 Los resultados ilustrados en la Figura 3d (panel izquierdo) muestran una producción de IL-10 muy reducida en los cocultivos de CD-linfocitos T cuando las CD de IL-10 -/- se trataron con VME de tipo salvaje, lo que sugiere que la expresión de IL-10 por las CD es necesaria para inducir IL-10 de linfocitos T CD4 + de una manera paracrina.

45 **Ejemplo 6: Las VME que contienen PSA programa las CD para dirigir el desarrollo y/o expansión de Treg Foxp3.**

Los ligandos microbianos son detectados por varias clases de receptores de reconocimiento de patrones, y se ha demostrado que el PSA señala a través del receptor 2 de tipo toll (TLR2) para provocar la producción de citocinas Th1. Por lo tanto, se realizaron una serie de experimentos para analizar si se requiere TLR2 para la inducción de IL-10 por las VME de tipo salvaje (que contienen PSA), como informes recientes han demostrado que la función DE Treg y la expresión de IL-10 están influenciadas por TLR2.

50 Los resultados ilustrados en la Figura 3d (panel derecho) indican que, en comparación con las CD de tipo salvaje, la ausencia de TLR2 (CD de animales TLR2 -/-) inhibe completamente la producción de IL-10 en respuesta a las VME. Ambas CD respondieron igualmente a la estimulación de superantígeno (SEA), demostrando un defecto específico en la detección de PSA y no una falta general de activación de linfocitos T por CD TLR2 -/- (Figura 3d). Los linfocitos T CD4+CD25+ que expresan el factor de transcripción Foxp3 son una importante subpoblación de Treg. Estudios recientes han demostrado que Treg CD4+CD25+Foxp3+ pueden expresar IL-10 y la producción de IL-10 de Treg es

necesaria para prevenir la inflamación intestinal.

Para determinar la fuente de IL-10 inducida por PSA en VME, los linfocitos T CD4+CD25+ y CD4+CD25- se purificaron después del cocultivo con CD y la expresión de IL-10 y Foxp3 se midió mediante qRT-PCR.

5 Los resultados ilustrados en la Figura 3e indican que notablemente, las VME-PSA inducían significativamente la expresión de IL-10 en la población de Treg CD4+CD25+, pero no de linfocitos T CD4+CD25-. Las VME purificadas a partir de *B. fragilis*- ΔPSA no pudieron estimular la producción de IL-10 a partir de ninguna de las poblaciones de linfocitos T, con niveles idénticos a los controles de medios. La expresión de Foxp3 también se incrementó de manera significativa exclusivamente en los linfocitos T CD4+CD25+ por las VME de una manera dependiente de PSA (Figura 3e).

10 Los cocultivos se establecieron como para los experimentos ilustrados en las Figuras 3c-e, pero utilizando linfocitos T CD4+ de ratones Foxp3-GFP. Tras 4 días de cultivo con CD con pulsos de VME, las células se tiñeron con anti-CD4 y Foxp3 se detectó mediante la expresión de GFP usando FC.

15 Los resultados representativos de 2 ensayos Independientes se ilustran en la Figura 3f. Consistente con el aumento de la transcripción de Foxp3 entre los linfocitos T CD4+, las proporciones de linfocitos T CD4+Foxp3+ aumentaron en respuesta al tratamiento con SV-VME pero no con el tratamiento con PSA-VME (Figura 3f). En conjunto, las VME que contienen PSA programan a las CD para dirigir el desarrollo y/o expansión de Treg en un sistema de cultivo completamente *in vitro*.

**Ejemplo 7: Las VME que contienen PSA inducen la función supresora de Treg Foxp3 mediada por IL10**

20 El uso de Treg como terapias celulares se ha propuesto para la EII, autoinmunidad y alergias. Se investigó la expresión de IL-10 por subpoblaciones de células T CD4+ después de 4 días de cocultivo con CD tratadas con VME. Los linfocitos T CD4+ de bazo se purificaron en ratones IL-10-GFP, se tiñeron con anti-CD4 y anti-CD25 tras el cocultivo y se midió la expresión de IL-10 mediante la expresión de GFP.

Los resultados del tratamiento relevante con VME de las CD y los linfocitos T purificados ilustrados en la Figura 4a indican que reveló que el PSA estimula la producción específica de IL-10 a partir de Treg CD4+ CD25+.

25 Según este hallazgo, se investigó la capacidad del PSA para promover la capacidad supresora de Treg *ex vivo*. La supresión *in vitro* de las células intactas respondedoras por linfocitos T CD4+CD25+ purificados después de cocultivo con CD tratadas con medios (control), SV-VME y ΔPSA-VME. las células respondedoras CD4+CD25- (células efectoras; Tef) se purificaron de bazos de ratones de tipo salvaje, se pulsaron con CFSE de colorante intracelular (éster de succinimidil carboxifluoresceína), se incubaron con Treg y se estimularon con anti-CD3 durante 30 3 días. La proliferación celular se midió mediante FC de dilución de CFSE.

Los resultados ilustrados en la Figura 4b y 4c indican que las Treg recuperadas de condiciones con CD tratadas con SV-VME mostraron una capacidad supresora significativamente mejorada en comparación con las células T CD4 + CD25 + en respuesta a las APSA-VME.

35 Por lo tanto, la ausencia específica de PSA de las VME que, de lo contrario, contienen numerosos ligandos microbianos (LPS, lipoproteínas, peptidoglicano, etc. anula la capacidad de las vesículas de *B. fragilis* para inducir Treg funcionales.

**Ejemplo 8: El PSA induce varias combinaciones de biomarcadores en Treg Foxp3**

40 Se trató a los ratones Foxp3-GFP por vía oral con PSA purificado en días alternos durante 6 días. Se extrajeron los GLM y los linfocitos T CD4+Foxp3+ o CD4+Foxp3- se purificaron mediante FACS según la expresión ±GFP (pureza > 99 %). Se extrajo el ARN y se usó para q-PCR.

Los resultados ilustrados en la Figura 11 demuestran que el PSA coordina la inducción de múltiples genes antiinflamatorios, incluyendo IL-10, TGF-β, perforina y granzima A, y la inhibición de TNFα e IL17 (en particular IL17A).

45 Los resultados anteriores proporcionan un mecanismo molecular para la actividad probiótica de *B. fragilis* y revelan un ejemplo seminal para un ligando microbiano que vincula la señalización del receptor inmunitario innato al desarrollo de linfocitos T reguladores. En particular, los resultados anteriores indican que el PSA se administra al huésped mediante vesículas de membrana externa (VME), estructuras de secreción que dirigen moléculas bacterianas a las células huésped. Las VME que contienen PSA son internalizadas por las células dendríticas del sistema inmunitario del huésped. Tras la captación de las VME, el PSA programa las células dendríticas para inducir 50 la diferenciación de los linfocitos T reguladores (Treg) que expresan Foxp3 y la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10). El desarrollo de Treg por las VME requiere la expresión del receptor de tipo toll 2 (TLR2) y la producción de IL-10 por las células dendríticas. De manera destacable, las VME purificadas dirigen la diferenciación *in vitro* de los Treg funcionales con una potente actividad supresora de una manera dependiente de PSA. El tratamiento de animales con VME que contienen PSA previene la colitis experimental y suprime las respuestas de citocinas

proinflamatorias en el intestino. Estos hallazgos revelan que las bacterias comensales proporcionan factores microbianos beneficiosos a través de la secreción de vesículas, un procedimiento que puede convertirse en un enfoque novedoso para la administración de terapias probióticas para la EII.

5 En particular, los resultados anteriores muestran que los Treg inducidos por VME que contienen PSA son funcionalmente supresores e inhiben la activación de los linfocitos T en el cultivo. Esta es la primera demostración del desarrollo de Treg *in vitro* por un ligando microbiano y proporciona una prueba de principio a la noción ampliamente especulada de que la señalización del receptor inmunitario innato modula la función de Treg. Como las terapias actuales para la EII son ineficaces o tienen efectos secundarios graves, los probióticos representan nuevas opciones de tratamiento prometedoras al aprovechar mecanismos evolutivos bien desarrollados para la inmunomodulación. Dado que los Treg suprimen las respuestas inmunitarias en múltiples tejidos, la demostración seminal de los inventores del desarrollo de Treg *in vitro* por PSA sugiere la posibilidad emocionante de nuevas terapias celulares para numerosos trastornos inflamatorios, incluyendo autoinmunidad, asma y alergias.

15 Para identificar moléculas producidas por microorganismos que median la inmunomodulación, las fracciones de los productos bacterianos se pueden purificar y se realizan los mismos ensayos que anteriormente hasta que se encuentra un compuesto puro que imita ese resultado cuando se usan bacterias completas. Asimismo, los enfoques anteriores podrían usarse para seleccionar una biblioteca mutante de un microorganismo de interés para identificar moléculas inmunomoduladoras que se han eliminado en un clon respectivo de una cepa que posee esta actividad.

20 Los estudios anteriores de los inventores han demostrado que el PSA solo puede tratar y prevenir la colitis en ratones (Round y col., 2010). Por consiguiente, dados los resultados actuales de los inventores que muestran que las VME de tipo salvaje que contienen PSA pueden prevenir la colitis en ratones, y que este efecto con las VME parece depender del PSA, ahora proponen que las VME de tipo salvaje será eficaz en el tratamiento de la colitis en el mismo modelo de ratones TNBS y tienen un efecto beneficioso o mejorado en seres humanos con EII.

25 Cabe señalar en el momento actual que, aunque no se conocen los marcadores predictivos de la aparición de enfermedades inflamatorias (tal como la EII), una vez identificados, estos marcadores predictivos significarán que los sujetos/seres humanos en riesgo de desarrollar la enfermedad pueden tratarse de manera similar con las sustancias/composiciones/VME como se describe en el presente documento, para prevenir la aparición de la enfermedad.

30 En otra realización, las VME (que contienen PSA) podrían alterarse de manera que no expresen o tengan una expresión reducida de ciertas enzimas (por ejemplo, actividades hemaglutinantes y enzimáticas (enzimas hidrolizantes tales como las fosfatasa alcalinas y ácidas, esterasa lipasa, fosfohidrolasa, glucosaminidasa, etc.) utilizando procedimientos moleculares o físicos conocidos por los expertos en la técnica. Dichas VME modificadas podrían utilizarse para tratar o prevenir la inflamación o enfermedades inflamatorias.

35 Los ejemplos expuestos anteriormente se proporcionan para dar a los expertos en la técnica una descripción y divulgación completas de cómo hacer y usar las realizaciones de las vesículas, los sistemas y procedimientos de la divulgación, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su divulgación. Las modificaciones de los modos descritos anteriormente para llevar a cabo la divulgación que son obvias para los expertos en la técnica están destinadas a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de habilidad de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

40 Debe entenderse que las divulgaciones no se limitan a composiciones o sistemas biológicos concretos, que, por supuesto, pueden variar. Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante. Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una/uno", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término "pluralidad" incluye dos o más referencias a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la divulgación pertenece entiende habitualmente.

50 Aunque se puede usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica para analizar los ejemplos específicos, en el presente documento se describen materiales y procedimientos adecuados.

## Referencias

1. Xavier, R.J. y Podolsky, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434 (2007).
- 55 2. Mazmanian, S.K., Round, J.L. y Kasper, D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453:620-625 (2008).
3. Braun, J. y Wei, B. Body traffic: ecology, genetics, and immunity in inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol* 2, 401-429 (2007).
4. Round, J.L. y Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and

disease. *Nat Rev Immunol* (2009).

5. Scheiffele y Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*. 15.19.1-15.19.14.

6. Mazmanian, Liu, Tzianabos y Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122:1 107-118

5 7. M.J. Coyne, A.O. Tzianabos, B.C. Mallory, V.J. Carey, D.L. Kasper y L.E. Comstock, (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*, *Infect. Immun.* 69: 4342-4350.

8. Patrick S, Reid JH. (1983) Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteriodes fragilis* on a discontinuous density gradient. *J Med Microbiol.* 16(2): 239-41

10 9. 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.

10. 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.

11. Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb Pathog.* 20(4):191-202.

15 12. Round y col., (2010) Inducible Foxp3+ regulatory T cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *PNAS*, 107 (27). 12204-12209.

13. Documento US 2004/0219160 A1 (Tzianabos Arthur O y col.)

14. Chen D J y col. (2010) Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines, *PNAS* 107 (7): 3099-3104.

20 15. Documento US 2009/0124573 A1 (Mazmanian Sarkis y col.)

Aunque la presente invención se ha descrito en relación con las realizaciones preferidas, debe entenderse que pueden utilizarse modificaciones y variaciones sin apartarse de los principios y alcance de la invención, como entenderán fácilmente los expertos en la técnica. Por consiguiente, tales modificaciones pueden practicarse dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

25

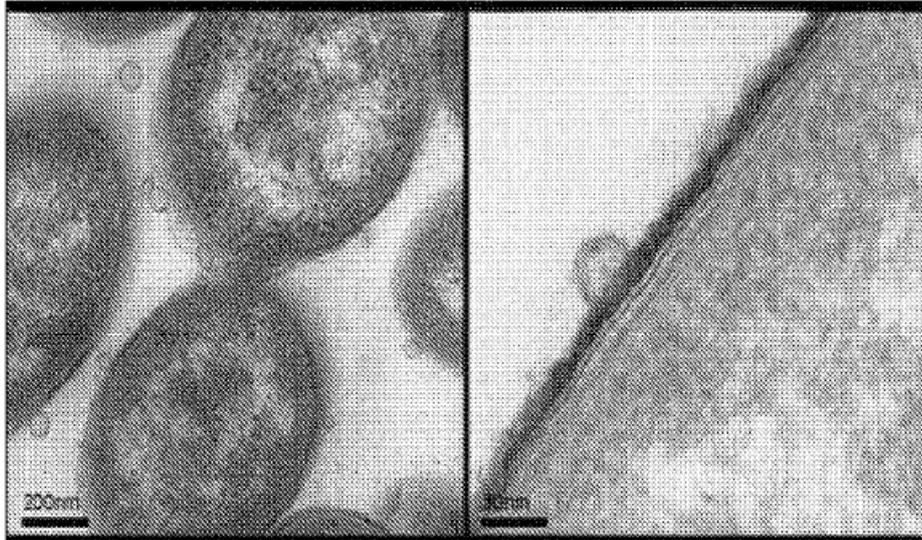
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición bacteriana para su uso como medicamento, que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula polisacárido A (PSA), en la que la membrana lipídica es de la membrana externa de *Bacteroides fragilis*.
- 5 2. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un excipiente.
3. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el PSA es PSA de bajo peso molecular (L-PSA).
4. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende uno o más medicamentos que se sabe que son útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 10 5. Una composición bacteriana para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o inflamación que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula PSA, en la que la membrana lipídica es de la membrana externa de *Bacteroides fragilis*.
- 15 6. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición se usa en combinación con otro medicamento que se sabe que es útil en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
7. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria intestinal.
8. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal comprende la reducción de la gravedad, la duración y/o el riesgo de desarrollar malignidad.
- 20 9. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la malignidad es o comprende cáncer de colon.
10. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medicamento dirige la diferenciación de los linfocitos T reguladores funcionales con una potente actividad supresora.
- 25 11. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el PSA es L-PSA.
12. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u11, en la que dichos linfocitos T reguladores inhiben la activación de linfocitos T.
- 30 13. La composición bacteriana para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que los linfocitos T reguladores expresan Foxp3.
14. El uso de una composición bacteriana que comprende una vesícula de membrana externa formada por una membrana lipídica que encierra un ambiente acuoso, comprendiendo la vesícula polisacárido A (PSA), en el que la membrana lipídica es de la membrana externa de *Bacteroides fragilis*, para dirigir la diferenciación de linfocitos T reguladores funcionales con una potente actividad supresora, en el que la diferenciación se produce *in vitro*.
- 35 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el PSA es L-PSA.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en el que dichos linfocitos T reguladores inhiben la activación de linfocitos T.
17. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que los linfocitos T reguladores expresan Foxp3.

40

**a**

*B. fragilis*



*B. fragilis* $\Delta$ PSA

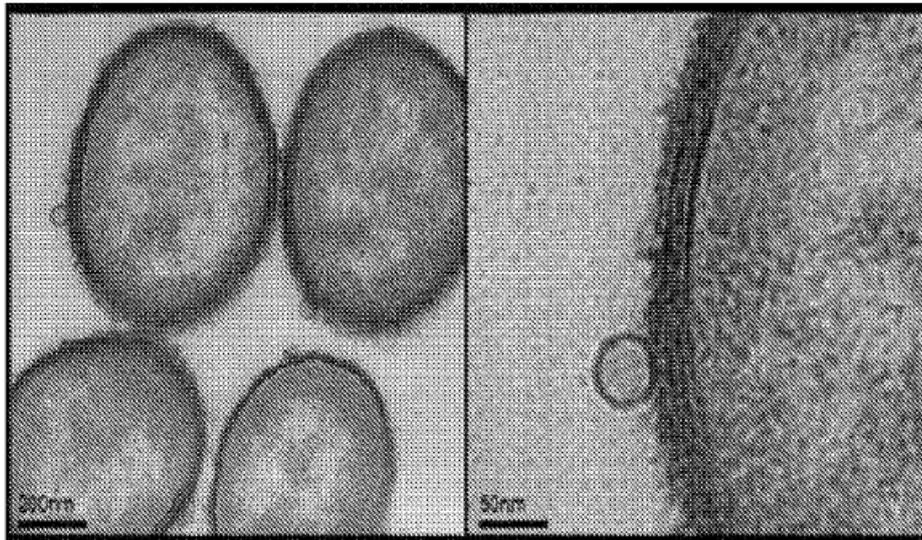


Figura 1A

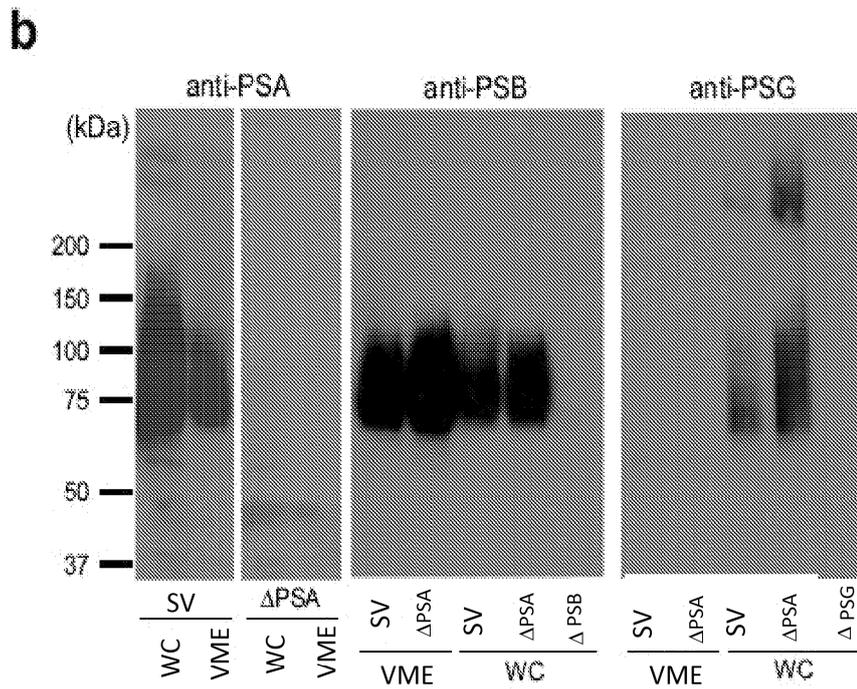
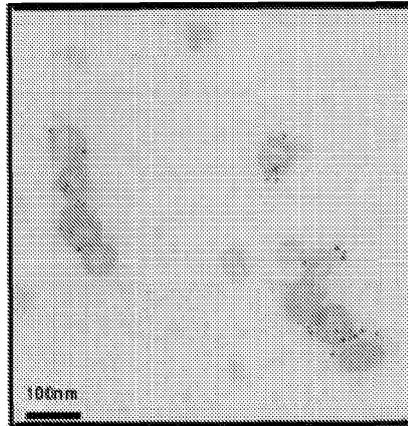


Figura 1B

**C**

SV-VME



$\Delta$ PSA-VME

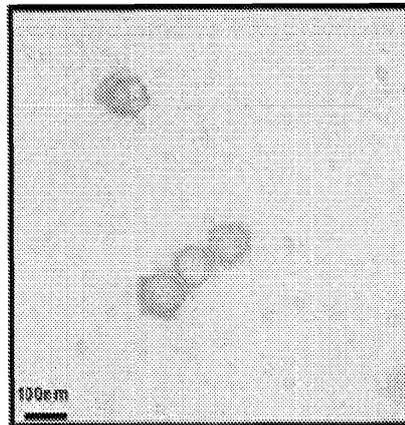


Figura 1C

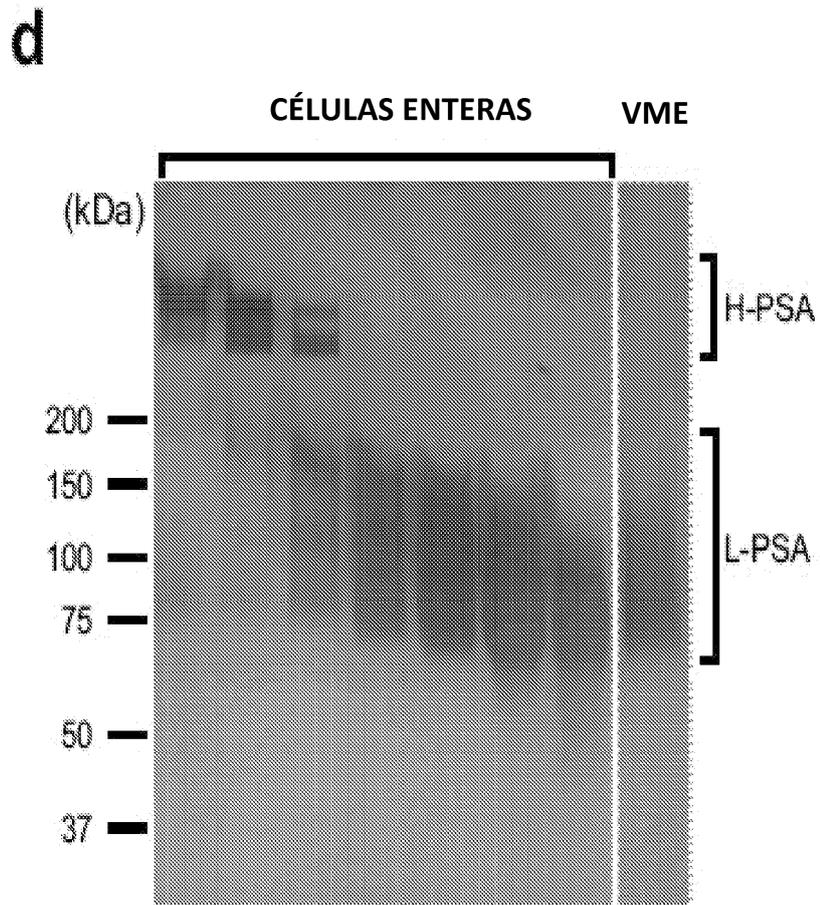


Figura 1D

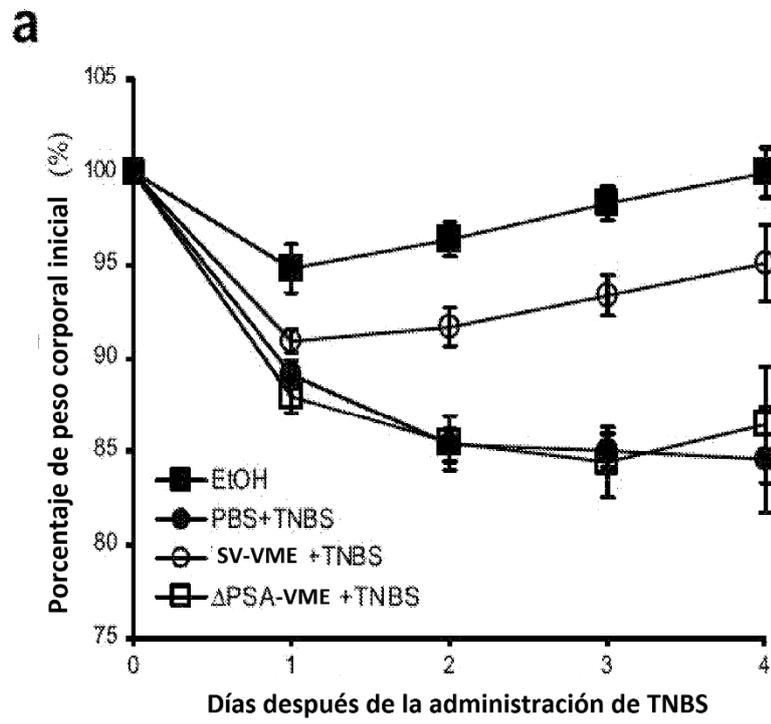


Figura 2A

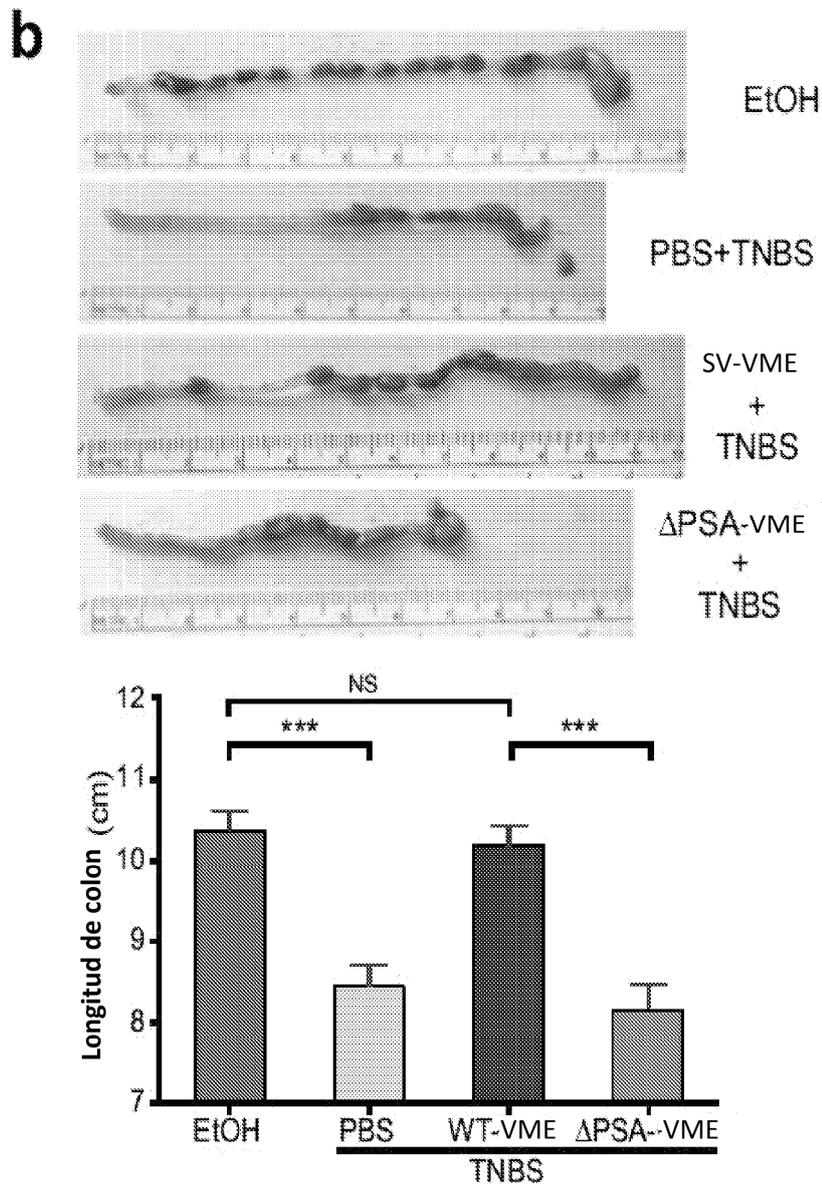


Figura 2B

**C**

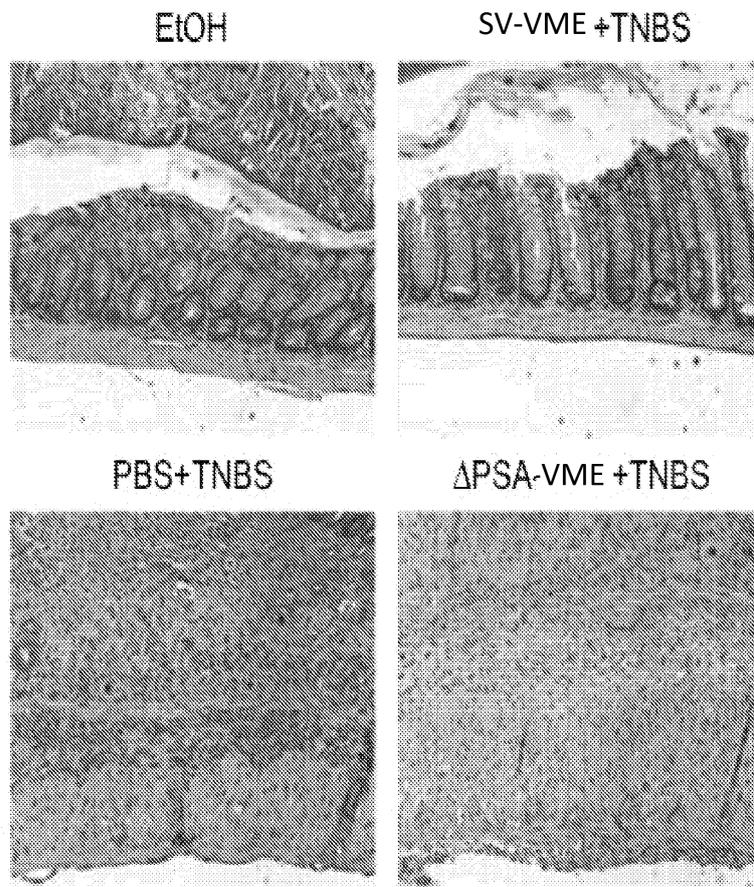


Figura 2C

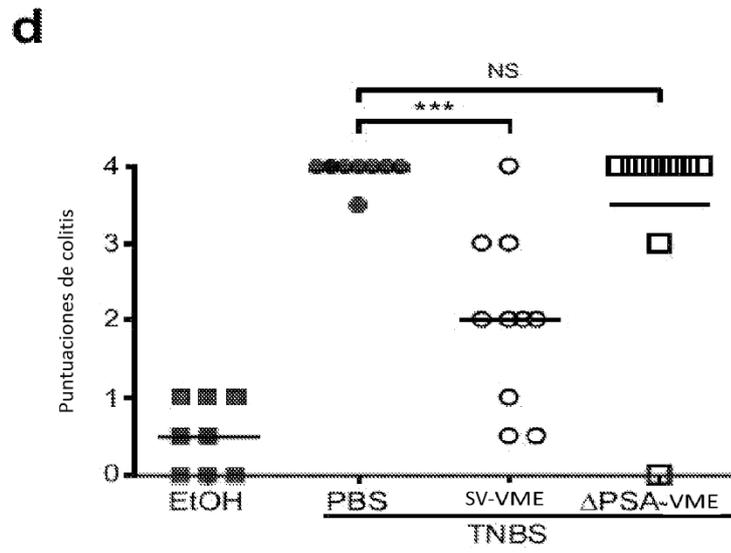


Figura 2D

e

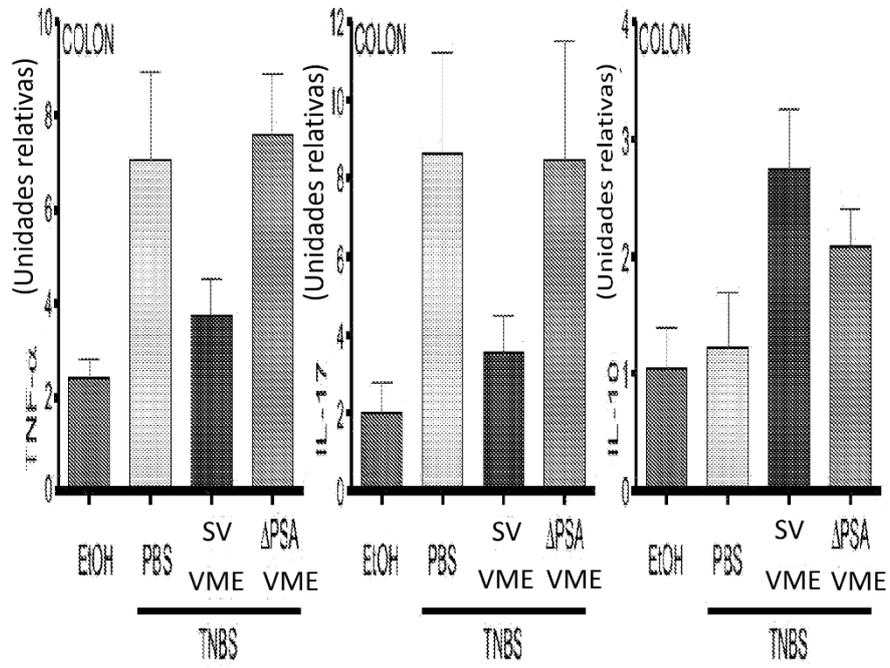


Figura 2E

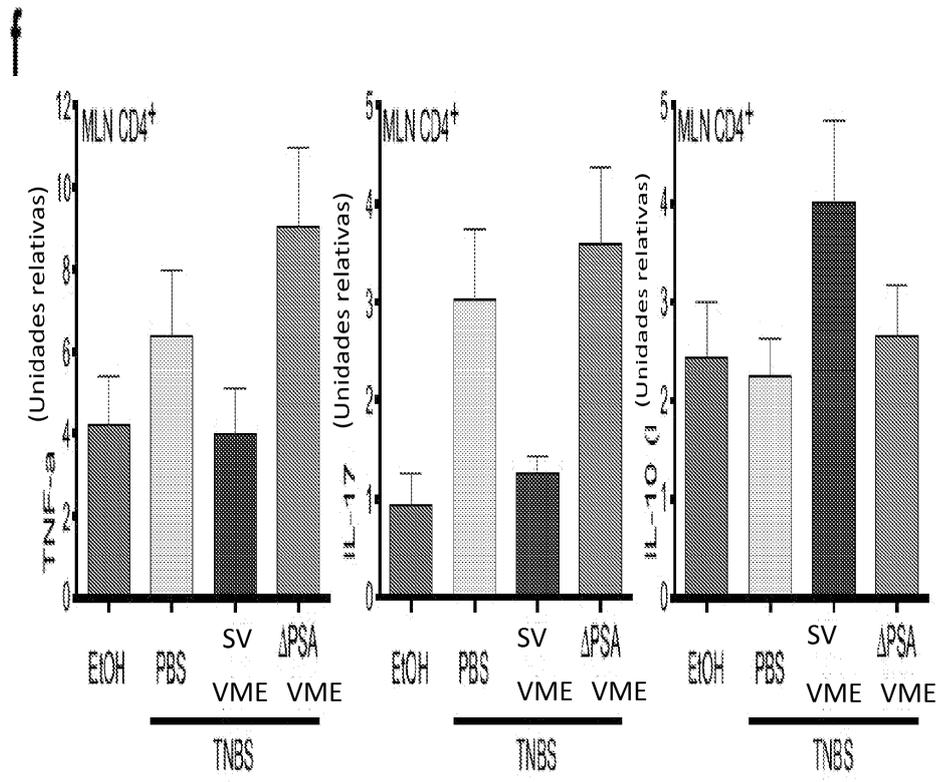


Figura 2F

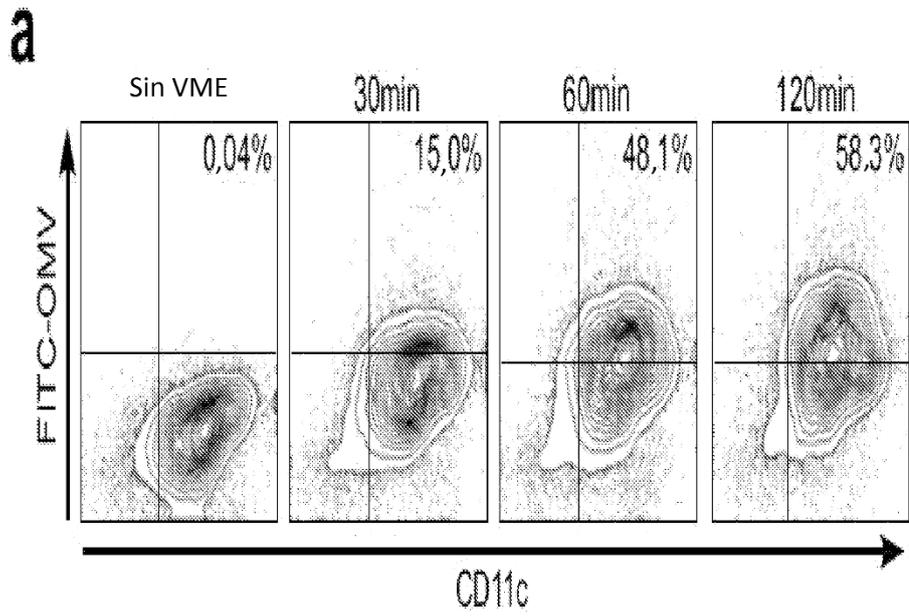


Figura 3A

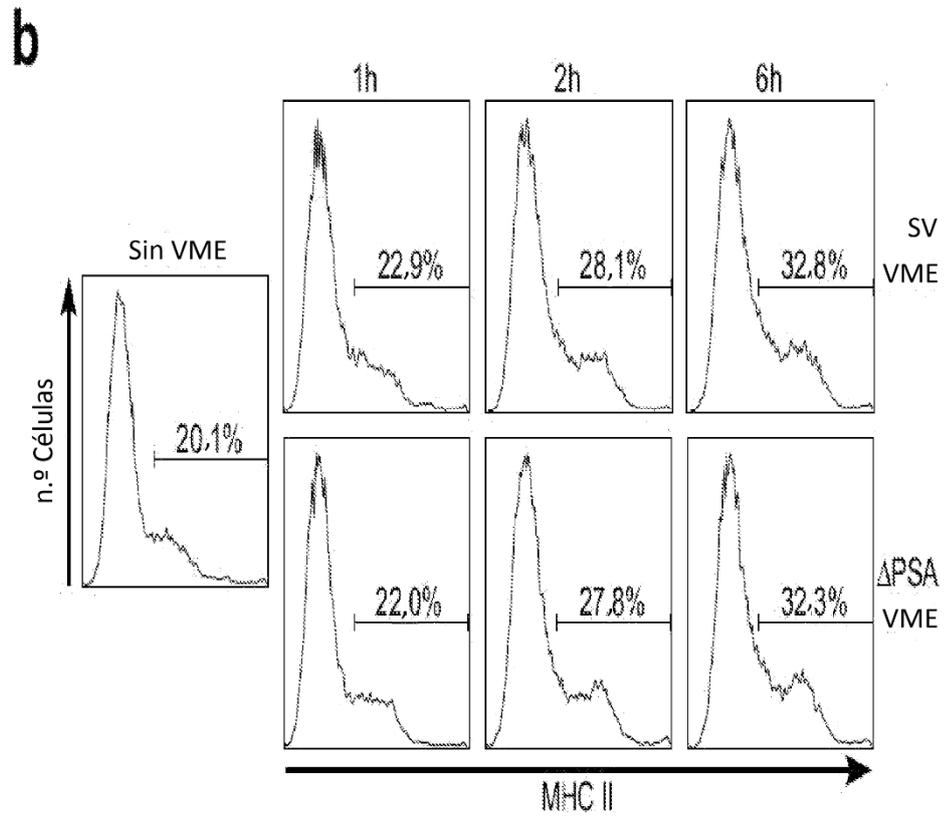


Figura 3B

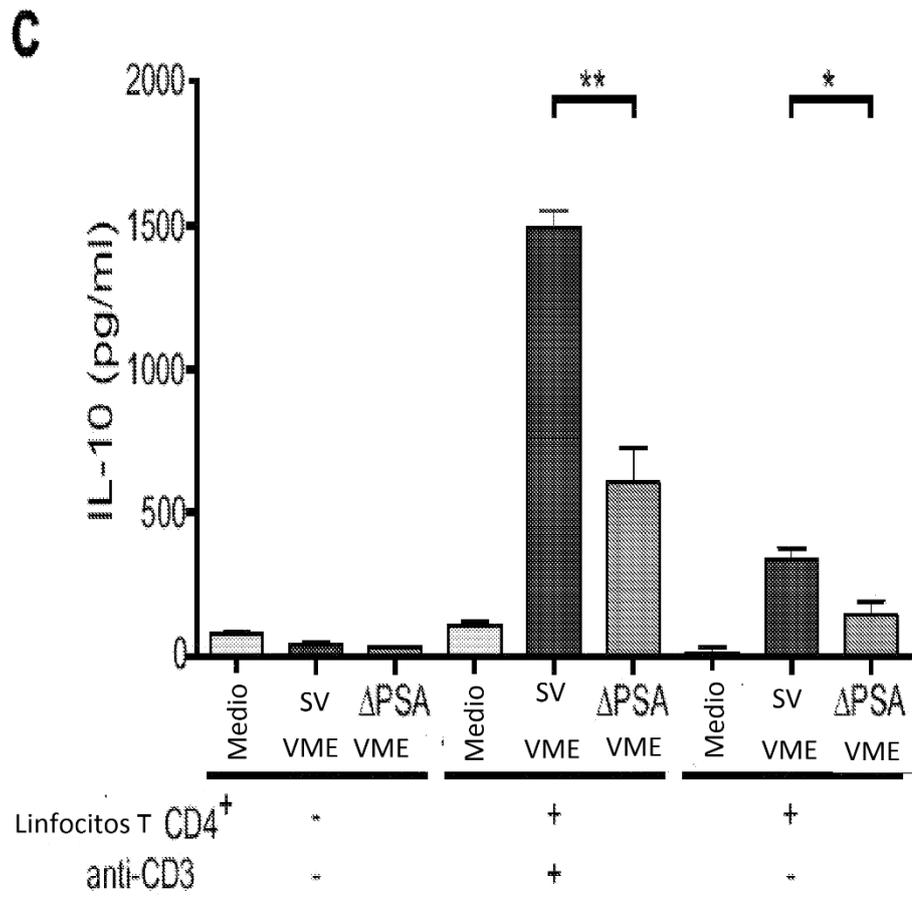


Figura 3C

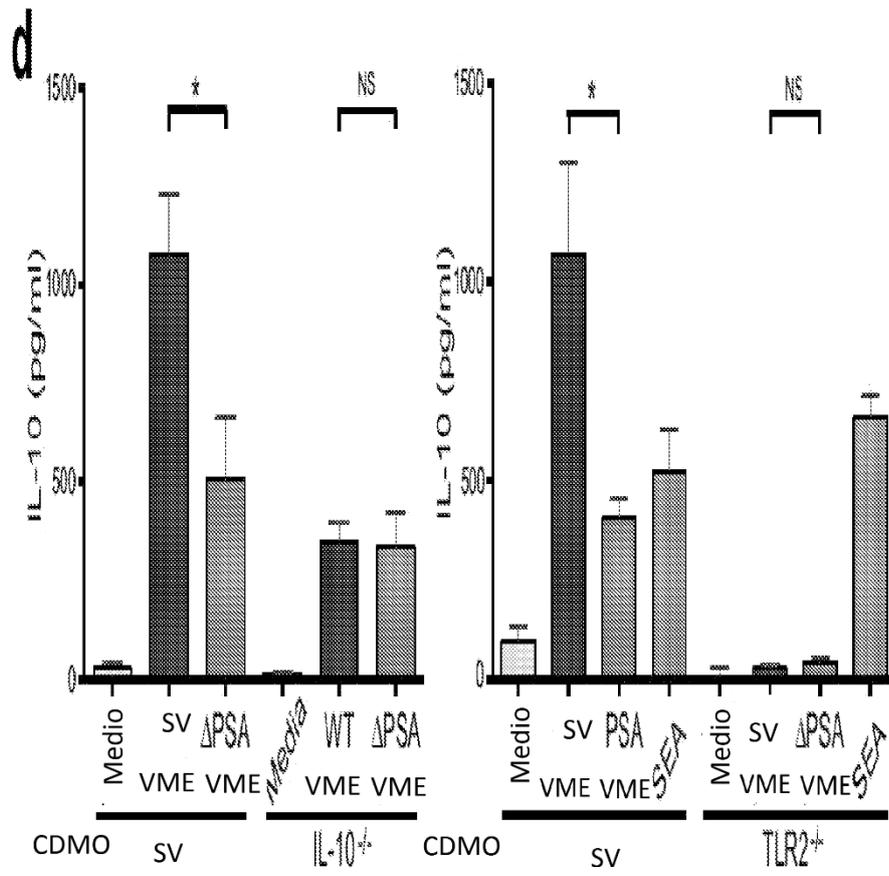


Figura 3D

**e**

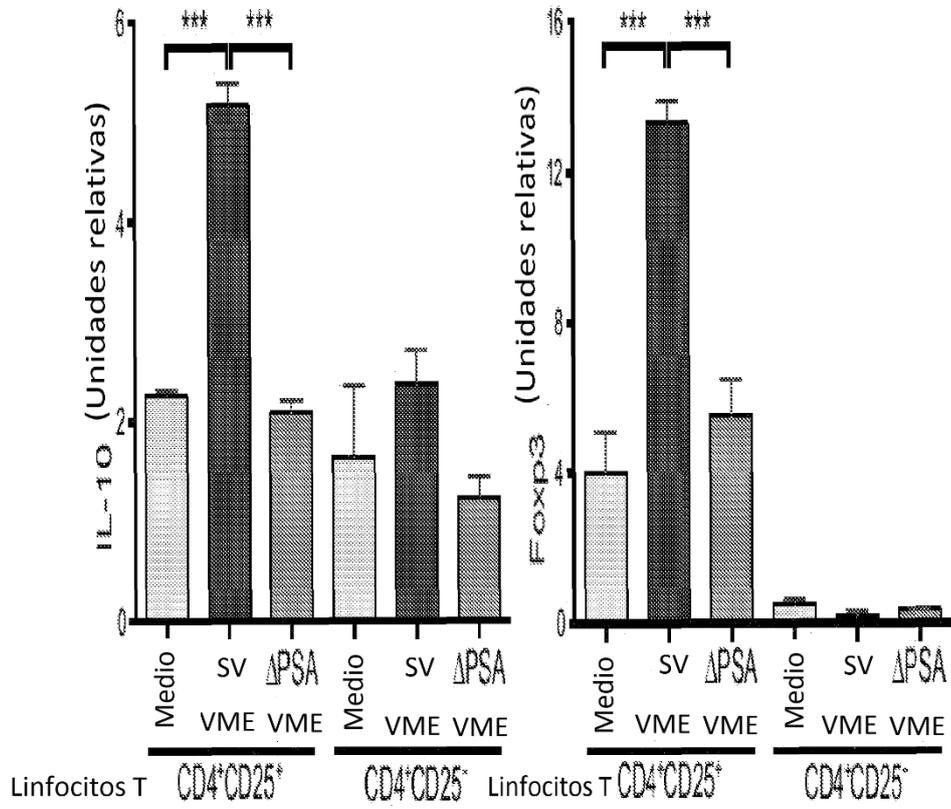


Figura 3E

**f**

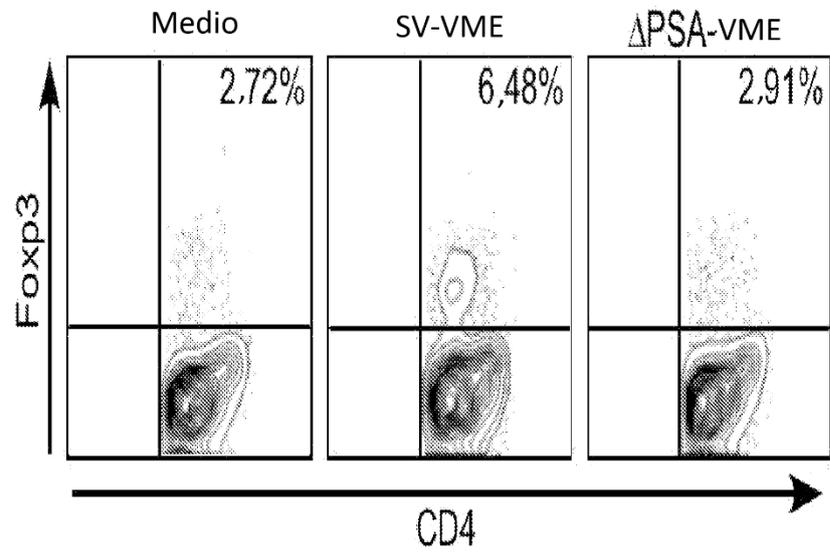


Figura 3F

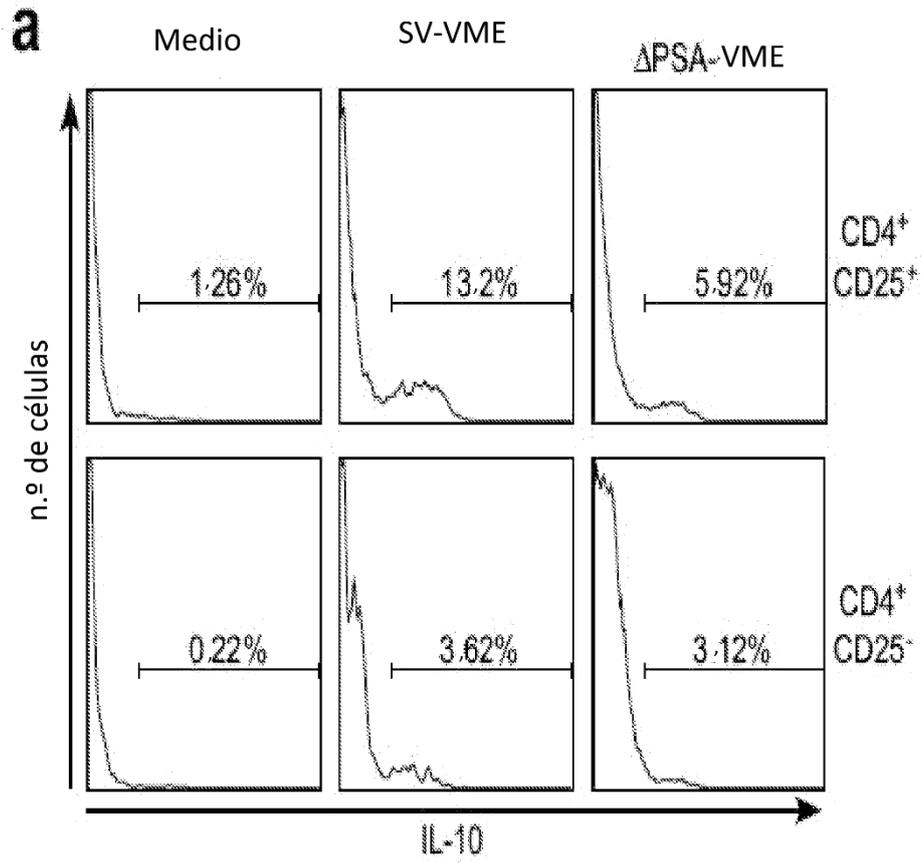


Figura 4A

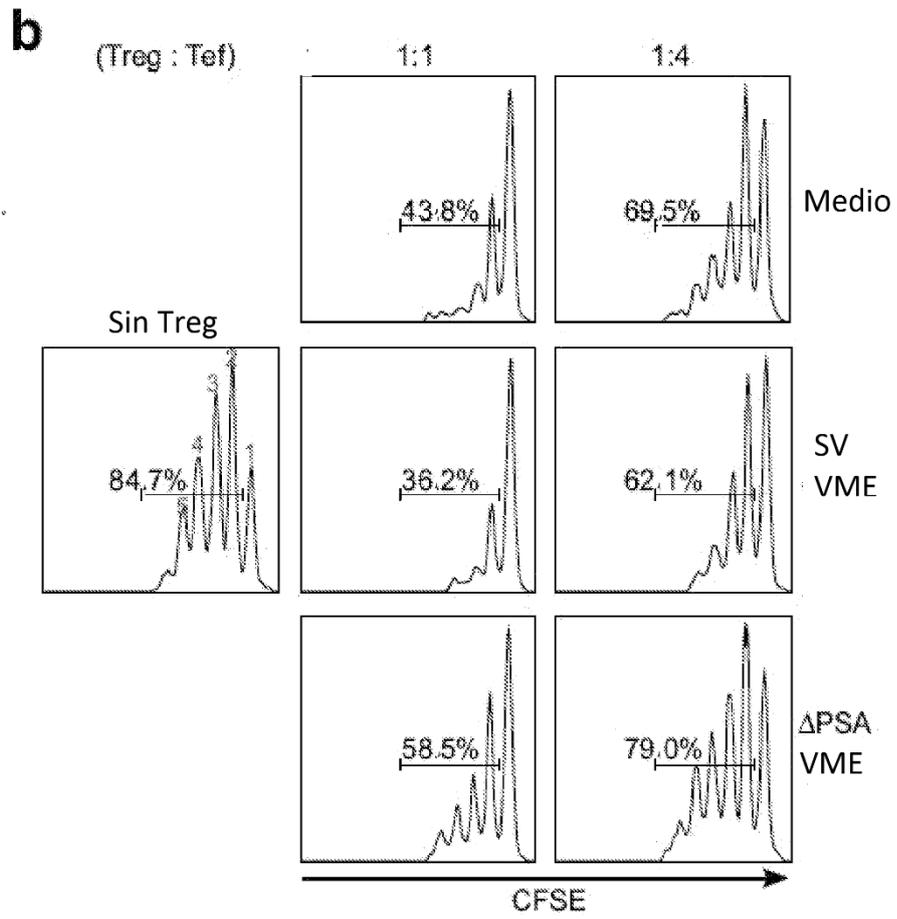


Figura 4B

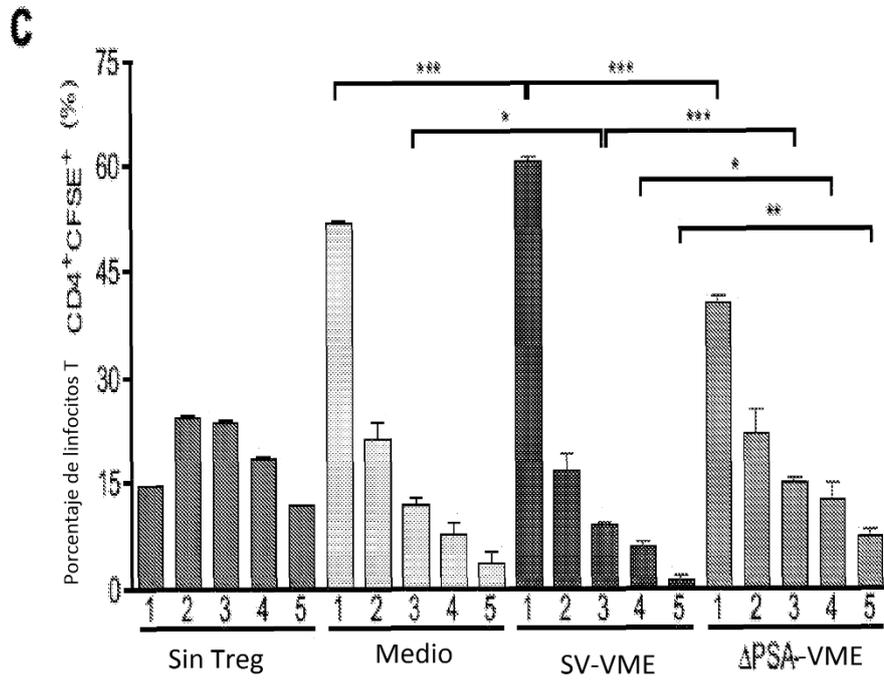


Figura 4C

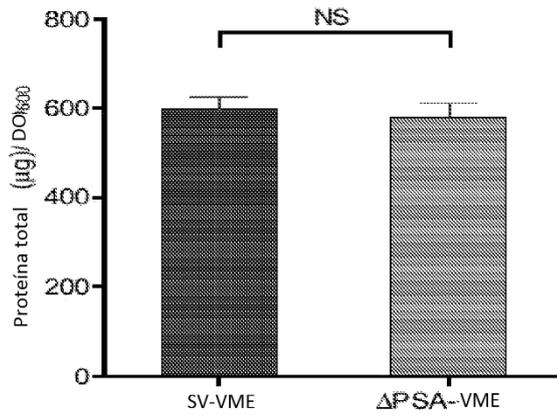


Figura 5

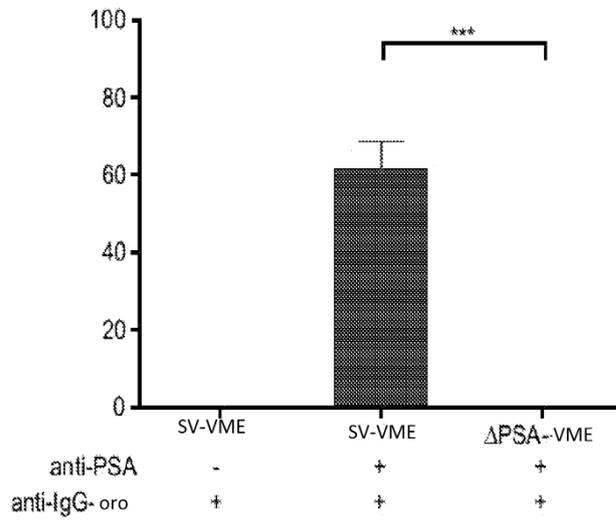


Figura 6

N.º	N.º Registro	Nombre proteína	SV-VME	$\Delta$ PSA-VME	
BF3567	gil60683022	proteína hipotética	864±58	452±65	**
BF2157	gil60681636	supuesta lipoproteína	647±45	630±37	NS
BF0595	gil60680161	proteína hipotética	341±25	296±16	NS
BF2161	gil60681640	proteína hipotética	213±24	85±5	**
BF2706	gil60682179	supuesta lipoproteína	178±18	128±12	NS
BF1956	gil60681445	supuesta proteína de la membrana externa	161±41	129±9	NS
BF0594	gil60680160	proteína hipotética	142±12	202±8	*
BF1957	gil60681446	proteína hipotética	134±10	157±17	NS
BF3067	gil60682536	supuesta lipoproteína	124±31	62±6	NS
BF0589	gil60680155	proteína hipotética	124±17	119±12	NS
BF3432	gil60682894	proteína hipotética	117±9	96±11	NS
BF2023	gil60681124	supuesta proteína de unión a ATP/GTP	117±13	74±1	*
BF1619	gil60681115	proteína hipotética	117±9	147±14	NS
BF3144	gil60682613	supuesta lipoproteína	107±22	110±14	NS

Figura 7

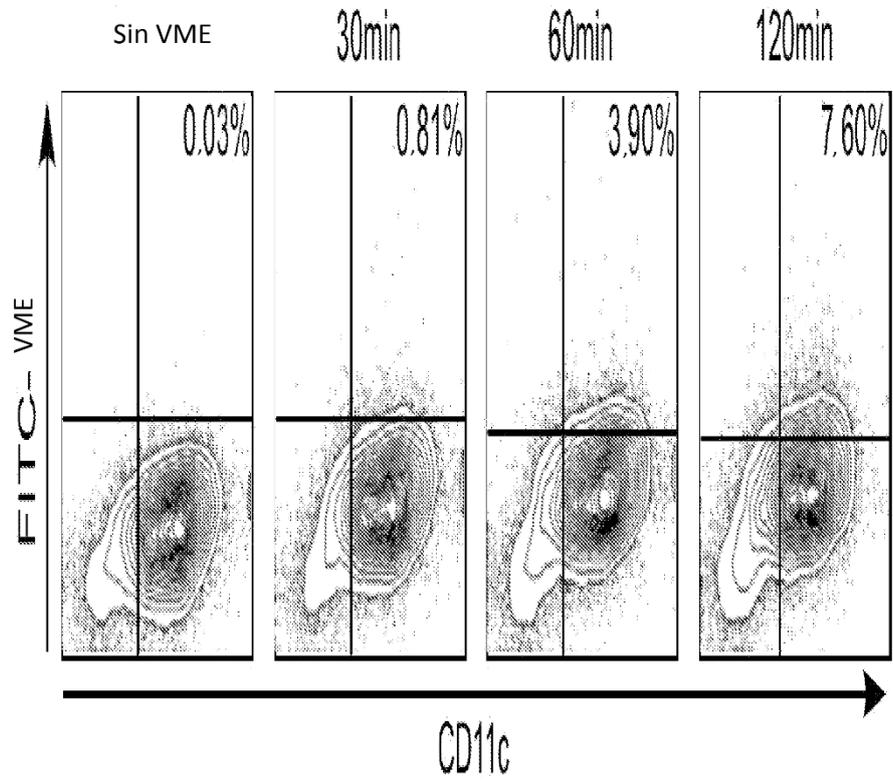


Figura 8

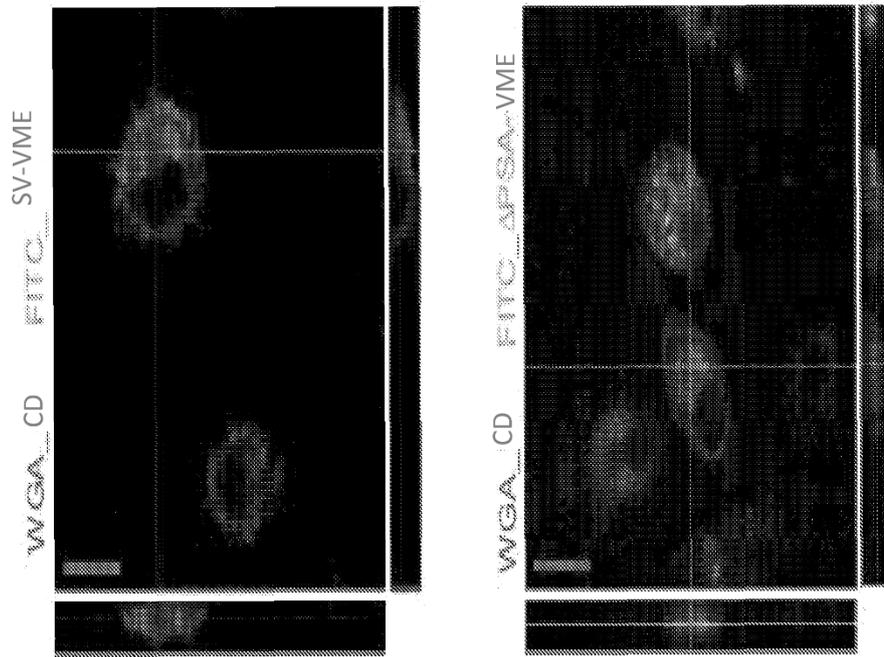


Figura 9

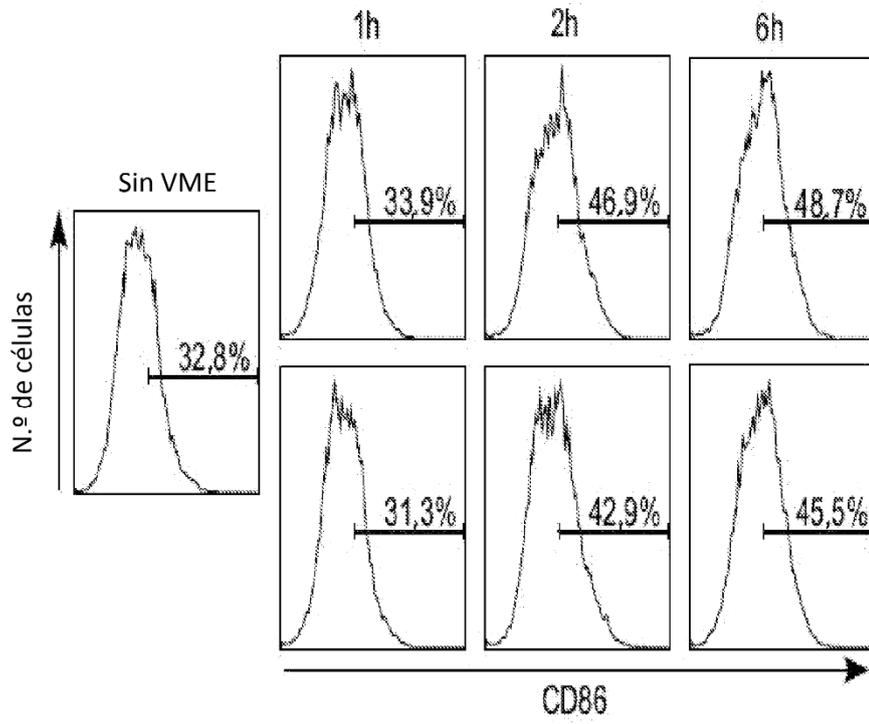


Figura 10

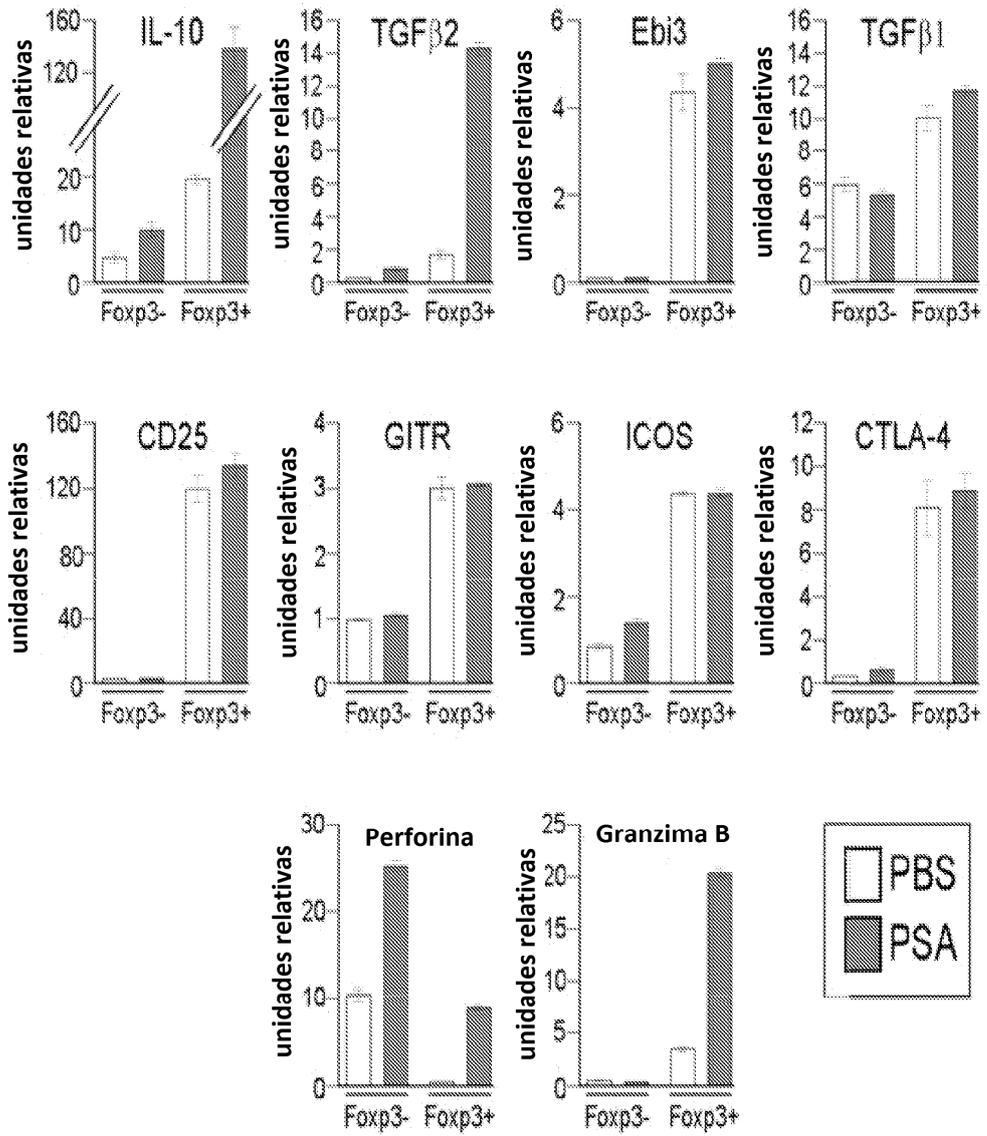


Figura 11