

SISTEMAS ACTIVOS DINÁMICOS ACROMOSÓMICOS**LISTADO DE SECUENCIAS**

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 10 de diciembre de 2019, se llama 51296-033W02_Sequence_Listing_12.10.19_ST25 y tiene un tamaño de 51,393 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

En el presente documento se proporcionan sistemas activos dinámicos acromosómicos y métodos para fabricarlos y usarlos.

ANTECEDENTES

Existe una necesidad de vectores de administración capaces de dirigirse a células y administrar agentes biológicos, composiciones que contengan dichos vectores de administración y métodos asociados para administrar dichos vectores a las células, modulando así los sistemas biológicos que incluyen células, tejidos y organismos de animales, plantas e insectos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona, entre otros, sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA), por ejemplo, SADA que comprenden una carga heteróloga, métodos para prepararlos, composiciones que los contienen y métodos asociados para administrar SADA y/o cargas y modular sistemas biológicos. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento del solicitante de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) que tienen, en determinadas realizaciones, actividad mejorada (es decir, SADA altamente activos). Estos SADA altamente activos tienen una elevada capacidad de trabajo, como trabajo químico, producción de proteínas o administración de una carga.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para fabricar una composición que comprende una pluralidad de SADA, estando la composición sustancialmente libre de células bacterianas viables, comprendiendo el método: (a) producir, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o la actividad de un factor de especificidad topológica de división celular; (b) exponer las bacterias parentales a condiciones que permitan la formación de una minicélula, produciendo así el SADA; y (c) separar el SADA de las bacterias parentales, produciendo así una composición que comprende una pluralidad de SADA que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido minE.

En algunas realizaciones, las bacterias parentales son *E. coli* y el polipéptido minE es minE de *E. coli*. En otras realizaciones, las bacterias parentales son *Salmonella typhimurium* y el polipéptido minE es minE de *S. typhimurium*.

En algunas realizaciones, las bacterias parentales tienen una reducción en el nivel o la actividad de una proteína de inhibición del anillo Z. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un

polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minC o un polipéptido minD.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, el SADA tiene una reducción en la expresión de al menos dos proteínas de inhibición del anillo Z, por ejemplo, una reducción en la expresión de un polipéptido minC y un polipéptido minD.

En algunas realizaciones, el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC, un polipéptido minD y un polipéptido minE.

En otras realizaciones del aspecto anterior, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 4, por ejemplo, al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido DivIVA.

En algunas realizaciones, las bacterias parentales son *Bacillus subtilis* y el factor de especificidad topológica de división celular es DivIVA de *B. subtilis*.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, la reducción del nivel o la actividad está provocada por una mutación de pérdida de función. En algunas realizaciones, la

mutación con pérdida de función es una delección del operón minCDE o una delección de DivIVA.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, la bacteria parental es una cualquiera de *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Aquifex*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Buchnera*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chromobacterium*, *Crocospaera*, *Dechloromonas*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotalea*, *Erwinia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Magnetospirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylococcus*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Nostoc*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Polaromonas*, *Prochlorococcus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Rubrivivax*, *Salmonella*, *Shewanella*, *Shigella*, *Sinorhizobium*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Thermotoga*, *Thermus*, *Thiobacillus*, *Trichodesmium*, *Vibrio*, *Wigglesworthia*, *Wolinella*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Deinococcus*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Moorella*, *Oceanobacillus*, *Symbiobacterium*, o *Thermoanaerobacter* y el factor de especificidad topológica de división celular es el minE o DivIVA endógeno de las bacterias parentales.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, la composición de la etapa (c) comprende menos de 100 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de células bacterianas viables, por ejemplo, menos de 10 UFC/ml, menos de 1 UFC/ml, o menos de 0.1 UFC/ml de células bacterianas viables.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, el SADA comprende una carga.

En algunas realizaciones del aspecto anterior, la composición se formula para su administración a un animal; se formula para su administración a una planta; se formula para su administración a un insecto y/o se formula como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel o una composición de gas.

En otro aspecto, la divulgación presenta una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en los que los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1 mM y en los que la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables. En algunas realizaciones, los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 2 mM o 2.5 mM.

En otro aspecto más, la divulgación presenta una composición que comprende una pluralidad de SADA altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 3 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En algunas realizaciones, la composición de SADA tiene una concentración inicial de ATP de al menos 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM.

En algunas realizaciones de la composición, la concentración de ATP del ADAS aumenta en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, al menos un 150 % o al menos un 200 % después de la incubación a 37 °C durante 12 horas.

En algunas realizaciones de la composición, los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en un nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular.

En otro aspecto más, la invención presenta una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde

los SADA no comprenden un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En otro aspecto más, la invención presenta una
5 composición que comprende una pluralidad de SADA, estando la composición sustancialmente libre de células bacterianas viables y produciéndose mediante un proceso que comprende:
(a) producir, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o
10 la actividad de un factor de especificidad topológica de división celular; (b) exponer las bacterias parentales a condiciones que permitan la formación de una minicélula, produciendo así el SADA altamente activo; y (c) separar el SADA de las bacterias parentales, produciendo así una
15 composición que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de
20 identidad con la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

25 En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido minE.

En algunas realizaciones, las bacterias parentales son *E. coli* y el polipéptido minE es minE de *E. coli*.

En algunas realizaciones, las bacterias parentales son
30 *Salmonella typhimurium* y el polipéptido minE es minE de *S. typhimurium*.

En algunas realizaciones, la bacteria parental es *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*,

Aquifex, Azoarcus, Azotobacter, Bordetella, Bradyrhizobium, Brucella, Buchnera, Burkholderia, Candidatus, Chromobacterium, Crocosphaera, Dechloromonas, Desulfitobacterium, Desulfotalea, Erwinia, Francisella, Fusobacterium, Gloeobacter, Gluconobacter, Helicobacter, Legionella, Magnetospirillum, Mesorhizobium, Methylococcus, Neisseria, Nitrosomonas, Nostoc, Photobacterium, Photorhabdus, Polaromonas, Prochlorococcus, Pseudomonas, Psychrobacter, Ralstonia, Rubrivivax, Salmonella, Shewanella, Shigella, Sinorhizobium, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Thermotoga, Thermus, Thiobacillus, Trichodesmium, Vibrio, Wigglesworthia, Wolinella, Xanthomonas, Xylella, Yersinia, Bacillus, Clostridium, Deinococcus, Exiguobacterium, Geobacillus, Lactobacillus, Lactobacillus, Moorella, Oceanobacillus, Symbiobacterium, o Thermoanaerobacter y el factor de especificidad topológica de división celular es el minE o DivIVA endógeno de las bacterias parentales.

En algunas realizaciones, los SADA parentales tienen una reducción en un nivel de una proteína de inhibición del anillo Z.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minC.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minD.

En algunas realizaciones, los SADA parentales tienen una reducción en la expresión de al menos dos proteínas de inhibición del anillo Z.

5 En algunas realizaciones, el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC y un polipéptido minD.

En algunas realizaciones, el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC, un polipéptido minD y un polipéptido minE.

10 En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 40 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

15 En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido DivIVA.

20 En algunas realizaciones, las bacterias parentales son *Bacillus subtilis* y el factor de especificidad topológica de división celular es DivIVA de *B. subtilis*.

En algunas realizaciones, la reducción del nivel o la actividad está provocada por una mutación de pérdida de función.

25 En algunas realizaciones, la mutación con pérdida de función es una delección de un gen.

30 En algunas realizaciones, la mutación con pérdida de función es una mutación con pérdida de función inducible y en la que la pérdida de función se induce al exponer la célula madre a una condición inductora.

En algunas realizaciones, la mutación de pérdida de función inducible es una mutación sensible a la temperatura

y en la que la condición inductora es una condición de temperatura.

En algunas realizaciones, la célula madre tiene una delección del operón minCDE.

5 En algunas realizaciones, los SADA comprenden un sistema de transcripción funcional y un sistema de traducción funcional.

En algunas realizaciones, el SADA produce una proteína heteróloga.

10 En algunas realizaciones, el SADA comprende un plásmido, comprendiendo el plásmido un promotor inducible y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga, y en donde el contacto del SADA con un inductor del promotor inducible en condiciones apropiadas da como
15 resultado la producción de la proteína heteróloga.

En algunas realizaciones, la producción de la proteína heteróloga aumenta al menos 1.6 veces en un SADA que se ha puesto en contacto con el inductor en relación con un SADA que no se ha puesto en contacto con el inductor.

20 En algunas realizaciones, la tasa de producción de la proteína heteróloga alcanza un nivel diana dentro de las 3 horas posteriores al contacto del SADA con el inductor.

En algunas realizaciones, la proteína heteróloga se produce a una velocidad de al menos 0.1 femtogramos por hora por SADA.
25

En algunas realizaciones, la proteína heteróloga se produce durante un período de al menos 8 horas.

En algunas realizaciones, la composición comprende menos de 100 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de células bacterianas viables.
30

En algunas realizaciones, la composición comprende menos de 10 UFC/ml, menos de 1 UFC/ml o menos de 0.1 UFC/ml de células bacterianas viables.

En algunas realizaciones, el SADA comprende una carga.

En algunas realizaciones, la carga es un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP).

En algunas realizaciones, la carga está encapsulada por el SADA.

En algunas realizaciones, la carga está anclada a la superficie del SADA.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ADN, un ARN o un plásmido.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una proteína.

En algunas realizaciones, la enzima altera un sustrato para producir un producto diana.

En algunas realizaciones, el sustrato está presente en el SADA y en donde el producto diana se produce en el SADA.

En algunas realizaciones, el sustrato está presente en una célula o entorno diana al que se administra el SADA.

En algunas realizaciones, el ADAS comprende un sistema de secreción bacteriano.

En algunas realizaciones, el sistema de secreción bacteriano heterólogo es un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS).

En algunas realizaciones, la carga comprende un resto que dirige la exportación por el sistema de secreción bacteriano.

En algunas realizaciones, el SADA comprende un resto de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es un nanocuerpo, una proteína de unión a carbohidratos o un péptido de direccionamiento a tumores.

5 En algunas realizaciones, el ADAS tiene un nivel o actividad de proteasa reducido en relación con un SADA producido a partir de una bacteria parental de tipo silvestre.

10 En algunas realizaciones, los SADA se producen a partir de bacterias parentales que se han modificado para reducir o eliminar la expresión de al menos una proteasa.

En algunas realizaciones, el ADAS tiene un nivel o actividad de ribonucleasa reducido en relación con un SADA producido a partir de una bacteria parental de tipo silvestre.

15 En algunas realizaciones, los SADA se producen a partir de bacterias parentales que se han modificado para reducir o eliminar la expresión de al menos una ribonucleasa.

En algunas realizaciones, la ribonucleasa es una endorribonucleasa o una exorribonucleasa.

20 En algunas realizaciones, el SADA se ha modificado para tener lipopolisacárido (LPS) reducido.

En algunas realizaciones, los SADA se producen a partir de bacterias parentales que se han modificado para tener LPS reducido.

25 En algunas realizaciones, la modificación es una mutación en miristoiltransferasa de biosíntesis de lípido A (msbB).

30 En algunas realizaciones, los SADA provienen de bacterias parentales que son patógenas de mamíferos o de bacterias parentales que son comensales para mamíferos.

En algunas realizaciones, las bacterias comensales de mamíferos son especies de *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* o *Actinomyces*, o las bacterias

patógenas de mamíferos son *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* o *Helicobacter pylori*.

5 En algunas realizaciones, los SADA provienen de bacterias parentales que son patógenos vegetales o de bacterias parentales que son comensales para las plantas.

En algunas realizaciones, las bacterias comensales de plantas son *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas putida* o las bacterias patógenas de plantas son especies de *Xanthomonas* o *Pseudomonas syringae*.

10 En algunas realizaciones, los SADA provienen de bacterias parentales auxótrofas.

En algunas realizaciones, los SADA se liofilizan y reconstituyen, y en donde los SADA reconstituidos tienen una concentración de ATP que es al menos el 95 % de la concentración de ATP de un SADA que no se ha liofilizado.

15 En algunas realizaciones, los SADA reconstituidos tienen una concentración de ATP que es al menos igual a la concentración de ATP de un SADA que no se ha liofilizado.

20 En algunas realizaciones, la composición se formula para la administración a un animal.

En algunas realizaciones, la composición se formula para administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, oral, tópica, en aerosol o nebulizada.

25 En algunas realizaciones, la composición se formula para la administración a una planta.

En algunas realizaciones, la composición se formula para la administración a un insecto.

30 En algunas realizaciones, la composición se formula como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel o una composición gaseosa.

En otro aspecto, la invención presenta un método para administrar un SADA altamente activo a una célula diana,

comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

En otro aspecto más, la invención presenta un método para administrar un SADA a una célula diana, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

En algunas realizaciones con respecto al método para administrar tal pluralidad de SADA, la célula diana es una célula animal, una célula vegetal o una célula de insecto.

En otro aspecto más, la invención presenta un método para administrar una carga a una célula diana, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM, los SADA comprenden una carga y la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

En otro aspecto más, la invención presenta un método para administrar una carga a una célula diana, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción

en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular, el SADA comprende una carga, y la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

En realizaciones relacionadas con la administración de una carga, la célula diana es una célula animal, una célula vegetal o una célula de insecto.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula animal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula animal con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula un estado de la célula animal.

En otro aspecto más, el método presenta un método para modular un estado de una célula vegetal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula vegetal con la composición de la etapa (a), por lo que se modula un estado de la célula vegetal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula de insecto, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una

concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula de insecto con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula un estado de la célula de insecto.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula animal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula animal con la composición de la etapa (a) mediante lo cual se modula un estado de la célula animal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula vegetal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula de la planta con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula un estado de la célula vegetal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula de insecto, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad

topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula de insecto con la composición de la etapa (a) mediante lo cual se modula un estado de la célula de insecto, mediante lo cual se modula un estado de la célula del insecto.

En otro aspecto más, la invención presenta un método para tratar a un animal que lo necesita, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto al animal con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así al animal.

En otro aspecto más, la invención presenta un método para tratar a un animal que lo necesita, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto al animal con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así al animal.

En algunas realizaciones del tratamiento del animal, el animal tiene cáncer.

En algunas realizaciones, el SADA lleva una carga de quimioterapia (por ejemplo, una carga de inmunoterapia).

En otro aspecto más, la invención presenta un método para tratar a una planta que lo necesita, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una

pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto a la planta o a una plaga de la misma con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así a la planta.

En otro aspecto más, la invención presenta un método para tratar a una planta que lo necesita, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto a la planta o a una plaga de la misma con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así a la planta.

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA comprenden una enzima y en donde la enzima altera un sustrato para producir un producto diana.

En algunas realizaciones de esta composición, el sustrato está presente en el SADA y en donde el producto diana se produce en el SADA.

En algunas realizaciones, el sustrato está presente en una célula o entorno diana al que se administra el SADA.

En algunas realizaciones, la enzima es diadenilato ciclase A, el sustrato es ATP y el producto diana es di-AMP cíclico.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1A es un conjunto de micrografías electrónicas de barrido que muestran células bacterianas parentales de *E. coli* y células activas dinámicas acromosómicas (SADA) que provienen de las mismas. La columna de la izquierda muestra células bacterianas de la cepa de *E. coli* MACH009, que no ha sido modificada para producir SADA. La columna del centro muestra células bacterianas de la cepa de *E. coli* MACH060 ($\Delta minCDE$), que ha sido modificada para producir SADA. Son visibles los SADA y las células parentales que experimentan eventos de tabicación anómalos. La columna de la derecha muestra el SADA purificado del cultivo MACH060 ($\Delta minCDE$).

La Fig. 1B es un conjunto de microfotografías que muestran SADA que provienen de MACH060 ($\Delta minCDE$). El panel de la izquierda es una imagen de contraste de fase que muestra la ubicación de las partículas. El panel central es una imagen de inmunofluorescencia que muestra la localización de la tinción de ADN con DAPI. El panel derecho es una imagen de inmunofluorescencia que muestra una tinción para el lipopolisacárido (LPS). Las flechas blancas indican SADA, que se identifican por la presencia de la tinción de LPS y la ausencia de la tinción con DAPI. Las barras de escala son 10 μm .

La Fig. 1C es un gráfico que muestra la concentración (en partículas/ml) de partículas de un diámetro determinado en una población purificada de SADA de la cepa de *E. coli* MACH124 ($\Delta minCDE$) productora de SADA, medida con un analizador de nanopartículas Spectradyne® nCS1.

La Fig. 1D es un gráfico de barras que muestra el volumen agregado de partículas entre 200 y 2000 nm de diámetro en la preparación de SADA purificada.

La Fig. 1E es un gráfico de barras que muestra la concentración en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de células bacterianas viables presentes en un cultivo de MACH124 ($\Delta minCDE$) y en una preparación de SADA purificada del cultivo.

La Fig. 1F es una imagen de una inmunotransferencia para DnaK y GroEL en cultivos de las cepas de *E. coli* productoras de SADA MACH060 y MACH200 (ambas $\Delta minCDE$) y en preparaciones de SADA purificadas de cada cultivo. Se proporcionan 10 ng de DnaK y GroEL purificados como controles (Prot. Recomb.).

La Fig. 2A es un gráfico de barras que muestra la concentración media de ATP en mMol en una población purificada de SADA de la cepa de *E. coli* MACH060 ($\Delta minCDE$), medida usando el ensayo de viabilidad celular microbiana BacTiter-Glo™. La concentración de ATP generada por las bacterias parentales se restó como fondo.

La Fig. 2B es un gráfico de barras que muestra la luminiscencia en una alícuota de una población purificada de SADA de la cepa de *E. coli* MACH060 ($\Delta minCDE$) a las 0 horas o después de 2 horas de incubación con agitación a 37 °C en presencia de exceso de nutrientes. medido con el ensayo de viabilidad celular microbiana BacTiter-Glo™.

La Fig. 2C es un gráfico que muestra la fluorescencia de GFP (ua) a lo largo del tiempo en el cultivo de MACH124 ($\Delta minCDE$) y en preparaciones de SADA purificadas del cultivo que se han incubado en presencia o ausencia del inductor anhidrotetraciclina (100 ng/ml), que activa expresión de GFP. Todas las muestras se cultivaron en presencia de antibiótico para prevenir cualquier crecimiento bacteriano. La concentración de bacterias parentales fue equivalente al número de UFC detectadas en la preparación de SADA (100 UFC/ml).

La Fig. 2D es un gráfico que muestra los datos de fluorescencia de GFP de la figura 2C normalizados al número de SADA en la preparación, medido usando un analizador de nanopartículas Spectradyme® nCS1. Los datos se muestran en el gráfico como veces de inducción por 10^8 partículas de SADA.

La Fig. 2E es un gráfico que muestra el múltiplo de variación en la fluorescencia de GFP entre las preparaciones de SADA inducidas y no inducidas de la Fig. 2C. El múltiplo de variación se calculó dividiendo el valor medio de la réplica inducida entre el valor medio de la réplica no inducida.

La Fig. 2F es un conjunto de imágenes de una inmunotransferencia para GFP en alícuotas de 250 μ l de una preparación de SADA purificada de MACH124 ($\Delta minCDE$) y cultivada en presencia del inductor anhidrotetraciclina durante 0, 2, 4, 17 o 24 horas (panel superior). Cada carril se corresponde con aproximadamente 5.2×10^7 SADA según lo determinado por el análisis nCS1. La intensidad de GFP se cuantificó por densitometría, se normalizó a la intensidad del control de carga GroEL y se convirtió en masa de GFP (en ng) por comparación con un estándar molecular de GFP recombinante purificada procesada en la misma transferencia (panel inferior).

La Fig. 3A es un gráfico que muestra la fluorescencia de GFP (ua) por 10^8 partículas de SADA a lo largo del tiempo en preparaciones de SADA purificadas a partir de cepas bacterianas parentales MACH124 ($\Delta minCDE$), MACH556 ($\Delta minC$) y MACH557 ($\Delta minD$) de *E. coli*. Los SADA se incubaron en presencia o ausencia del inductor anhidrotetraciclina (100 ng/ml), que activa la expresión de GFP. La fluorescencia de GFP se calculó restando el valor medio de las réplicas no inducidas de cada réplica inducida. Todas las muestras se

cultivaron en presencia de antibiótico para prevenir cualquier crecimiento bacteriano.

La Fig. 3B es un gráfico que muestra el múltiplo de variación en la fluorescencia de GFP entre las preparaciones de SADA inducidas y no inducidas de la Fig. 3A. El múltiplo de variación se calculó dividiendo el valor medio de la réplica inducida entre el valor medio de la réplica no inducida.

La Fig. 3C es una imagen de una inmunotransferencia para GFP en SADA purificado a partir de MACH124 ($\Delta minCDE$), MACH556 ($\Delta minC$) y MACH557 ($\Delta minD$) y cultivada en presencia (+) o ausencia (-) del inductor de anhidrotetraciclina.

La Fig. 3D es un gráfico de barras que muestra la corrección de fondo para la inmunotransferencia de la Fig. 3C.

La Fig. 3E es un gráfico de barras que muestra la densidad de GFP normalizada para la inmunotransferencia de la Fig. 3C. La intensidad de GFP se cuantificó por densitometría y se normalizó a la intensidad del control de carga GroEL.

La Fig. 3F es un gráfico de barras que muestra la producción total de GFP en unidades de fluorescencia (ua) en SADA purificado a partir de MACH124 ($\Delta minCDE$), MACH556 ($\Delta minC$) y MACH557 ($\Delta minD$) medida usando un lector de microplacas BioTek®. ** indica un p-valor de 0.0021. *** indica un p-valor de 0.0006.

La Fig. 3G es un gráfico de barras que muestra la producción de GFP por hora en SADA purificado a partir de MACH124 ($\Delta minCDE$), MACH556 ($\Delta minC$) y MACH557 ($\Delta minD$).

La Fig. 3H es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de producción de GFP en SADA purificado a partir de MACH556 ($\Delta minC$) y MACH557 ($\Delta minD$) en relación con SADA producido a partir de MACH124 ($\Delta minCDE$). El nivel de producción de proteína de MACH124 se estableció en 100 %, y

la producción de proteína relativa para MACH556 y MACH557 se normalizó a MACH124.

La Fig. 4 es un gráfico de barras que muestra la fluorescencia de un fluoróforo DyLight™ 550 para SADA purificado a partir de MACH060 y MACH284 normalizado a la densidad óptica del cultivo (D0600). MACH284 expresa una proteína de fusión Neae-NB2 (nanocuerpo) detectable por un anticuerpo conjugado con el fluoróforo DyLight™ 550.

La Fig. 5A es un gráfico de barras que muestra la lectura de luminiscencia del sistema THP1-Dual™ en monocitos THP1-Dual™ en contacto con SADA purificado de MACH060, SADA no inducido purificado de MACH198 y SADA purificado de MACH198 que han sido inducidos con anhidrotetraciclina para producir la enzima. deadenilato ciclasa A (DacA).

La Fig. 5B es un conjunto de micrografías que muestran el fenotipo de monocitos THP1-Dual™ en contacto con SADA purificado de MACH060, SADA no inducido purificado de MACH198 y SADA purificado de MACH198 que han sido inducidos con anhidrotetraciclina para producir la enzima DacA.

La Fig. 5C es un gráfico de barras que muestra la concentración de interferón beta (IFN-B1) en pg/ml secretado en cultivo por monocitos THP1-Dual™ en contacto con SADA purificado de MACH060, SADA no inducido purificado de MACH198 y SADA purificado de MACH198 que se ha inducido con anhidrotetraciclina para producir la enzima DacA, medida mediante un ensayo ELISA.

La Fig. 6 es un conjunto de microfotografías que muestran la fluorescencia de SADA marcado con éster de NHS DyLight™ 800 que proviene de MACH301 en larvas del barrenador europeo del maíz (ECB). Los paneles A y B muestran la fluorescencia de DyLight™ 800. Los paneles C y D muestran autofluorescencia larvaria a 700 nm. Los paneles A y C muestran las larvas de control alimentadas con PBS, y los

paneles B y D muestran las larvas alimentadas con el SADA
marcado con éster de NHS DyLight™ 800.

La Fig. 7A es un gráfico que muestra la fluorescencia de
GFP (ua) por 10^8 partículas de SADA a lo largo del tiempo
en preparaciones de SADA purificadas a partir de una cepa
bacteriana parental de *E. coli* MACH124 ($\Delta minCDE$), en la que
la preparación de SADA se almacenó a 4 °C durante 0 días de
3 días. Los SADA se incubaron en presencia o ausencia del
inductor anhidrotetraciclina (100 ng/ml), que activa la
expresión de GFP. La fluorescencia de GFP se calculó
restando el valor medio de las réplicas no inducidas de
cada réplica inducida. Todas las muestras se cultivaron en
presencia de antibiótico para prevenir cualquier
crecimiento bacteriano.

La Fig. 7B es un gráfico que muestra la fluorescencia de
GFP (ua) por 10^8 partículas de SADA a lo largo del tiempo
en preparaciones de SADA purificadas a partir de una cepa
bacteriana parental de *E. coli* MACH556 ($\Delta minC$), en la que
la preparación de SADA se almacenó a 4 °C durante 0 días de
3 días. Los SADA se incubaron en presencia o ausencia del
inductor anhidrotetraciclina (100 ng/ml), que activa la
expresión de GFP. La fluorescencia de GFP se calculó
restando el valor medio de las réplicas no inducidas de
cada réplica inducida. Todas las muestras se cultivaron en
presencia de antibiótico para prevenir cualquier
crecimiento bacteriano.

La Fig. 7C es un gráfico que muestra la fluorescencia de
GFP (ua) por 10^8 partículas de SADA a lo largo del tiempo
en preparaciones de SADA purificadas a partir de una cepa
bacteriana parental de *E. coli* MACH557 ($\Delta minD$), en la que
la preparación de SADA se almacenó a 4 °C durante 0 días de
3 días. Los SADA se incubaron en presencia o ausencia del
inductor anhidrotetraciclina (100 ng/ml), que activa la

expresión de GFP. La fluorescencia de GFP se calculó
restando el valor medio de las réplicas no inducidas de
cada réplica inducida. Todas las muestras se cultivaron en
presencia de antibiótico para prevenir cualquier
crecimiento bacteriano.

La Fig. 7D es un gráfico que muestra el múltiplo de
variación en la fluorescencia de GFP entre las
preparaciones de SADA inducidas y no inducidas de la Fig.
7A. El múltiplo de variación se calculó dividiendo el valor
medio de la réplica inducida entre el valor medio de la
réplica no inducida.

La Fig. 7E es un gráfico que muestra el múltiplo de
variación en la fluorescencia de GFP entre las
preparaciones de SADA inducidas y no inducidas de la Fig.
7B. El múltiplo de variación se calculó dividiendo el valor
medio de la réplica inducida entre el valor medio de la
réplica no inducida.

La Fig. 7F es un gráfico que muestra el múltiplo de
variación en la fluorescencia de GFP entre las
preparaciones de SADA inducidas y no inducidas de la Fig.
7C. El múltiplo de variación se calculó dividiendo el valor
medio de la réplica inducida entre el valor medio de la
réplica no inducida.

La Fig. 7G es un gráfico que muestra la fluorescencia de
GFP (ua) por 10^8 partículas de SADA a lo largo del tiempo
en preparaciones de SADA purificadas a partir de una cepa
bacteriana parental de *E. coli* MACH124 ($\Delta minCDE$), en la que
la preparación de SADA se liofilizó, almacenó durante 6
semanas y se rehidrató. Los SADA se incubaron en presencia
o ausencia del inductor anhidrotetraciclina (100 ng/ml),
que activa la expresión de GFP. La fluorescencia de GFP se
calculó restando el valor medio de las réplicas no
inducidas de cada réplica inducida. Todas las muestras se

cultivaron en presencia de antibiótico para prevenir cualquier crecimiento bacteriano.

La Fig. 7H es un gráfico que muestra el múltiplo de variación en la fluorescencia de GFP entre las preparaciones de SADA inducidas y no inducidas de la Fig. 7G. El múltiplo de variación se calculó dividiendo el valor medio de la réplica inducida entre el valor medio de la réplica no inducida.

La Fig. 8A es un gráfico de barras que muestra el número de células bacterianas parentales (en UFC/ml) en preparaciones de SADA purificadas a partir de la línea celular bacteriana parental de *E. coli* de control MACH060 o la línea celular bacteriana parental auxótrofa de *E. coli* MACH002 almacenada en medios libres de histidina y metionina.

La Fig. 8B es un gráfico de barras que muestra el número de células bacterianas parentales (en UFC/ml) en preparaciones de SADA purificadas a partir de la línea celular bacteriana parental de *E. coli* de control MACH178 o la línea celular bacteriana parental auxótrofa de *E. coli* MACH151 almacenada en medios libres de leucina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Como se usa en este documento, la expresión "sistema dinámico acromosómico" o "SADA" se refiere a un sistema de membrana cerrada, no replicable, libre de genoma que comprende al menos una membrana y que tiene un volumen interior adecuado para contener una carga (por ejemplo, una o más de un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP)). En algunas realizaciones, los

SADA son minicélulas o minicélulas modificadas que provienen de una célula bacteriana parental (por ejemplo, una célula bacteriana Gram negativa o Gram positiva). El SADA puede provenir de bacterias parentales usando cualquier método adecuado, por ejemplo, manipulación genética de la célula parental o exposición a un cultivo o afección que aumente la probabilidad de formación de minicélulas bacterianas. Los métodos ilustrativos para preparar SADA son aquellos que alteran la maquinaria de división celular de la célula parental. En algunas realizaciones, el SADA puede comprender una o más características endógenas o heterólogas de la superficie de la célula parental, por ejemplo, paredes celulares, modificaciones de la pared celular, flagelos o pili y/o una o más características endógenas o heterólogas del volumen interior de la célula parental, por ejemplo, ácidos nucleicos, plásmidos, proteínas, moléculas pequeñas, maquinaria de transcripción o maquinaria de traducción. En otras realizaciones, el SADA puede carecer de una o más características de la célula parental. En otras realizaciones más, el SADA puede cargarse o modificarse de otro modo con una característica no comprendida por la célula parental.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "SADA altamente activo" se refiere a un SADA que tiene un alto potencial de trabajo, por ejemplo, un SADA que tenga la capacidad de realizar una cantidad significativa de trabajo útil. El trabajo puede ser metabólico, incluida la síntesis química (por ejemplo, de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, polímeros o moléculas pequeñas), modificación química (por ejemplo, de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, polímeros o moléculas pequeñas), o transporte (por ejemplo, importación, exportación o secreción) en condiciones adecuadas. En

ciertas realizaciones, los SADA altamente activos comienzan con una gran reserva de energía, por ejemplo, energía en forma de ATP. En otras realizaciones, el SADA tiene la capacidad de absorber o generar energía/ATP de otra fuente.

5 Los SADA altamente activos pueden identificarse, por ejemplo, por tener una mayor concentración de ATP, una mayor capacidad para generar ATP, una mayor capacidad para producir una proteína, una mayor velocidad o cantidad de producción de una proteína y/o una mayor capacidad de respuesta a una

10 señal biológica, por ejemplo, inducción de un promotor.

Como se usa en el presente documento, el término "célula bacteriana parental" se refiere a una célula (por ejemplo, una célula bacteriana Gram negativa o Gram positiva) de la que proviene un SADA. Las células bacterianas parentales son típicamente células bacterianas viables. La expresión

15 "célula bacteriana viable" se refiere a una célula bacteriana que contiene un genoma y es capaz de división celular. Las células bacterianas parentales preferidas provienen de cualquiera de las cepas de la Tabla 4.

Una composición o preparación de SADA que está "sustancialmente libre de" células bacterianas parentales y/o células bacterianas viables se define en el presente documento como una composición que no tiene más de 500, por ejemplo, 400, 300, 200, 150, 100 o menos unidades formadoras

20 de colonias (UFC) por ml. Una composición de SADA que está sustancialmente libre de células bacterianas parentales o células bacterianas viables puede incluir menos de 50, menos de 25, menos de 10, menos de 5, menos de 1, menos de 0.1 o menos de 0.001 UFC/ml, sin incluir células bacterianas.

La expresión "factor de especificidad topológica de división celular" se refiere a un componente de la maquinaria de división celular en una especie bacteriana que está involucrado en la determinación del sitio del tabique y

30

funciona restringiendo la ubicación de otros componentes de la maquinaria de división celular, por ejemplo, restringiendo la ubicación de una o más proteínas de inhibición del anillo Z. Los factores de especificidad topológica de división celular ilustrativos incluyen *minE*,
5 que se descubrió por primera vez en *E. coli* y desde entonces se ha identificado en una amplia gama de especies de bacterias Gram negativas y especies de bacterias Gram positivas (Rothfield *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, 3:
10 959-968, 2005). *minE* funciona restringiendo las proteínas de inhibición del anillo Z *minC* y *minD* a los polos de la célula. Un segundo factor de especificidad topológica de división celular ilustrativo es *DivIVA*, que se descubrió por primera vez en *Bacillus subtilis* (Rothfield *et al.*, *Nature Reviews*
15 *Microbiology*, 3: 959-968, 2005).

La expresión "proteína de inhibición del anillo Z" se refiere a un componente de la maquinaria de división celular en una especie bacteriana que participa en la determinación del sitio del tabique y funciona inhibiendo la formación de
20 un anillo FtsZ estable o anclando dicho componente a una membrana. La localización de las proteínas de inhibición del anillo Z puede modularse mediante factores de especificidad topológica de división celular, por ejemplo, *MinE* y *DivIVA*. Las proteínas de inhibición del anillo Z ilustrativas
25 incluyen *minC* y *minD*, que se descubrieron por primera vez en *E. coli* y desde entonces se han identificado en una amplia gama de especies de bacterias Gram negativas y especies de bacterias Gram positivas (Rothfield *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, 3: 959-968, 2005). En *E. coli* y en otras
30 especies, *minC*, *minD* y *minE* están en el mismo locus genético, al que se puede hacer referencia como el "operón *min*", el operón *minCDE* o el locus genético *min* o *minCDE*.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica celular" se refiere a una reducción general de cualquiera de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, en el nivel o actividad del factor de especificidad topológica celular (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectado por métodos estándar, en comparación con el nivel en una muestra de referencia (por ejemplo, un SADA producido a partir de una célula de tipo silvestre o una célula que tiene un operón *minCDE* o un gen *divIVA* de tipo silvestre), una célula de referencia (por ejemplo, una célula de tipo silvestre o una célula que tiene un gen u operón *minC*, *minD*, *minE*, *divIVA* o *minCDE* de tipo silvestre), una muestra de control o una célula de control. En algunas realizaciones, un nivel o actividad reducido se refiere a una disminución en el nivel o actividad en la muestra que es al menos aproximadamente 0.9 veces, 0.8 veces, 0.7 veces, 0.6 veces, 0.5 veces, 0.4 veces, 0.3 veces, 0.2 veces, 0.1 veces, 0.05 veces o 0.01 veces el nivel o la actividad del factor de especificidad topológica celular en una muestra de referencia, célula de referencia, muestra de control o célula de control.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad" se refiere al porcentaje (%) de identidad de secuencia con respecto a un polinucleótido de referencia o secuencia de polipéptido después del alineamiento mediante técnicas convencionales. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico se puede lograr de varias formas que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica, por ejemplo, usando el programa informático disponible públicamente como BLAST, BLAST-2,

PSI-BLAST o Megalign. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, los valores porcentuales de identidad de secuencia se pueden generar usando el programa informático de comparación de secuencias BLAST. Como ilustración, el porcentaje de identidad de secuencia de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, A, con, o contra un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, B, (que, como alternativa, se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico o de aminoácido dada, A que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia con, o contra un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada, B) se calcula de la siguiente manera:

100 multiplicado por (la fracción X/Y)

donde X es el número de nucleótidos o aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por un programa de alineación de secuencia (por ejemplo, BLAST) en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de nucleótidos o aminoácidos en B. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia, por ejemplo, en homólogos de proteínas MinE o DivIVA tendrá al menos aproximadamente 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o incluso 95 % o más de aminoácidos o identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa, al menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico con una secuencia natural de MinE (o *minE*) o DivIVA (o *divIVA*) como se desvela en el presente documento.

La expresión "modular un estado de una célula" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio

observable en el estado (por ejemplo, el transcriptoma, proteoma, epigenoma, efecto biológico o estado de salud o enfermedad) de la célula (por ejemplo, una célula de animal, planta o insecto) según se mide usando técnicas y métodos conocidos en la materia para tal medición, por ejemplo, métodos para medir el nivel o expresión de una proteína, una transcripción, una marca epigenética o para medir el aumento o reducción de la actividad de una vía biológica. Modular el estado de la célula puede dar como resultado un cambio de al menos el 1 % con respecto a antes de la administración (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o al menos el 98 % o más con respecto a antes de la administración; por ejemplo, hasta el 100 % con relación a antes de la administración). En algunas realizaciones, modular el estado de la célula implica aumentar un parámetro (por ejemplo, el nivel o expresión de una proteína, una transcripción o la actividad de una vía biológica) de la célula. Aumentar el estado de la célula puede dar como resultado un aumento del parámetro en al menos el 1 % con respecto a antes de la administración (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o al menos el 98 % o más con respecto a antes de la administración; por ejemplo, hasta el 100 % con relación a antes de la administración). En otras realizaciones, modular el estado de implica aumentar un parámetro (por ejemplo, el nivel o expresión de una proteína, una transcrito o la actividad de una vía biológica) de la célula. Reducir el estado de la célula puede dar como resultado una reducción del parámetro en al menos el 1 % con respecto a antes de la administración (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o al menos el 98 % o más

con respecto a antes de la administración; por ejemplo, hasta el 100 % con relación a antes de la administración).

Tal como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" significa no natural para una célula o composición en su estado de origen natural. En algunas realizaciones, "heterólogo" se refiere a una molécula; por ejemplo, una carga o carga útil (por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico como un ARN o ARNt que codifica una proteína, o moléculas pequeñas) o una estructura (por ejemplo, un plásmido o un sistema de edición de genes) que no se encuentra naturalmente en un SADA o la bacteria parental a partir de la cual se produce (por ejemplo, una célula bacteriana Gram negativa o Gram positiva).

II. COMPOSICIONES

A. SADA y SADA altamente activo

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento por parte del solicitante de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA), que incluyen SADA altamente activos, que pueden proporcionar una amplia gama de funciones en un gran número de entornos. Un "SADA" es un sistema de membrana cerrada, no replicable, libre de genoma que comprende al menos una membrana (en algunas realizaciones, dos membranas, donde las dos membranas no se cruzan) y que tiene un volumen interior adecuado para contener una carga (por ejemplo, un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP)).

En algunas realizaciones, los SADA son minicélulas o minicélulas modificadas que provienen de una célula bacteriana parental (por ejemplo, una célula bacteriana Gram

negativa o Gram positiva). El SADA puede provenir de bacterias parentales usando cualquier método adecuado, por ejemplo, manipulación genética de la célula parental o exposición a un cultivo o afección que aumente la probabilidad de formación de minicélulas bacterianas.

En algunas realizaciones, un SADA tiene una sección transversal del eje principal entre aproximadamente 100 nm y 500 μm (por ejemplo, en ciertas realizaciones, aproximadamente: 100-600 nm, tal como 100-400 nm; o entre aproximadamente 0.5-10 μm y 10-500 μm). En ciertas realizaciones, un SADA tiene una sección transversal de eje menor entre aproximadamente: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hasta el 100 % del eje mayor. En ciertas realizaciones, un SADA tiene un volumen interior de entre aproximadamente: 0.001-1 μm^3 , 0.3-5 μm^3 , 5-4000 μm^3 o 4000-50x10⁷ μm^3 .

En algunas realizaciones, la invención proporciona SADA altamente activo. Un "SADA altamente activo" es un SADA con un alto potencial de trabajo, por ejemplo, un SADA que tenga la capacidad de realizar una cantidad significativa de trabajo útil. El trabajo puede definirse como, por ejemplo, un trabajo metabólico, incluida la síntesis química (por ejemplo, la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, polímeros o moléculas pequeñas), modificación química (por ejemplo, la modificación de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, polímeros o moléculas pequeñas), o transporte (por ejemplo, importación, exportación o secreción) en condiciones adecuadas. En algunas realizaciones, los SADA altamente activos comienzan con un gran conjunto de energía, por ejemplo, energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). En otras realizaciones, el SADA tiene la capacidad de absorber

o generar energía (por ejemplo, ATP) de otra fuente. La expresión "SADA proporcionado por la invención" abarca todas las realizaciones de SADA descritas en el presente documento, incluidas, en realizaciones particulares, SADA altamente activos, el conjunto de los cuales puede ser referenciado como "SADA altamente activos proporcionados por la invención", que es un subconjunto del SADA proporcionado por la invención.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en los que los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1 mM y en los que la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en los que los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 3 mM y en los que la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En algunas realizaciones, un SADA muy activo tiene una concentración inicial de ATP de al menos 1 nM, 1.1 nM, 1.2 nM, 1.3 nM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 nM, 2 mM, 2.5 mM, 3 nM, 3.5 nM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM. La concentración de ATP se puede evaluar mediante una variedad de medios que incluyen, en determinadas realizaciones, un ensayo BacTiter-Glo™ (Promega) en SADA lisado.

La actividad alta puede evaluarse adicional o alternativamente como la tasa o cantidad de aumento en la concentración de ATP en un SADA a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, la concentración de ATP de un SADA aumenta en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos un 200 %

o más del 200 % después de la incubación. en condiciones adecuadas, por ejemplo, incubación a 37 °C durante 12 horas. En ciertas realizaciones, un SADA altamente activo tiene una tasa de generación de ATP mayor de aproximadamente: 0.000001, 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 500, 1000, 10000 ATP/s/nm² durante al menos aproximadamente: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 1 semana o dos semanas.

En otros aspectos, la alta actividad se evalúa como una tasa de disminución de la concentración de ATP a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, la concentración de ATP puede disminuir menos rápidamente en SADA que son altamente activos que en SADA que no son altamente activos. En algunas realizaciones, la caída en la concentración de ATP en un SADA o una composición de SADA a las 24 horas después de la preparación es menos de aproximadamente el 50 % (por ejemplo, menos de aproximadamente: 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 %) en comparación con la concentración inicial de ATP (por ejemplo, ATP por volumen celular), por ejemplo, tal como se mide usando un ensayo BacTiter-Glo™ (Promega).

La alta actividad puede evaluarse adicional o alternativamente como índice de vida útil de un SADA. El índice de vida útil se calcula como la proporción de la tasa de producción de GFP a las 24 horas frente a los 30 minutos. En algunas realizaciones, un SADA altamente activo tiene un índice de vida útil superior a aproximadamente: 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.18, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.45, 0.5, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90, 1.0 o más. En realizaciones más particulares, el índice de vida útil se mide en un SADA que contiene un plásmido de GFP funcional con un promotor apropiado para la especie en donde la concentración de GFP se mide en relación

con el número de SADA, el número promedio de plásmidos por SADA y el volumen de solución con un lector de placas en 30 minutos y 24 horas.

5 En algunos aspectos, el SADA produce una proteína, por ejemplo, una proteína heteróloga. En algunos aspectos, la actividad alta se evalúa como una tasa, cantidad o duración de producción de una proteína o una tasa de inducción de la expresión de la proteína (por ejemplo, la capacidad de respuesta de un SADA a una señal). Por ejemplo, el SADA puede
10 comprender un plásmido, comprendiendo el plásmido un promotor inducible y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga, en donde el contacto del SADA con un inductor del promotor inducible en condiciones apropiadas da como resultado la producción de la proteína heteróloga. En algunos aspectos, la producción de la proteína
15 heteróloga aumenta al menos 1.6 veces en un SADA, por ejemplo, un SADA altamente activo que se ha puesto en contacto con el inductor en relación con un SADA que no se ha puesto en contacto con el inductor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la producción de la proteína heteróloga aumenta al menos 1.5 veces, 1.75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más de 10 veces en un SADA, por ejemplo, un SADA altamente activo, que se ha puesto
20 en contacto con el inductor. En algunas realizaciones, la tasa de producción de la proteína heteróloga por un SADA altamente activo alcanza un nivel diana dentro de una duración particular después del contacto del SADA con el inductor, por ejemplo, dentro de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas o
25 más de 3 horas. En algunas realizaciones, se produce una proteína (por ejemplo, una proteína heteróloga) a una velocidad de al menos 0.1 femtogramos por hora por SADA altamente activo, por ejemplo, al menos 0.2 0.4, 0.6, 0.8,
30

1, 2, 4, 6, 8, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, o 3500 fg/hora por SADA. En algunas realizaciones, la alta actividad de un SADA se evalúa como la duración durante la cual se produce una proteína. Un SADA altamente activo puede producir una proteína (por ejemplo, una proteína heteróloga) durante al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas o más de 48 horas.

B. SADA y SDA altamente activos que provienen de bacterias parentales deficientes en un factor de especificidad topológica de división celular

El SADA puede provenir de células parentales bacterianas, tal como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención proporciona un SADA y/o una composición que comprende una pluralidad de SADA que provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en un nivel, actividad o expresión de un factor de especificidad topológica de división celular.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA no comprenden un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA, estando la composición sustancialmente libre de células bacterianas viables y produciéndose mediante un proceso que comprende: (a) producir, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o la actividad de un factor de especificidad topológica de división celular; (b) exponer la bacteria parental a condiciones que permitan la formación de una minicélula,

produciendo así el SADA altamente activo; y (c) separar el SADA de la bacteria parental, produciendo así una composición que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

5 En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 20 % de identidad con un polipéptido minE de *E. coli* (SEQ ID NO: 1), por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, 10 el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el factor de 15 especificidad topológica de división celular es un polipéptido minE. Las especies ilustrativas que tienen polipéptidos minE se proporcionan en la Tabla 4 y en Rothfield et al., *Nature Reviews Microbiology*, 3: 959-968, 2005.

20 En algunas realizaciones, la bacteria parental es *E. coli* y el polipéptido minE es minE de *E. coli*. En otras realizaciones, la bacteria parental es *Salmonella typhimurium* y el polipéptido minE es minE de *S. typhimurium*. En otras realizaciones más, la bacteria parental es una 25 bacteria *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Aquifex*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Buchnera*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chromobacterium*, *Crocospaera*, *Dechloromonas*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotalea*, *Erwinia*, *Francisella*, 30 *Fusobacterium*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Magnetospirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylococcus*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Nostoc*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Polaromonas*, *Prochlorococcus*, *Pseudomonas*,

Psychrobacter, Ralstonia, Rubrivivax, Salmonella, Shewanella, Shigella, Sinorhizobium, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Thermotoga, Thermus, Thiobacillus, Trichodesmium, Vibrio, Wigglesworthia, Wolinella, Xanthomonas, Xylella, Yersinia, Bacillus, Clostridium, Deinococcus, Exiguobacterium, Geobacillus, Lactobacillus, Lactobacillus, Moorella, Oceanobacillus, Symbiobacterium, o Thermoanaerobacter y el factor de especificidad topológica de división celular es el minE o DivIVA endógeno de la bacteria parental.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 20 % de identidad con un polipéptido DivIVA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 4), por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido DivIVA. Las especies ilustrativas que tienen polipéptidos DivIVA se proporcionan en la Tabla 4 y en Rothfield et al., *Nature Reviews Microbiology*, 3: 959-968, 2005. En algunas realizaciones, la bacteria parental es *Bacillus subtilis* y el factor de especificidad topológica de división celular es DivIVA de *B. subtilis*.

En algunas realizaciones, el SADA o la bacteria parental que tiene la reducción en un nivel o actividad del factor de especificidad topológica de división celular también tiene una reducción en el nivel de una o más proteínas de inhibición del anillo Z.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 20 % de identidad con un polipéptido minC de *E. coli* (SEQ ID NO: 2), por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minC.

En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 20 % de identidad con un polipéptido minD de *E. coli* (SEQ ID NO: 3), por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minD.

En algunas realizaciones, los SADA o la bacteria parental tienen una reducción en el nivel, la actividad o la expresión de al menos dos proteínas de inhibición del anillo Z. En algunas realizaciones, el SADA o la bacteria parental tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC y un polipéptido minD. En algunas realizaciones, el SADA o la bacteria parental tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC, un polipéptido minD y un polipéptido minE, por ejemplo, una delección del operón minCDE (Δ minCDE).

Puede lograrse una reducción en el nivel, actividad o expresión de un factor de especificidad topológica de división celular o una proteína de inhibición del anillo Z, por ejemplo, una reducción en un SADA o una reducción en una

célula bacteriana parental, usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la reducción en el nivel o la actividad es causada por una mutación con pérdida de función, por ejemplo, una delección de un gen. En algunas realizaciones, la mutación de pérdida de función es una mutación de pérdida de función inducible y la pérdida de función se induce al exponer la célula parental a una condición inductora, por ejemplo, la mutación de pérdida de función inducible es una mutación sensible a la temperatura y en la que la condición inductora es una condición de temperatura.

En algunas realizaciones, la célula parental tiene una delección del operón minCDE (Δ minCDE) o del operón homólogo.

C. SADA que comprende una carga

En algunas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención incluye una carga contenida en el interior del SADA. Una carga puede ser cualquier resto dispuesto en el interior de un SADA (por ejemplo, encapsulado por el SADA) o conjugado a la superficie del SADA. En algunas realizaciones, la carga comprende un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP) o una combinación de los anteriores.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ADN, un ARN o un plásmido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN o un plásmido) codifica una proteína. En algunas realizaciones, la proteína se transcribe y/o traduce en el SADA.

En algunas realizaciones, la carga es una enzima. En algunas realizaciones, la enzima altera un sustrato para

producir un producto diana. En algunas realizaciones, el sustrato está presente en el SADA y el producto diana se produce en el SADA. En otras realizaciones, el sustrato está presente en una célula o entorno diana al que se administra el SADA.

En ciertas realizaciones, la carga se modifica para mejorar la estabilidad en comparación con una versión sin modificar de la carga. La "estabilidad" de una carga es una proporción sin unidades entre la vida media de la carga no modificada y la vida media de la carga modificada, medida en las mismas condiciones ambientales. En algunas realizaciones, el entorno se controla experimentalmente, por ejemplo, un fluido corporal simulado, agua libre de ribonucleasa, citoplasma celular, espacio extracelular o "plasma de SADA" (es decir, el contenido del volumen interior de un SADA, por ejemplo, después de la lisis). En algunas aplicaciones, es un entorno agrícola, por ejemplo, suelo de campo variable, agua de río o agua de océano. En otras realizaciones, el entorno es real o simulado: intestino animal, piel animal, tracto reproductivo animal, tracto respiratorio animal, torrente sanguíneo animal o espacio extracelular animal. En determinadas formas de realización, el SADA no degrada sustancialmente la carga.

En ciertas realizaciones, la carga comprende una proteína. En ciertas realizaciones, la proteína tiene una estabilidad mayor de aproximadamente: 1.01, 1.1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 100000, 10000000 en citoplasma celular u otros entornos. La proteína puede ser cualquier proteína, incluidos los factores de crecimiento; enzimas; hormonas; proteínas inmunomoduladoras; proteínas antibióticas, tales como proteínas antibacterianas, antifúngicas, insecticidas, etc.; agentes de direccionamiento, tales como anticuerpos o

nanocuerpos, etc. En algunas realizaciones, la proteína es una hormona, por ejemplo, paracrina, endocrina, autocrina.

5 En algunas realizaciones, la carga comprende una hormona vegetal, tal como ácido abscísico, auxina, citoquinina, etileno, giberelina o una combinación de las mismas.

10 En determinadas realizaciones, la carga es un inmunomodulador, como un inmunoestimulador, inhibidores de puntos de control (por ejemplo, de PD-1, PD-L1, CTLA-4), agente quimioterapéutico, supresores, superantígenos, molécula pequeña (ciclosporina A, dinucleótidos cíclicos (CDN) o agonista de STING (por ejemplo, MK-1454)).

15 Para SADA que comprende carga, en algunas realizaciones, la carga es un ARN, como ARN circular, ARNm, ARNip, ARNh_c, ASO, ARNt, ARNdc o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones el ARN tiene una estabilidad mayor de aproximadamente: 1.01, 1.1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 100000000, por ejemplo, en plasma de SADA. La carga de ARN se puede estabilizar, en ciertas realizaciones, 20 por ejemplo, con una estructura de bucle escalonado adjunta, tal como un andamiaje de ARNt. Por ejemplo, ARNtLys3 no humano y ARNtMet de E. coli (Nat. Methods, Ponchon 2007). Ambos han sido bien caracterizados y expresados de forma recombinante. Sin embargo, también se podrían usar una 25 variedad de otros tipos, como aptámeros, ARNlnc, ribozimas, etc. El ARN también se puede estabilizar cuando el SADA se obtiene de una cepa parental nula (o hipomórfica) para una o más ribonucleasas.

30 En algunas realizaciones particulares, el ARN es un ARNm que codifica una proteína. En realizaciones más particulares, el ARNm que codifica la proteína codifica una enzima (por ejemplo, una enzima que imparte actividad enzimática hepática, como ARNm de PBGD humano (hPBGD)) o un

antígeno, por ejemplo, que provoca una respuesta inmune (como provocar un título potente y duradero de anticuerpos neutralizantes), tales como ARNm que codifica las glucoproteínas gB y/o complejo pentamérico (PC) de CMV). En determinadas realizaciones particulares, el ARN es un ARN no codificante pequeño, como ARNhc, ASO, ARNt, ARNdc o una combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, el SADA proporcionado por la invención incluye una carga que comprende un sistema de edición de genes. Un "sistema de edición de genes" incluye (o codifica) proteínas que pueden, con ácidos nucleicos asociados adecuados, modificar una secuencia de ADN de interés, como una secuencia de ADN genómico, ya sea por inserción o delección de una secuencia de interés, así como una secuencia de estado de metilación alterado. Los sistemas de edición de genes ilustrativos incluyen aquellos basados en un sistema Cas, como Cas9, Cpf1 u otros sistemas dirigidos al ARN con su ARN acompañante, así como nucleasas con dedos de zinc y efectores TAL conjugados con nucleasas.

Otras realizaciones de SADA proporcionadas por la invención incluyen ADN como carga, incluso como plásmido, en el que opcionalmente el ADN comprende una secuencia codificante de proteínas. La carga de ADN ilustrativa incluye, en determinadas realizaciones, un plásmido que codifica una secuencia de ARN de interés (véanse los ejemplos anteriores), por ejemplo, que puede estar flanqueado en cada lado por un inserto de ARNt. La invención abarca diversas cargas de ADN, que incluyen: Producir SADA (por ejemplo, dirigir la sobreexpresión de FTZ, exonucleasas que degradan el genoma); plásmidos de longevidad (que expresan ATP sintasa, que expresan rodopsina); los que expresan ARN no codificante estabilizado, ARNt, ARNlnc; expresar proteínas etiqueta del sistema de secreción, dominio efector NleE2 y

etiqueta de localización; sistemas de secreción T3/4SS, T5SS, T6SS; circuitos lógicos, sistemas de secreción expresados condicionalmente; y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un circuito lógico incluye casetes de expresión o supresión inducible, como el promotor Plac inducible por IPTG y la parte hrpR de la puerta AND, y, por ejemplo, el promotor inducido por calor pL (del fago lambda, que normalmente se suprime por una proteína termolábil) y la parte hrpS de la puerta AND. Para diseñar una puerta OR, se puede utilizar un sistema descrito por Rosado *et al.*, *PLoS Genetics*, 2018. Brevemente, se puede usar un ARNm reprimido en cis que codifica RFP bajo un promotor constitutivo. Luego, la represión puede eliminarse en presencia de ARNs de RAJ11. A continuación, se pueden usar plásmidos que contienen el promotor inducible por IPTG PLac y el promotor inducido por calor pL, que inducen ambos la expresión del ARNs de RAJ11. La salida sería entonces la expresión RFP, que se ve en respuesta a cualquiera de las entradas. Estos sistemas se pueden adaptar a una variedad de funciones de tipo sensor.

Los SADA proporcionados por la invención, en algunas realizaciones, incluyen un transportador en la membrana. En determinadas realizaciones, el transportador es específico para glucosa, sodio, potasio, un ión metálico, un soluto aniónico, un soluto catiónico o agua.

En algunas realizaciones, la membrana de un SADA proporcionada por la invención comprende una enzima. En realizaciones particulares, la enzima es una proteasa, oxidoreductasa o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la enzima se conjuga químicamente a la membrana SADA, opcionalmente mediante un enlazador a la membrana exterior.

D. SADA que comprende un sistema de secreción

En determinadas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención comprende un sistema de secreción bacteriana (por ejemplo, un sistema de secreción bacteriano endógeno o un sistema de secreción heterólogo). Un "sistema de secreción bacteriana" es una proteína, o complejo proteico, que puede exportar una carga desde el citoplasma de una célula bacteriana (o, por ejemplo, un SADA que proviene de la misma) hacia: el espacio extracelular, el espacio periplásmico de una bacteria Gram negativa, o el espacio intracelular de otra célula. En algunas realizaciones, el sistema de secreción bacteriana funciona mediante un proceso activo (por ejemplo, dependiente de ATP o dependiente de PMF) y, en ciertas realizaciones, el sistema de secreción bacteriana comprende un tubo o una espícula que atraviesa la célula hospedadora (o SADA) hasta una célula diana. En otras realizaciones, el sistema de secreción bacteriana es un canal transmembrana. Los sistemas de secreción bacteriana ilustrativos incluyen T3SS y T4SS (y T3/T4SS, como se define a continuación), que son estructuras que contienen tubos donde la carga atraviesa el interior de un tubo de proteína y T6SS, que transporta la carga al final de una espícula. Otros sistemas de secreción bacteriana ilustrativos incluyen T1SS, T2SS, T5SS, T7SS, Sec y Tat, que son transmembrana.

En algunas realizaciones, el sistema de secreción heterólogo es un T3SS.

En algunas realizaciones, el SADA comprende una carga, en la que la carga comprende un resto que dirige la exportación por el sistema de secreción bacteriana, por ejemplo, en algunas realizaciones el resto es Pho/D, Tat o una señal de péptido sintético.

En determinadas realizaciones, los SADA proporcionados por la invención son SADA de dos membranas. En realizaciones más particulares, el SADA de dos membranas comprende además

un sistema de secreción bacteriana. En realizaciones aún más particulares, el sistema de secreción bacteriana se selecciona de T3SS, T4SS, T3/4SS o T6SS, opcionalmente en el que T3SS, T4SS, T3/4SS o T6SS tienen un efector atenuado o no funcional que no afecta a la aptitud de una célula diana.

Los SADA proporcionados por la invención, en algunas realizaciones, incluyen un sistema de secreción bacteriano.

En algunas realizaciones, el sistema de secreción bacteriana es capaz de exportar una carga a través de la membrana externa de SADA a una célula diana, como una célula animal, fúngica, bacteriana o vegetal, como T3SS, T4SS, T3/T4SS o T6SS.

En realizaciones más particulares, el sistema de secreción bacteriana es un T3/4SS. Un "T3/4SS" es un sistema de secreción basado en T3SS o T4SS, que incluye sistemas híbridos y versiones no modificadas, que forma un tubo de proteína entre una bacteria (o SADA) y una célula diana, conectando las dos y liberando uno o más efectores. La célula diana puede ser un animal, una planta, un hongo o una bacteria. En algunas realizaciones, un T3/4SS incluye un efector, que puede ser un efector modificado. Ejemplos de sistemas T3SS incluyen el sistema *Salmonella* SPI-1, el sistema EHEC coli ETT1, el sistema *Xanthamonas Citri/Campestri* T3SS y el sistema *Pseudomonas syringae* T3SS. Los ejemplos de sistemas T4SS incluyen el sistema de plásmido *Agrobacterium* Ti, *Helicobacter pylori* T4SS. En determinadas formas de realización, el T3/4SS tiene una función efectora modificada, por ejemplo, un efector seleccionado entre SopD2, SopE, Bop, Map, Tir, EspB, EspF, NleC, NleH2 o NleE2. En realizaciones más particulares, la función efectora modificada es para el direccionamiento intracelular tal como la translocación al núcleo, golgi, mitocondrias, actina, microvellosidades, ZO-1, microtúbulos o citoplasma. En

realizaciones aún más particulares, la función efectora modificada es el direccionamiento nuclear basado en NleE2 que proviene de *E. coli*. En otras realizaciones particulares, la función efectora modificada es para la formación de filopodios, ruptura de uniones estrechas, borramiento de microvellosidades o inactivación de SGLT-1.

En otras realizaciones, un SADA proporcionado por la invención que comprende un sistema de secreción bacteriana comprende un T6SS. En algunas realizaciones, el T6SS, en su hospedador natural, se dirige a una bacteria y contiene un efector que destruye a la bacteria. En determinadas realizaciones particulares, el T6SS proviene de *P. putida* K1-T6SS y, opcionalmente, en donde el efector comprende la secuencia de aminoácidos de Tke2 (Acceso AUZ59427.1), o un fragmento funcional de la misma. En otras realizaciones, el T6SS, en su hospedador natural, se dirige a un hongo y contiene un efector que destruye hongos, por ejemplo, el T6SS proviene de *Serratia marcescens* y los efectores comprenden las secuencias de aminoácidos de: Tfe1 (Genbank: SMDB11_RS05530) o Tfe2 (Genbank: SMDB11_RS05390).

En otras realizaciones de un SADA proporcionado por la invención que contiene un sistema de secreción bacteriana, el sistema de secreción bacteriana es capaz de exportar una carga por vía extracelular. En ciertas realizaciones más particulares, el sistema de secreción bacteriana es T1SS, T2SS, T5SS, T7SS, Sec o Tat.

E. ADAS que carece de proteasas, ribonucleasas y/o LPS

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA (por ejemplo, SADA altamente activo), en la que los SADA tienen un nivel o actividad de proteasa reducida con respecto a un SADA producido a partir de una bacteria parental de tipo silvestre. En algunos aspectos, el SADA se produce a partir

de una bacteria parental que se ha modificado para reducir o eliminar la expresión de al menos una proteasa.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA (por ejemplo, SADA altamente activo), en la que los SADA tienen un nivel o actividad de ribonucleasa reducida con respecto a un SADA producido a partir de una bacteria parental de tipo silvestre. En algunos aspectos, el SADA se produce a partir de una bacteria parental que se ha modificado para
10 reducir o eliminar la expresión de al menos una ribonucleasa. En algunas realizaciones, la ribonucleasa es una endorribonucleasa o una exorribonucleasa.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA, en la que
15 el SADA se ha modificado para tener un lipopolisacárido reducido (LPS). En algunas realizaciones, la modificación es una mutación en miristoiltransferasa de biosíntesis de lípido A (msbB).

En determinadas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención carece de una o más proteínas metabólicamente no esenciales. Una "proteína metabólicamente no esencial" incluye de forma no exhaustiva: fimbrias, flagelos, sistemas de secreción no deseados, transposasas, efectores, elementos de fagos o sus elementos reguladores, tales como flhC u OmpA. En algunas realizaciones, un SADA
20 proporcionado por la invención carece de una o más de una ribonucleasa, una proteasa o una combinación de las mismas y, en realizaciones particulares, carece de una o más endorribonucleasas (tales como ribonucleasa A, ribonucleasa h, ribonucleasa III, ribonucleasa L, ribonucleasa PhyM) o
25 exorribonucleasas (tales como ribonucleasa R, ribonucleasa PH, ribonucleasa D); o serina, cisteína, treonina,
30

aspártico, glutámico y metaloproteasas; o una combinación de cualquiera de los anteriores.

E. SADA que comprende un resto de direccionamiento

5 En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA (por ejemplo, SADA altamente activo), en donde el SADA comprende un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es un nanocuerpo, una proteína de unión a carbohidratos o un péptido de direccionamiento a tumores.

10 En determinadas realizaciones, el nanocuerpo es un nanocuerpo dirigido a un antígeno tumoral, como HER2, PSMA o VEGF-R. En otras realizaciones, la proteína de unión a carbohidratos es una lectina, por ejemplo, lectina de unión a manosa (MBL). En otras realizaciones más, el péptido dirigido a tumores es un motivo RGD o péptido CendR.

F. SADA que proviene de cepas parentales comensales o patógenas

20 En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA (por ejemplo, SADA altamente activo), en donde el SADA proviene de una bacteria parental que es un patógeno de mamífero o una bacteria comensal de mamífero. En algunos casos, la bacteria comensal de mamíferos es una especie de *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* o *Actinomyces*, o la bacteria patógena de mamíferos es *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* o *Helicobacter pylori*.

30 En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA (por ejemplo, SADA altamente activo), en donde el SADA proviene de una bacteria parental que es un patógeno de plantas o una

bacteria comensal de plantas. En algunos casos, la bacteria comensal de la planta es *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas putida* o la bacteria patógena de la planta es una especie de *Xanthomonas* o *Pseudomonas syringae*.

5 *G. SADA que proviene de cepas parentales auxótrofas*

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de SADA (por ejemplo, SADA altamente activo), en donde el SADA proviene de una bacteria parental auxótrofa, es decir, una bacteria
10 parental que es incapaz de sintetizar un compuesto orgánico requerido para el crecimiento. Tales bacterias pueden crecer solo cuando se proporciona el compuesto orgánico.

H. SADA que comprende restos adicionales

Un ADAS, en determinadas realizaciones, incluye una ATP
15 sintasa funcional y, en algunas realizaciones, una bomba de protones embebida en membrana. El SADA puede provenir de diferentes fuentes, entre las que se incluyen: una cepa bacteriana parental ("cepa parental") diseñada o inducida para producir sistemas de membranas cerradas sin genoma, una
20 bacteria con genoma extirpado, un extracto de preparación de células bacterianas (por ejemplo, por medios mecánicos o de otro tipo), o una síntesis total, que incluye opcionalmente fracciones de una preparación de células bacterianas. En algunas realizaciones, un SADA altamente activo tiene una
25 concentración de ATP sintasa de al menos: 1 por 10000 nm², 1 por 5000 nm², 1 por 3500 nm², 1 por 1000 nm².

El SADA proporcionado por la invención puede incluir una variedad de componentes adicionales, que incluyen, por ejemplo, bombas fotovoltaicas, casetes de retinal y
30 productores de retinal, enzimas metabólicas, agentes de direccionamiento, carga, sistemas de secreción bacteriano y transportadores, incluidas combinaciones de los anteriores, que incluyen determinadas realizaciones particulares

descritas a continuación. En determinadas realizaciones, el SADA carece de otros elementos, como genes metabólicamente no esenciales y/o determinadas nucleasas o proteasas.

5 En ciertas realizaciones, el SADA proporcionado por la invención comprende una ATP sintasa, que opcionalmente carece de un dominio regulador, tal como carece de un dominio épsilon. La delección se puede realizar por diversos medios. En determinadas realizaciones, la delección se produce por delección inducible del dominio épsilon natural. En ciertas
10 realizaciones, la delección se puede lograr flanqueando con sitios LoxP y expresión de Cre inducible o inactivación de CRISPR, o ser inducible (colocar en el plásmido bajo un transactivador tTa tet en una cepa de inactivación de ATP sintasa)

15 Un SADA, en algunas realizaciones, puede incluir una bomba de protones fotovoltáica. En determinadas realizaciones, la bomba de protones fotovoltáica es una proteorrodopsina. En realizaciones más particulares, la proteorrodopsina comprende la secuencia de aminoácidos de la
20 proteorrodopsina del clado bacteriano marino no cultivado SAR86, número de registro de GenBank: AAS73014.1. En otras realizaciones, la bomba de protones fotovoltáica es una rodopsina de gloeobacter. En determinadas realizaciones, la bomba de protones fotovoltáica es una bacteriorrodopsina,
25 deltarrodopsina o halorrodopsina de *Halobium salinarum*, *Natronomonas pharaonis*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Haloterrigena turkmenica* o *Haloarcula marismortui*.

En algunas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención comprende además retinal. En determinadas
30 realizaciones, un ADAS proporcionado por la invención comprende además una proteína de síntesis de retinal (o sistema de proteínas), o un ácido nucleico que codifica la misma.

En determinadas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención comprende además una o más proteínas de la vía de la glucólisis. En algunas realizaciones, la proteína de la vía de la glucólisis es una fosfofructoquinasa (Pfk-A), por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos del registro de UniProt P0A796 o un fragmento funcional de la misma. En otras realizaciones, la proteína de la vía de la glucólisis es triosafosfato isomerasa (tpi), por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos del registro de UniProt P0A858, o un fragmento funcional de la misma.

I. Composiciones y formulaciones de SADA

La presente invención proporciona composiciones o preparaciones que contienen un SADA proporcionado por la invención, que incluyen, entre otras cosas, una preparación de SADA altamente activo proporcionado por la invención o una preparación de SADA en donde una pluralidad de SADA individuales carecen de un factor de especificidad topológica de división celular, por ejemplo, carecen de un producto del gen minE y, opcionalmente, en donde la preparación de SADA está sustancialmente libre de células viables. En conjunto, estas son "composiciones proporcionadas por la invención" o "una composición proporcionada por la invención", o similares y pueden contener cualquier SADA proporcionado por la invención y cualquier combinación de SADA proporcionada por la invención.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición proporcionada por la invención contiene al menos aproximadamente: 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 %, o más SADA que contiene un sistema de secreción bacteriano. En realizaciones particulares, el sistema de secreción bacteriana es uno de T3SS, T4SS, T3/4SS o T6SS.

En algunas realizaciones, una composición proporcionada por la invención contiene SADA que contienen un T3SS, donde los SADA comprenden una densidad de membrana de T3SS media mayor que 1 en aproximadamente: 40000, 35000, 30000, 25000, 19600, 15000, 10000 o 5000 nm². En determinadas realizaciones particulares, el SADA proviene de una cepa parental de *S. typhimurium* o *E. coli*.

Ciertas realizaciones de las composiciones proporcionadas por la invención contienen SADA que contienen un T3SS, donde los SADA comprenden una densidad de membrana de T3SS media mayor que 1 en aproximadamente: 300000, 250000, 200000, 150000, 100000, 50000, 20000, 10000, 5000 nm². En determinadas realizaciones particulares, el SADA proviene de una cepa parental de *Agrobacterium tumefaciens*.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de SADA, en la que al menos aproximadamente: 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 % o más de los SADA contienen un sistema de secreción bacteriana, que incluye T3, T4, T3/4SS, T6SS, y opcionalmente incluyen uno o más de: carbohidratos exógenos, sintasas productoras de fosfato, proteínas sensibles a la luz, proteínas de importación, enzimas, carga funcional, efectores específicos de organismo, proteínas de fusión.

Como será fácilmente evidente, las composiciones y preparaciones proporcionadas por la invención pueden contener cualquier SADA proporcionado por la invención, tal como SADA o SADA altamente activo que carece de un producto génico minE.

Las composiciones proporcionadas por la invención se pueden preparar en cualquier formulación adecuada. Por ejemplo, la formulación puede ser adecuada para administración IP, IV, IM, oral, tópica (crema, gel, pomada,

parche transdérmico), aerosolizada o nebulizada. En algunas realizaciones, una formulación es una formulación líquida. En otras realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada.

5 En algunas realizaciones, una composición de SADA descrita en el presente documento comprende menos de 100 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de células bacterianas viables, por ejemplo, menos de 50 UFC/ml, menos de 20 UFC/ml, menos de 10 UFC/ml, menos de 1 UFC/ml o menos
10 de 0.1 UFC/ml de células bacterianas viables.

 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición de SADA en la que los SADA están liofilizados y reconstituidos, y en la que los SADA reconstituidos tienen una concentración de ATP que es al menos el 90 % de la
15 concentración de ATP de un SADA que no ha sido liofilizado, por ejemplo al menos el 95 %, el 98 % o al menos igual a la concentración de ATP de un SADA que no ha sido liofilizado.

 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición de SADA en la que los SADA se almacenan, por
20 ejemplo, a 4 °C, en la que después del almacenamiento, los SADA tienen una concentración de ATP que es al menos el 90 % de la concentración de ATP de un SADA que no ha sido almacenado, por ejemplo, al menos el 95 %, el 98 %, o al menos igual a la concentración de ATP de un SADA que no ha
25 sido almacenado. En algunas realizaciones, el almacenamiento es durante al menos un día, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos seis meses o al menos un año.

 En algunas realizaciones, el SADA puede conservarse o
30 de otro modo en un estado "quiescente" y luego activarse rápidamente.

 En algunas realizaciones, la composición de SADA se formula para su administración a un animal, por ejemplo,

formulada para administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, oral, tópica, en aerosol o nebulizada.

En algunas realizaciones, la composición de SADA se formula para la administración a una planta.

5 En algunas realizaciones, la composición de SADA se formula para la administración a un insecto.

En algunas realizaciones, la composición se formula como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel o una composición gaseosa.

10 *J. SADA que comprende una enzima*

En un aspecto, la invención presenta una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA comprenden una enzima y en donde la enzima altera un sustrato para producir un producto diana. En algunas realizaciones, 15 el sustrato está presente en el SADA y el producto diana se produce en el SADA. En otras realizaciones, el sustrato está presente en una célula o entorno diana al que se administra el SADA. En algunas realizaciones, la enzima es diadenilato ciclasa A, el sustrato es ATP y el producto diana es di-AMP cíclico. 20

III. MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SADA

A. Creación de SADA y SADA altamente activo

En algunos aspectos, la invención presenta un método para fabricar una composición que comprende una pluralidad 25 de SADA, estando la composición sustancialmente libre de células bacterianas viables, comprendiendo el método (a) producir, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o la actividad de un factor de especificidad topológica de división celular; (b) exponer las bacterias parentales a 30 condiciones que permitan la formación de una minicélula, produciendo así el SADA altamente activo; y (c) separar el SADA altamente activo de las bacterias parentales,

produciendo así una composición que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

Las bacterias parentales incluyen cualquier especie bacteriana adecuada a partir de la cual se puede generar un SADA (por ejemplo, especies que se pueden modificar usando métodos descritos en el presente documento para producir SADA). La Tabla 4 proporciona un listado no limitante de géneros adecuados de los que se pueden obtener SADA.

Tabla 4. Especies bacterianas para la producción de SADA

10	Bacterias Gram negativas
	Escherichia
	Acinetobacter
	Agrobacterium
	Anabaena
15	Aquifex
	Azoarcus
	Azotobacter
	Bordetella
	Bradyrhizobium
20	Brucella
	Buchnera
	Burkholderia
	Candidatus
	Chromobacterium
25	Crocospaera
	Dechloromonas
	Desulfitobacterium
	Desulfotalea
	Erwinia
30	Francisella
	Fusobacterium
	Gloeobacter

	Gluconobacter
	Helicobacter
	Legionella
	Magnetospirillum
5	Mesorhizobium
	Methylococcus
	Neisseria
	Nitrosomonas
	Nostoc
10	Photobacterium
	Photorhabdus
	Polaromonas
	Prochlorococcus
	Pseudomonas
15	Psychrobacter
	Ralstonia
	Rubrivivax
	Salmonella
	Shewanella
20	Shigella
	Sinorhizobium
	Synechococcus
	Synechocystis
25	Thermosynechococcus
	Thermotoga
	Thermus
	Thiobacillus
	Trichodesmium
30	Vibrio
	Wigglesworthia
	Wolinella
	Xanthomonas

	Xylella
	Yersinia
	Bacterias Gram positivas
	Bacillus
5	Clostridium
	Deinococcus
	Exiguobacterium
	Geobacillus
	Lactobacillus
10	Listeria
	Moorella
	Oceanobacillus
	Symbiobacterium
15	Thermoanaerobacter

En algunos aspectos, la invención presenta métodos para fabricar cualquiera de las composiciones de SADA, por ejemplo, composiciones de SADA altamente activos, descritas en la Sección I del presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan métodos para preparar SADA altamente activos; métodos para fabricar SADA que carecen de un factor de especificidad topológica de división celular y, opcionalmente, carecen de una proteína de inhibición del anillo Z (por ejemplo, métodos para fabricar SADA a partir de bacterias parentales Δ_{minCDE}), y métodos para fabricar cualquiera de los SADA mencionados en el presente documento, en los que el SADA comprende una carga.

El SADA altamente activo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores se puede preparar a partir de una célula bacteriana, en donde la cepa parental se selecciona de una bacteria vegetal, como un comensal de

plantas (por ejemplo, *B. Subtilis* o *Pseudomonas putida*) o una bacteria patógena vegetal (por ejemplo, *Xanthomonas* sp. o *Pseudomonas syringae*) o una bacteria humana, como una bacteria comensal de humanos (por ejemplo, *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp. o *Actinomyces* sp.) o una bacteria patógena de humanos (por ejemplo, *Escherichia coli* EHEC, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*) o un extremófilo, incluidos los derivados funcionalizados de cualquiera de los anteriores, por ejemplo, que incluye un casete funcional, como un casete funcional que induce a la bacteria a hacer uno o más de: secretar antimicrobianos, digerir plástico, secretar insecticidas, sobrevivir en entornos extremos, fabricar nanopartículas, integrarse con otros organismos, responder al medio ambiente y crear señales de reportero.

Las bacterias parentales pueden incluir derivados funcionalizados de cualquiera de los anteriores, por ejemplo, incluyendo un casete funcional, tal como un casete funcional que induce a la bacteria a hacer una o más de: secretar antimicrobianos, digerir plástico, secretar insecticidas, sobrevivir en entornos extremos, fabricar nanopartículas, integrarse dentro de otros organismos, responder al medio ambiente y crear señales de reportero.

En algunas realizaciones, un SADA se obtiene de una cepa parental diseñada o inducida para sobreexpresar ATP sintasa. En algunas realizaciones más particulares, la ATP sintasa es heteróloga de la cepa parental. En determinadas realizaciones particulares, la cepa parental se modifica para expresar una ATP sintasa de F_0F_1 funcional.

En determinadas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención se obtiene a partir de una cepa parental cultivada en una condición seleccionada entre: voltaje

aplicado (por ejemplo, 37 mV), concentración de oxígeno no atmosférico (por ejemplo, O₂ al 1-5 %, O₂ al 5-10 %, O₂ al 10-15 %, O₂ al 25-30 %), pH bajo (aproximadamente: 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5) o una combinación de los mismos.

5 El SADA altamente activo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está hecho de un extremófilo, que incluye derivados funcionalizados de cualquiera de los anteriores, por ejemplo, que incluye un casete funcional, tal como un casete funcional que induce a
10 la bacteria a realizar uno o más de: segregar antimicrobianos, digerir plástico, segregar insecticidas, sobrevivir en entornos extremos, fabricar nanopartículas, integrarse con otros organismos, responder al medio ambiente y crear señales de reportero.

15 Debido a la diversidad de bacterias, se puede preparar SADA con membranas modificadas, por ejemplo, para mejorar la biodistribución de SADA tras la administración a una célula diana. En determinadas realizaciones, la membrana se modifica para que sea menos inmunogénica o
20 inmunoestimuladora en plantas o animales. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el SADA se obtiene a partir de una cepa parental, en la que las capacidades inmunoestimuladoras de la cepa parental se reducen o eliminan mediante el tratamiento posterior a la producción con
25 detergentes, enzimas o funcionalizadas con PEG. En determinadas realizaciones, el SADA se fabrica a partir de una cepa parental y la membrana se modifica mediante la desactivación de las vías de síntesis de LPS en la cepa parental, por ejemplo, mediante la inactivación de msbB. En
30 otras realizaciones particulares, el SADA se elabora a partir de una cepa parental que produce partículas deficientes en la pared celular a través de la exposición a condiciones hiperosmóticas.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen transformar una cepa parental con un sistema de desoxirribonucleasa inducible, como *exoI* (ID del gen del NCBI: 946529) y *sbcD* (ID del gen del NCBI: 945049) nucleasas o la nucleasa *I-CeuI* (por ejemplo, Swissprot: P32761.1). En realizaciones más particulares, los métodos incluyen usar una cepa auxótrofa simple, doble, triple o cuádruple y tener los genes complementarios en el plásmido que codifican las nucleasas inducibles.

En algunas realizaciones, los métodos de los métodos proporcionados por la invención, la cepa parental se cultiva en una condición seleccionada entre: voltaje aplicado (por ejemplo, 37 mV), concentración de oxígeno no atmosférico (por ejemplo, O₂ al 1-5 %, O₂ al 5-10 %, O₂ al 10-15 %, O₂ al 25-30 %), pH bajo (4.5-6.5) o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, los métodos de los métodos proporcionados por la invención, la cepa parental carece de flagelos y sistemas de secreción no deseados, opcionalmente donde los flagelos y los sistemas de secreción no deseados se eliminan usando recombinación con rojo lambda.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados por la invención, los componentes de control de flagelos se escinden del genoma de la cepa parental mediante, por ejemplo, la inserción de un plásmido que contiene un dominio CRISPR que está dirigido a genes de control de flagelos, tales como *flhD* y *flhC*.

En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados por la invención son para preparar un SADA muy activo, en el que un SADA que comprende un plásmido que contiene un gen que codifica la rodopsina se cultiva en presencia de luz. En realizaciones más particulares, la rodopsina es proteorrodopsina de bacterias no cultivadas SAR86, que tiene la secuencia de aminoácidos con número de

registro de GenBank: AAS73014.1, o un fragmento funcional de la misma. En realizaciones aún más particulares, el cultivo se complementa con retinal. En otras realizaciones más particulares, la rodopsina es proteorrodopsina y el plásmido contiene además genes que sintetizan retinal (tal plásmido es el plásmido pACYC-RDS de Kim et al., *Microb Cell Fact*, 2012).

En ciertas realizaciones particulares, la cepa parental contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un nanocuerpo que luego se expresa en la membrana del SADA.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados por la invención, la cepa parental contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más operones del sistema de secreción bacteriana. Los plásmidos ilustrativos incluyen *Salmonella* SPI-1 T3SS, *Shigella flexneri* T3SS, el plásmido Agro Ti y el sistema *P. putida* K1-T6SS.

En determinadas realizaciones, la cepa parental comprende una carga. En algunas realizaciones, la cepa parental contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un conjunto de genes que sintetizan una carga de molécula pequeña.

IV. PURIFICACIÓN DE SADA Y COMPOSICIONES DE SADA

En algunas realizaciones de los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento, los SADA se purifican a partir de composiciones (por ejemplo, cultivos) que comprenden bacterias viables, por ejemplo, bacterias parentales. Por ejemplo, la invención presenta un método para fabricar una composición que comprende una pluralidad de SADA, estando la composición sustancialmente libre de células bacterianas viables, comprendiendo el método (a) producir, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o la actividad de un factor de especificidad topológica de

división celular; (b) exponer las bacterias parentales a condiciones que permitan la formación de una minicélula, produciendo así el SADA altamente activo; y (c) separar el SADA altamente activo de las bacterias parentales, produciendo así una composición que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

La purificación separa SADA de las células bacterianas parentales viables, que son más grandes y contienen un genoma. La separación del SADA altamente activo de las bacterias parentales se puede realizar usando varios métodos, como se describe en el presente documento. Los métodos ilustrativos para la purificación descritos en el presente documento incluyen centrifugación, excrecencia selectiva y procesos de intercambio/concentración de tampón.

En algunos aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones de SADA y métodos para comparar tales composiciones, en los que las composiciones están sustancialmente libres de células bacterianas parentales y/o células bacterianas viables, por ejemplo, no tienen más de 500, por ejemplo, 400, 300, 200, 150, o 100 o menos de 50, menos de 25, menos de 10, menos de 5, menos de 1, menos de 0.1 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. En algunas realizaciones, una composición de SADA que está sustancialmente libre de células bacterianas parentales puede no incluir células bacterianas.

Se pueden usar cepas parentales auxótrofas para preparar el SADA proporcionado por la invención. Como se describe con más detalle a continuación, tales métodos de fabricación son útiles para la purificación del SADA. Por ejemplo, después de la generación de SADA, las células bacterianas parentales pueden eliminarse mediante crecimiento en medios que carecen del nutriente (por ejemplo, aminoácido) necesario para la viabilidad de la bacteria

parental. En algunas realizaciones, un SADA proporcionado por la invención proviene de una cepa parental auxótrofa para al menos 1, 2, 3, 4 o más de: arginina (por ejemplo, inactivación en *argA*, tal como las cepas JW2786-1 y NK5992),
5 inactivación de cisteína en *cysE* (tal como las cepas JW3582-2 y JM15), glutamina por ejemplo, inactivación en *glnA* (tal como las cepas JW3841-1 y M5004), glicina, por ejemplo inactivación en *glyA* (tal como las cepas JW2535-1 y AT2457), Histidina, por ejemplo, la inactivación en *hisB* (tal como
10 las cepas JW2004-1 y SB3930), isoleucina, por ejemplo, inactivación en *ilvA* (tal como las cepas JW3745-2 y AB1255), leucina, por ejemplo, inactivación en *leuB* (tal como las cepas JW5807-2 y CV514), lisina, por ejemplo, la inactivación en *lysA* (tal como las cepas JW2806-1 y KL334), metionina,
15 por ejemplo, inactivación en *metA* (tal como las cepas JW3973-1 y DL41), fenilalanina, por ejemplo, inactivación en *pheA* (tal como las cepas JW2580-1 y KA197), prolina, por ejemplo, inactivación en *proA* (tal como las cepas JW0233-2 y NK5525), Serina, por ejemplo, inactivación en *serA* (tal como las cepas
20 JW2880-1 y JC158), treonina, por ejemplo, inactivación en *thrC* (tal como las cepas JW0003-2 y Gif 41), triptófano, por ejemplo, inactivación en *trpC* (tal como las cepas JW1254-2 y CAG18455), tirosina, por ejemplo, inactivación en *tyrA* (tal como por ejemplo las cepas JW2581-1 y N3087),
25 Valina/Isoleucina/Leucina, por ejemplo, inactivación en *ilvD* (tal como las cepas JW5605-1 y CAG18431).

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen el uso de una cepa parental auxótrofa simple, doble, triple o
cuádruple, en la que opcionalmente dicha cepa parental
30 incluye además un plásmido que expresa un *ftsZ*.

V. MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE SADA

A. Métodos de administración de un SADA

En un aspecto, la invención presenta un método para administrar un ADAS altamente activo a una célula diana, comprendiendo el método (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

En otro aspecto, la invención presenta un método para administrar un SADA (por ejemplo, un SADA altamente activo ADAS) a una célula diana, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacterias parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

La célula diana puede ser, por ejemplo, una célula animal, una célula vegetal o una célula de insecto.

B. Métodos de administración de una carga

En otro aspecto, la invención presenta un método para administrar una carga (por ejemplo, un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un modulador inmunitario, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP)) a una célula diana, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM, los SADA comprenden una carga y

la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

En otro aspecto, la invención presenta un método para administrar una carga (por ejemplo, un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un modulador inmunitario, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de ribonucleoproteína (RNP)) a una célula diana, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular, el SADA comprende una carga, y la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

La célula diana a la que se le administra la carga puede ser, por ejemplo, una célula animal, una célula vegetal o una célula de insecto.

C. Métodos de modular un estado de una célula

En un aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula animal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula animal con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula un estado de la célula animal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula vegetal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula vegetal con la composición de la etapa (a), por lo que se modula un estado de la célula vegetal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula de insecto, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula de insecto con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula un estado de la célula de insecto.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula animal, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula animal con la composición de la etapa (a) mediante lo cual se modula un estado de la célula animal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula vegetal, comprendiendo el

método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula de la planta con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula un estado de la célula vegetal.

En otro aspecto, la invención presenta un método para modular un estado de una célula de insecto, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto la célula de insecto con la composición de la etapa (a) mediante lo cual se modula un estado de la célula de insecto, mediante lo cual se modula un estado de la célula del insecto.

La modulación puede ser cualquier cambio observable en el estado (por ejemplo, el transcriptoma, proteoma, epigenoma, efecto biológico o estado de salud o enfermedad) de la célula (por ejemplo, una célula de animal, planta o insecto) según se mide usando técnicas y métodos conocidos en la materia para tal medición, por ejemplo, métodos para medir el nivel o expresión de una proteína, una transcripción, una marca epigenética o para medir el aumento o reducción de la actividad de una vía biológica. En algunas realizaciones, modular el estado de la célula implica aumentar un parámetro (por ejemplo, el nivel o expresión de una proteína, una transcripción o la actividad de una vía

biológica) de la célula. En otras realizaciones, modular el estado de implica aumentar un parámetro (por ejemplo, el nivel o expresión de una proteína, un transcrito o la actividad de una vía biológica) de la célula.

5 *D. Métodos de tratamiento de un animal, una planta o un insecto*

En algunos aspectos, la invención presenta un método para tratar a un animal que lo necesita, comprendiendo el método (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto al animal con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así al animal.

En otros aspectos, la invención presenta un método para tratar a un animal que lo necesita, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto al animal con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así al animal.

El animal que necesita tratamiento puede tener una enfermedad, por ejemplo, un cáncer. En algunas realizaciones, el SADA lleva una carga de quimioterapia o una carga de inmunoterapia.

En algunos aspectos, la invención presenta un método para tratar a una planta que lo necesita, comprendiendo el método (a) proporcionar una composición que comprende una

pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto a la planta o a una plaga de la misma (por ejemplo, una plaga de insectos) con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así a la planta.

En otros aspectos, la invención presenta un método para tratar a una planta que lo necesita, comprendiendo el método: (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de una bacteria parental que tiene una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y (b) poner en contacto a la planta o a una plaga (por ejemplo, una plaga de insectos) de la misma con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así a la planta.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para modular una célula diana. La célula diana puede ser cualquier célula, incluida una célula animal (por ejemplo, incluidos humanos y animales no humanos, incluidos animales de granja o domésticos, plagas), una célula vegetal (incluso de un cultivo o una plaga), una célula fúngica o una célula bacteriana. La célula puede aislarse, por ejemplo, *in vitro* o, en otras realizaciones, dentro de un organismo, *in vivo*. Estos métodos implican proporcionar un SADA proporcionado por la invención o una composición proporcionada por la invención con acceso a la célula diana, en una cantidad eficaz. El acceso a la célula diana puede ser directo, por ejemplo, donde la célula diana es modulada directamente por el SADA, como por secreción próxima de algún

agente próximo a la célula diana o inyección del agente en la célula diana, o indirecto. La modulación indirecta de la célula diana puede ser dirigiendo una célula diferente, por ejemplo, modulando una célula adyacente a la célula diana, la cual célula adyacente puede ser comensal o patógena para la célula diana. La célula adyacente, como la célula diana, puede estar *in vitro* o *in vivo*, es decir, en un organismo, que puede ser comensal o patógeno. Estos métodos son colectivamente "métodos de uso proporcionados por la invención" y similares. En un aspecto relacionado, la invención proporciona usos diana del SADA y composiciones proporcionadas por la invención, en consonancia con los métodos de uso proporcionados por la invención.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona un método para modular un estado de una célula animal, proporcionando una cantidad eficaz de un SADA proporcionado por la invención o composición proporcionada por la invención para acceder a la célula animal. En determinadas realizaciones, se proporciona al SADA o composición acceso a la célula animal *in vivo*, en un animal, como un mamífero, como un ser humano. En algunas realizaciones, la célula animal se expone a bacterias en un animal sano. En realizaciones más particulares, la célula animal es epitelio pulmonar, una célula inmunitaria, célula cutánea, célula epitelial oral, célula epitelial intestinal, célula epitelial del tracto reproductivo o célula del tracto urinario. En realizaciones aún más particulares, la célula animal es una célula epitelial intestinal, tal como una célula epitelial intestinal de un sujeto humano con una enfermedad inflamatoria intestinal, tal como enfermedad de Crohn o colitis. En realizaciones aún más particulares, la célula animal es una célula epitelial intestinal de un sujeto con una enfermedad inflamatoria intestinal, y el SADA

comprende un sistema de secreción bacteriana y una carga que comprende un agente antiinflamatorio.

En otras realizaciones, la célula animal se expone a bacterias en una patología. En determinadas formas de realización, la célula animal es patógena, como un tumor. En otras realizaciones, la célula animal se expone a bacterias en una patología, como una herida, una úlcera, un tumor o un trastorno inflamatorio

En determinadas realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental comensal animal. En otras realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental patógena animal.

En determinadas realizaciones particulares, la célula animal se pone en contacto con una cantidad eficaz de un SADA que comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, en el que la carga se administra a la célula animal. En algunas realizaciones particulares, se proporciona acceso a la célula animal a una cantidad eficaz de un SADA que comprende una carga y un sistema de secreción, en el que la carga se secreta por vía extracelular y entra en contacto con la célula animal.

En algunas realizaciones, el estado de la célula animal se modula proporcionando una cantidad eficaz de un SADA proporcionado por la invención o una composición proporcionada por la invención con acceso a una célula bacteriana o fúngica en las proximidades de la célula animal. Es decir, estos métodos implican modular indirectamente el estado de la célula animal. En determinadas realizaciones, la célula bacteriana o fúngica es patógena. En realizaciones más particulares, se reduce la aptitud de la célula bacteriana o fúngica patógena. En otras realizaciones, la célula bacteriana o fúngica es comensal. En realizaciones más particulares, se aumenta la aptitud de la célula bacteriana o fúngica comensal. En realizaciones aún más

particulares, la aptitud de la cepa bacteriana o fúngica comensal aumenta mediante la reducción de la aptitud del número de bacterias u hongos competidores, que pueden ser neutrales, comensales o patógenos.

5 En ciertas realizaciones particulares, la célula bacteriana o fúngica en las proximidades de la célula animal se pone en contacto con una cantidad eficaz de SADA que comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, en donde la carga se administra a la célula bacteriana o fúngica. En otras
10 realizaciones particulares, a la célula bacteriana o fúngica en la vecindad de la célula animal se le proporciona acceso a una cantidad eficaz de carga que secreta SADA por vía extracelular que contacta con la célula bacteriana o fúngica.

 En determinadas realizaciones, el ADAS se deriva de una
15 cepa parental que es un competidor de la célula bacteriana o fúngica. En otras realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental que es una bacteria mutualista de la célula bacteriana o fúngica.

 Como se apreciará, los diversos métodos de uso
20 proporcionados por la invención que modulan el estado de una célula animal pueden adaptarse fácilmente a los métodos correspondientes para modular el estado de una célula vegetal, fúngica o bacteriana. Con fines ilustrativos, se mencionarán más particularmente métodos para modular la
25 célula vegetal o célula fúngica.

 En consecuencia, en un aspecto relacionado, la invención proporciona métodos para modular el estado de una célula de planta o fúngica proporcionando una cantidad eficaz de un SADA proporcionado por la invención o composición
30 proporcionada por la invención acceso a: a) la célula vegetal o fúngica, b) una célula bacteriana o fúngica adyacente en la vecindad de la célula de planta o fúngica, o c) una célula

de insecto o nemátodo en la vecindad de la célula vegetal o fúngica.

En determinadas realizaciones, se proporciona al ADAS acceso a la célula vegetal en la planta, por ejemplo, en una planta de cultivo como cultivos en hileras, que incluyen maíz, trigo, soja y arroz, y cultivos de hortalizas que incluyen solanáceas, como tomates y pimientos; cucurbitáceas, como melones y pepinos; brasicáceas, como coles y brócoli; verduras de hoja verde, como col rizada y lechuga; raíces y tubérculos, como patatas y zanahorias; verduras grandes sin semillas, como frijoles y maíz; y setas. En algunas realizaciones, la célula vegetal o fúngica se expone a bacterias en una planta u hongo sano. En otras realizaciones, la célula vegetal o fúngica se expone a bacterias en una patología.

En determinadas realizaciones, la célula vegetal o fúngica se está dividiendo, como una célula de meristemo, o es patógena, como un tumor. En algunas realizaciones, la célula vegetal o fúngica se expone a bacterias en una patología, como una herida, o en donde la célula de planta o fúngica no es parte de un alimento humano.

Para ciertas realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental comensal. En otras realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental patógena de planta o fúngica.

En algunas realizaciones, el SADA comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, y la carga se administra a la célula vegetal o fúngica. En otras realizaciones, a la célula vegetal o fúngica se le proporciona acceso a una cantidad eficaz de un SADA que comprende un sistema de secreción bacteriana y una carga, en donde el sistema de secreción bacteriana secreta la carga extracelularmente, poniendo en contacto así la célula vegetal o fúngica con la carga.

En algunas realizaciones, los métodos implican proporcionar una cantidad eficaz de SADA o acceso a la composición a la célula bacteriana o fúngica adyacente en la vecindad de la célula vegetal o fúngica. En realizaciones más particulares, la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente es patógena, opcionalmente en donde la aptitud de la célula bacteriana o fúngica adyacente patógena se reduce. En otras realizaciones más particulares, la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente es comensal, opcionalmente en donde la aptitud de la célula bacteriana o fúngica adyacente comensal aumenta. En realizaciones aún más particulares, la aptitud aumenta mediante la reducción de bacterias u hongos competidores, que pueden ser neutrales, comensales o patógenos.

En algunas realizaciones, la célula bacteriana o fúngica adyacente se pone en contacto con una cantidad eficaz de SADA que comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, en donde la carga se administra a la célula bacteriana o fúngica adyacente.

En otras realizaciones, a la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente se le proporciona acceso a una cantidad eficaz de SADA que comprende un sistema de secreción bacteriana y una carga, donde el sistema de secreción bacteriana secreta la carga por vía extracelular, poniendo en contacto así la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente con la carga.

En algunas realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental que es un competidor de la célula bacteriana o fúngica. En otras realizaciones, el SADA proviene de una cepa parental que es una bacteria mutualista de la bacteria adyacente o de la célula fúngica adyacente.

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen proporcionar una cantidad eficaz de SADA o acceso a la

composición a una célula de insecto o nemátodo en las proximidades de la planta u hongo. En realizaciones más particulares, el insecto o nemátodo es patógeno. En realizaciones aún más particulares, se reduce la aptitud de la célula de insecto o nematodo patógeno. En realizaciones aún más particulares, la aptitud de la célula de insecto o nematodo patógeno se reduce mediante la modulación de simbioses en la célula de insecto o nematodo. En otras realizaciones particulares, el insecto o nemátodo es comensal. En realizaciones más particulares, se incrementa la aptitud de la célula de insecto o nematodo comensal. En realizaciones aún más particulares, la aptitud aumenta mediante la reducción de bacterias u hongos, que pueden ser neutrales, comensales o patógenos.

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para eliminar uno o más materiales indeseables de un entorno que comprende poner en contacto el entorno con una cantidad eficaz de un SADA proporcionado por la invención o composición proporcionada por la invención, en el que el SADA comprende una o más moléculas (tales como proteínas, polímeros, nanopartículas, agentes aglutinantes o una combinación de los mismos) que absorben, quelan o degradan uno o más materiales indeseables. Los "entornos" se definen como dianas que no son células, como el océano, el suelo, los sitios del super fondo, la piel, los estanques, la luz intestinal y los alimentos en un recipiente.

En ciertas realizaciones, el material indeseable incluye un metal pesado, como mercurio, y el SADA incluye una o más moléculas (como proteínas, polímeros, nanopartículas, agentes aglutinantes o una combinación de los mismos) que se unen a metales pesados, como MerR para mercurio. En algunas realizaciones, el material indeseable incluye un plástico, como el PET, y el SADA incluye una o

más enzimas que degradan el plástico, como la PETasa. En determinadas realizaciones, el material indeseable comprende una o más moléculas orgánicas pequeñas y el SADA comprende una o más enzimas capaces de metabolizar dicha una o más moléculas orgánicas pequeñas.

E. Métodos de administración de ARN

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que contiene una bacteria o SADA proporcionada por la invención, en la que la bacteria o SADA incluye un T4SS, una carga de proteína de unión de ARN y una carga de ARN que está unida por la proteína de unión de ARN y es adecuada para administración en una célula diana a través del T4SS. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a ARN es una Cas9 fusionada a VirE2 y VirF, la carga de ARN es un ARN guía y, opcionalmente, la T4SS es el sistema Ti de *Agrobacterium*. En otras realizaciones, la proteína de unión a ARN es p19 de Carnation Italian Ringspot Virus fusionado a VirE2 o VirF, la carga de ARN es un ARNip y, opcionalmente, la T4SS es el sistema Ti de *Agrobacterium*.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona métodos para preparar estas composiciones particulares, tales métodos implican la transfección de un plásmido que contiene el Cas9 fusionado a VirE2 y VirF y carga de ARN en una célula de *Agrobacterium*.

En un aspecto relacionado adicional, la invención proporciona métodos para administrar ARN a una célula vegetal o animal que comprenden poner en contacto dicha célula vegetal o animal con una bacteria o SADA, donde la bacteria o SADA comprende un T4SS, una carga de proteína de unión a ARN, y una carga de ARN, en la que el ARN se administra a la célula vegetal o animal. En realizaciones más particulares, la carga de proteína de unión a ARN también se administra a la célula vegetal o animal.

EJEMPLOS

Tabla de contenidos

	Ejemplo 1	Producción de SADA mediante manipulación genética
5	Ejemplo 2	Purificación de SADA
	Ejemplo 3	Caracterización de SADA
	Ejemplo 4	Medición de la actividad de SADA
	Ejemplo 5	Los SADA generados por $\Delta minCDE$ parentales son altamente activos
10	Ejemplo 6	Los SADA con membrana presentan proteínas
	Ejemplo 7	Producción y administración de la carga por SADA
	Ejemplo 8	Carga de SADA de <i>E. coli</i> con carga de ARN
	Ejemplo 9	Administración de SADA de <i>E. coli</i> a Lepidoptera
15	Ejemplo 10	Almacenamiento de SADA
	Ejemplo 11	Métodos complementarios para la caracterización de SADA
	Ejemplo 12	Métodos complementarios para la producción de SADA de <i>E. coli</i>
20	Ejemplo 13	Métodos complementarios para la purificación de SADA que provienen de <i>E. coli</i> y medición de la eficacia
	Ejemplo 14	Preparación de SADA grande de <i>E. coli</i>
25	Ejemplo 15	Métodos complementarios para producir cepas bacterianas auxótrofas productoras de SADA para aumentar la pureza
	Ejemplo 16	Métodos complementarios para medir la actividad del SADA
30	Ejemplo 17	Métodos complementarios para almacenar SADA que proviene de <i>E. coli</i>
	Ejemplo 18	Evaluación de la similitud de SADA grandes con bacterias parentales

5

10

15

20

25

30

Ejemplo 19	Métodos complementarios para demostrar una mayor pureza de SADA auxótrófos
Ejemplo 20	Métodos complementarios para determinar si los SADA con ATP sintasa expresada son altamente activos
Ejemplo 21	Ensayos para actividad aumentada en SADA con supresión de componentes ϵ de ATP sintasa
Ejemplo 22	SADA altamente activos con vías de glucólisis modificadas
Ejemplo 23	Ensayos para la actividad aumentada en SADA sintetizados en condiciones de cultivo especializadas
Ejemplo 24	Ensayos para la actividad aumentada en SADA con flagelos eliminados y otras características no esenciales
Ejemplo 25	Ensayos para la actividad aumentada en SADA con capacidades fotosintéticas
Ejemplo 26	Métodos complementarios para crear SADA de <i>E. coli</i> con cargas activas estables de ácido nucleico y de proteína
Ejemplo 27	Aumento de la estabilidad de la carga mediante eliminación de ribonucleasas de SADA de <i>E. coli</i>
Ejemplo 28	Síntesis de un SADA de <i>B. subtilis</i> con un péptido señal de Tat
Ejemplo 29	SADA inmunomodulador para la supresión tumoral
Ejemplo 30	Síntesis de SADA y SADA altamente activo de <i>Pseudomonas putida</i>
Ejemplo 31	SADA de expresión de T6SS como un antimicrobiano y un protector de plantas
Ejemplo 32	SADA de <i>Serratia marcescens</i> como un modelo de SADA antifúngico

5	Ejemplo 33	Administración de proteínas a las células epiteliales del intestino humano a través de T3SS sobreexpresado
	Ejemplo 34	Métodos complementarios para la administración dirigida de SADA de <i>E. coli</i> con sistemas T3SS
	Ejemplo 35	Síntesis de SADA de <i>Xanthomonas citri</i> para administrar T3SS a las plantas
10	Ejemplo 36	Síntesis de SADA de <i>Agrobacterium</i> como un agente de transformación de plantas usando T4SS
	Ejemplo 37	Medición de la eficacia de secreción de SADA
	Ejemplo 38	SADA que contiene nanopartículas sin forma de bastón (<i>Magnetospirillum magneticum</i>)
15	Ejemplo 39	SADA sensible al entorno
	Ejemplo 40	SADA de eliminación de metales pesados de <i>E. coli</i> y extremófilos
	Ejemplo 41	Captación de lactosa y metabolismo mediante SADA de <i>E. coli</i>
20	Ejemplo 42	SADA de <i>E. coli</i> que expresa PETasa para la degradación de plástico
	Ejemplo 43	Secreción de ARN mediante un sistema de secreción de T4

Ejemplo 1: Producción de SADA mediante manipulación genética

El SADA puede producirse a partir de células bacterianas parentales por varios medios. En este ejemplo, los SADA se producen mediante la alteración de uno o más genes implicados en la regulación de las funciones de partición de la célula parental, es decir, la alteración de una proteína de inhibición del anillo z (por ejemplo, $\Delta minC$ o $\Delta minD$) o la alteración de las proteínas de inhibición del anillo z y un factor de especificidad topológica de división celular (por ejemplo, $\Delta minCDE$). Este ejemplo detalla los medios genéticos

para crear cepas productoras de SADA mediante la alteración del operón *min* o la sobreexpresión del componente de la maquinaria del tabique FtsZ.

A. Producción de SADA mediante mutaciones de min

5 Para alterar el operón *min*, se adoptó la metodología de recombinación Lambda-RED de acuerdo con los protocolos establecidos en Datsenko y Wanner, *PNAS*, 97(12): 6640-6645, 2000. Las cepas para diseño genético y que contienen los plásmidos para el sistema Lambda-RED se adquirieron del Coli Genetic Stock Center (CGSC) de la Universidad de Yale. En
10 resumen, los cebadores se diseñaron para deleccionar no polarmente las secuencias codificantes de *E. coli minC* (que genera la cepa bacteriana parental MACH061), *minD* (que genera la cepa bacteriana parental MACH062) o el operón *minCDE*
15 completo (que genera la cepa bacteriana parental MACH060) mediante la codificación aproximadamente 40 pares de bases de homología genómica en los extremos 5' de los cebadores. Los extremos 3' de estos cebadores son homólogos a los plásmidos pKD3 y pKD4 del sistema Lambda-RED, que
20 proporcionan marcadores antibióticos que se usaron para seleccionar cepas bacterianas parentales que heredan las mutaciones diana. Las secuencias de cebadores utilizadas para la delección se proporcionan en la Tabla 1. Después de realizar una PCR estándar utilizando los cebadores con pKD3
25 como molde de ADN, el amplicón purificado se transformó mediante electroporación en bacterias preparadas con pKD46, el plásmido que contiene el sistema de recombinación homólogo Lambda-RED derivado del fago, según los métodos de Datsenko y Wanner. *PNAS*, 97(12): 6640-6645, 2000. Los transformantes
30 se seleccionaron en agar LB con 35 µg/ml de cloranfenicol. Se confirmó que estas colonias resultantes tenían la alteración genética (es decir, $\Delta minC$, $\Delta minD$ o $\Delta minCDE$) usando

PCR estándar específica de alelo. Los genotipos de las cepas se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 1: Cebadores

Nombre del cebador	Descripción	Secuencia
oAF75	KO MinCDE DIRECTO	SEQ ID NO: 10
oAF76	KO MinCDE INVERSO	SEQ ID NO: 11
oAF77	KO MinC DIRECTO	SEQ ID NO: 12
oAF78	KO MinC INVERSO	SEQ ID NO: 13
oAF79	KO MinD DIRECTO	SEQ ID NO: 14
oAF80	KO MinD INVERSO	SEQ ID NO: 15
oAF167	KO SalTy MinCDE DIRECTO	SEQ ID NO: 16
oAF168	KO SalTy MinCDE INVERSO	SEQ ID NO: 17

Tabla 2: Cepas

Nombre	Descripción	Genotipo	Alias
MACH002	χ^{1488} pGreenTIR	F-, purE41, glnV42(AS), λ -, serC53, minB-2, his-53, xyl-14, metB65, cycA1, hsdR2, tte-1, cycB2, ilv-277	Yale University Coli Genetic Stock Center (CGSC) 14165
MACH009	BW25113	Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ -, rph-	CGSC 7636

		1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514	
5	MACH060	MACH009 Δ minCDE::CamR	BW25113 Δ minCDE::CamR Este trabajo
	MACH061	MACH009 Δ minC::CamR	BW25113 Δ minC::CamR Este trabajo
10	MACH062	MACH009 Δ minD::CamR	BW25113 Δ minD::CamR Este trabajo
	MACH065	MG1655	F-, λ -, rph-1 CGSC 7740
	MACH124	MACH060 pGFP	BW25113 Δ minCDE::CamR pGFP Este trabajo
15	MACH151	TOP10 pFtsZ	TOP10 pFtsZ Este trabajo
	MACH178	MACH009 pFtsZ	BW25113 pFtsZ Este trabajo
20	MACH198	MACH060 pSTING	BW25113 Δ minCDE::CamR pSTING Este trabajo
	MACH199	Vibrio parahaemolyticus pFtsZ	Vibrio parahaemolyticus EB101 pFtsZ American Type Culture Collection (ATCC) 17802
25	MACH200	MACH065 Δ minCDE::CamR	MG1655 Δ minCDE::CamR Este trabajo
30	MACH269	SalTy Δ minCDE pHilA-KanR	Salmonella typhimurium LT2 Δ minCDE::CamR pHilA-KanR ATCC 23564

5

10

15

20

25

30

MACH270	SalTy Δ minCDE pHilA-AmpR	Salmonella typhimurium LT2 Δ minCDE::CamR pHilA-AmpR	Este trabajo
MACH284	MACH060 pNeae-NB2	BW25113 Δ minCDE::CamR pNeae-NB2	Este trabajo
MACH300	HT115(DE3)	F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lisógeno: lacUV5 promotor -T7 polimerasa	CGSC HT115(DE3)
MACH301	MACH300 pARNi	MACH300 Δ minCDE::CamR	Este trabajo
MACH320	MACH060 pT3SS pVirB	BW25113 Δ minCDE::CamR pT3SS pVirB	Este trabajo
MACH434	MACH060 p0spB-TEM1	BW25113 Δ minCDE::CamR p0spB-TEM1	Este trabajo
MACH435	MACH060 pT3SS pVirB p0spB-TEM1	BW25113 Δ minCDE::CamR pT3SS pVirB p0spB-TEM1	Este trabajo
MACH556	MACH061 pGFP	BW25113 Δ minC::CamR pGFP	Este trabajo
MACH557	MACH062 pGFP	BW25113 Δ minD::CamR pGFP	Este trabajo

B. Producción de SADA mediante la sobreexpresión de ftsZ

Para crear SADA a partir de la sobreexpresión de la maquinaria del tabique, los presentes inventores construyeron un plásmido que promueve la expresión de la proteína del anillo Z FtsZ de *E. coli* de tipo silvestre. En resumen, un fuerte sitio de unión al ribosoma y la secuencia codificante para la proteína de *E. coli* FtsZ se optimizaron de nueva aparición utilizando herramientas computacionales ADN de nueva aparición. Esta unidad de traducción se solicitó para la síntesis de ADN de nueva aparición de Integrated DNA Technologies (IDT™) y se clonó en una estructura principal utilizando técnicas de clonación convencionales. El plásmido resultante, pFtsZ (Tabla 3), presenta un represor TetR, un promotor TetA que está reprimido por la proteína TetR, un marcador de resistencia a kanamicina y un origen de replicación pMB1. Cuando se transforma en una bacteria compatible, se puede inducir a pFtsz a producir en exceso la proteína FtsZ mediante la adición de anhidrotetraciclina al cultivo. Esta proteína es entonces capaz de formar protofilamentos espontáneos, que provocan la división asimétrica de las células bacterianas parentales y, por tanto, la producción de SADA.

Tabla 3: Plásmidos

Nombre del plásmido	Descripción	Secuencia	Referencia
pFtsZ	pMB1 KanR TetR- PtetA-FtsZ	SEQ ID NO: 18	Este trabajo
pGFP	pMB1 KanR TetR- PtetA-sfGFP	SEQ ID NO: 19	Este trabajo
pGreen TIR	pUC AmpR GFP		Miller y Lindow, <i>Gene</i> , 191(2): 149-

			53, 1997.
pHilA-CloDF	CloDF13 AmpR TetR-PtetA-HilA	SEQ ID NO: 20	Este trabajo
pHilA-pMB1	pMB1 AmpR TetR-PtetA-HilA	SEQ ID NO: 21	Este trabajo
pNeae-NB2	CloDF13 KanR TetR-PtetA-Neae-NB2	SEQ ID NO: 22	Este trabajo
pOspB-TEM1	ColE1 AmpR Plac-OspB-TEM1		Reeves et. al., ACS Syn Bio, 4; 644-654, 2015
pARNi	pMB1 AmpR T7- <i>P. xylostella chy1</i> -T7rev	SEQ ID NO: 23	Este trabajo
pSTING	pMB1 AmpR TetR-PtetA-DacA	SEQ ID NO: 24	Este trabajo
pT3SS	RK2 KanR <i>Shigella flexneri</i> sistema de secreción mínima 3		Mou et al., PNAS, 115(25), 6452-6457, 2018
pVirB	pSC101 SpecR Plac-VirB		Reeves et. al., ACS Syn Bio, 4; 644-654, 2015

Ejemplo 2: Purificación de SADA

Este ejemplo describe métodos para purificar poblaciones de SADA a partir de un cultivo de una cepa parental bacteriana productora de SADA. Este método puede emplearse para purificar cualquiera de las cepas productoras de SADA descritas en el presente documento, incluidas las cepas del Ejemplo 1 o la Tabla 3. La purificación separa SADA de las células bacterianas parentales viables, que son más grandes y contienen un genoma. Los SADA se purificaron

a partir de cultivos de alta densidad celular de cepas productoras de SADA mediante combinaciones de 1) centrifugación a baja velocidad, 2) excrecencia selectiva y 3) intercambio/concentración de tampón. Se utilizaron procedimientos de centrifugación a baja velocidad para agotar selectivamente las células bacterianas parentales viables y los restos celulares grandes, mientras se enriquecía SADA en una suspensión mixta. Se utilizaron procedimientos de crecimiento selectivo para reducir el número de células bacterianas parentales viables presentes en la muestra mediante la adición de compuestos que son directamente antimicrobianos (es decir, tóxicos para las células que tienen un genoma microbiano) y/o compuestos que mejoran la sedimentación de células viables mediante centrifugación a baja velocidad. Se utilizaron procedimientos de intercambio/concentración de tampón para hacer la transición de SADA de mayores volúmenes de medio de cultivo bacteriano a volúmenes más pequeños de 1x PBS mientras se eliminan los aditivos de cultivo y los restos celulares.

A. Purificación de SADA

Se generaron cepas productoras de ADAS usando los procedimientos de clonación molecular descritos en el Ejemplo 1, luego se cultivaron hasta una densidad celular alta en medio de cultivo. Los cultivos pueden ampliarse, por ejemplo, de 1 ml a 1000 ml o más de medio de cultivo.

Los cultivos se transfirieron a tubos de centrífuga y se sometieron a un procedimiento de centrifugación a baja velocidad destinado a sedimentar las células intactas y los restos de células grandes mientras se mantenía el SADA en el sobrenadante. Los procedimientos de centrifugación a baja velocidad se realizaron a 4 °C o a temperatura ambiente. En algunos casos, el procedimiento de centrifugación a baja

velocidad fue una secuencia de giros secuenciales de 10 minutos a 1,000xg, 2,000xg, 3,000xg y 4,000xg realizados en una centrífuga de mesa Allegra® X14R (Beckman Coulter) o una Eppendorf™ 5424 R de mesa. centrífuga (Fisher Scientific).
5 En algunos casos, el procedimiento de centrifugación a baja velocidad consistió en giros secuenciales de 2,000 xg durante 20 minutos a 4 °C en los que el sobrenadante del primer giro se decantó en una botella de centrífuga estéril antes del segundo giro. En algunos casos, el procedimiento de
10 centrifugación a baja velocidad consistió en un solo centrifugado de 40 minutos a 4,000xg en una centrífuga de alta velocidad Sorvall™ Lynx 6000 (Thermo Scientific™) en la que la velocidad de aceleración del rotor se estableció en la configuración más baja posible.

15 Después de la centrifugación a baja velocidad, los sobrenadantes del cultivo se decantaron en tubos de cultivo estériles y se sometieron a un proceso de crecimiento selectivo. En algunos casos, las soluciones de antibióticos concentrados (por ejemplo, Ceftriaxona, kanamicina,
20 carbenicilina, gentamicina y/o ciprofloxacina) u otras soluciones químicas concentradas (por ejemplo, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico M, glucosa, cas-aminoácidos y/o D-aminoácidos) se añadieron directamente a los sobrenadantes del cultivo. En otros casos, los
25 sobrenadantes del cultivo se sedimentaron mediante centrifugación a alta velocidad durante 5 a 60 minutos a 10,000 xg a 20,000 xg y los sedimentos se resuspendieron en medios de cultivo frescos que contenían concentraciones de antibióticos u otras soluciones químicas que inhibían las
30 células viables. El crecimiento selectivo se realizó incubando SADA a 4 °C a 42 °C durante 1 a 3 horas con agitación a 250 rpm. A continuación, los SADA se transfirieron a tubos de centrífuga estériles y se sometieron

a una ronda adicional de centrifugación a baja velocidad durante 15 minutos a 4 °C, 4.000xg.

Tras el crecimiento selectivo y la centrifugación a baja velocidad, los sobrenadantes se sometieron a procedimientos de intercambio/concentración de tampón. En algunos casos, esto se llevó a cabo pasando los sobrenadantes sobre un filtro de membrana de polietersulfona asimétrica (aPES) de 0.2 µm (Thermo Fisher) seguido de 1 a 9 volúmenes de PBS a 1x. En otros casos, los SADA se sedimentaron mediante centrifugación a 10,000xg a 20,000xg durante 5 a 60 minutos, se lavaron en 1 a 9 volúmenes de PBS a 1x, se sedimentaron nuevamente y se resuspendieron en PBS a 1x a una concentración de 1 a 100,000x del volumen de cultivo inicial.

B. Purificación de SADA a partir de cepas parentales auxótrofas productoras de SADA

Las cepas parentales productoras de SADA que son auxótrofas, es decir, que no pueden sintetizar un compuesto orgánico necesario para el crecimiento, son útiles para la fabricación de SADA. Tales cepas pueden crecer solo cuando se proporciona el compuesto orgánico. Por tanto, se pueden seleccionar cepas parentales auxótrofas almacenando o incubando una preparación de SADA en un medio que carece del compuesto orgánico, proporcionando así un método adicional para reducir la carga parental en la preparación de SADA.

Preparación de bacterias parentales auxótrofas de E. coli

Se adquirió una cepa parental auxótrofa productora de SADA y se generó una segunda cepa. MACH002 (Tabla 2) se adquirió del Yale University Coli Genetic Stock Center (CGSC) (cepa CGSC14165). MACH002 es una cepa doble auxótrofa de histidina (his-53) y metionina (metB65) que tiene una alteración de *minB* que produce SADA. Para construir la

segunda cepa parental auxótrofa productora de SADA, el plásmido pFtsZ descrito en el Ejemplo 1 y la Tabla 3 se transformó en la cepa de *E. coli* auxótrofa de leucina (leu-) Top10 y se seleccionó con 50 µg/ml de kanamicina para crear MACH151 (véase la Tabla 2 para el genotipo completo). Cuando se añade anhidrotetraciclina al sobrenadante del cultivo, se alivia la represión TetR del promotor TetA, se expresa la proteína FtsZ y las bacterias parentales producen SADA (Ejemplo 1). Se produjeron SADA de *E. coli* de acuerdo con los métodos del Ejemplo 2, pero con histidina y metionina incluidas en el medio para MACH002 o leucina y anhidrotetraciclina en el medio para MACH151. Los SADA se purificaron usando los métodos del Ejemplo 2 y luego se almacenaron en medios sin histidina y sin metionina para MACH002 o en medios sin leucina para MACH151.

Los SADA de cepas parentales auxótrofas tienen una mayor pureza

Los SADA se generaron a partir de cepas parentales auxótrofas y no auxótrofas. Se prepararon y purificaron SADA MACH060 (no auxótrofo) y MACH002 (auxótrofo de histidina metionina) mediante el proceso descrito en el Ejemplo 2. Los SADA de MACH178 (línea no auxótrofa que sobreexpresa FtsZ) y MACH151 (línea auxótrofa de leucina que sobreexpresa FtsZ) se prepararon y purificaron mediante el proceso descrito en el Ejemplo 2, con una ligera modificación de los protocolos de crecimiento: se añadió anhidrotetraciclina a los cultivos hasta una concentración final de 50 ng/ml durante el crecimiento para inducir la producción de SADA debido a la expresión de FtsZ. Para medir la pureza de las preparaciones de SADA, se recogieron muestras de 1 ml de sobrenadantes después de la etapa inicial de centrifugación secuencial de 4000 xg del proceso de purificación del Ejemplo 2. Estas muestras contenían tanto SADA como cualquier célula

bacteriana parental que no se eliminaron mediante centrifugación secuencial. A continuación, se sembraron alícuotas de 100 µl en medio no permisivo (M9 + glucosa al 0.2 %) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se enumeró la carga parental contando el número de UFC por placa (Figuras 8A y 8B). Mientras que las preparaciones de SADA producidas a partir de MACH060 y MACH178 de tipo silvestre albergaron una carga parental significativa, las preparaciones de SADA de los auxótrofos MACH002 y MACH151 demostraron niveles indetectables de bacterias parentales. Por tanto, las preparaciones de SADA auxótrofas producidas por dos métodos diferentes tienen cada una mayor pureza que las preparaciones de SADA a partir de SADA no auxótrofos. En algunas realizaciones no exhaustivas, MACH002 muestra al menos 10^6 menos carga parental que MACH060; MACH151 muestra al menos 10^4 menos carga parental que MACH178.

Ejemplo 3: Caracterización de SADA

Este ejemplo describe métodos para caracterizar poblaciones purificadas de SADA y/o cultivos bacterianos productores de SADA no purificados utilizando una variedad de enfoques, que incluyen microscopía electrónica, microscopía óptica e inmunofluorescencia, caracterización de nanopartículas, placas de células viables, inmunotransferencia y citometría de flujo.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó SEM para visualizar el proceso de tabicación y confirmar la existencia de una población de SADA en varias cepas bacterianas de interés. Para preparar muestras de SEM, se colocaron cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos, se recubrieron con polilisina al 0.01 % y se secaron. Luego, se generaron cepas de interés usando los procedimientos de clonación molecular descritos en el

Ejemplo 1, se cultivaron hasta una densidad celular alta y, en algunos casos, se sometieron a los procedimientos de purificación de SADA descritos en el Ejemplo 2. Las cepas o SADA purificados de interés se suspendieron en PBS y se transfirieron a la placa de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio revestidos con polilisina y se dejaron sedimentar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se aspiró cuidadosamente y se reemplazó con fijador de SEM (formaldehído-glutaraldehído al 2.5 % en tampón de cacodilato de sodio (sod cac) 0.1 M. Al día siguiente, se retiró el fijador, se lavaron las muestras con agua y se retiraron los cubreobjetos de la placa de 24 pocillos y se secaron usando secado de punto crítico. Después de secar, los cubreobjetos se montaron en cinta de carbono sobre soportes Hitachi de SEM, se recubrieron por pulverización catódica con una película de platino de 10 nm y se fotografiaron usando un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo Hitachi S-4700 (FE-SEM). La Fig. 1A muestra imágenes representativas de MACH009 (*E. coli* de tipo silvestre), MACH060 (*E. coli* con una delección de minCDE para permitir la producción de SADA) y SADA purificado de MACH060 (véase la Tabla 2). La cepa de *E. coli* de tipo silvestre MACH009 presenta el fenotipo normal de *E. coli*, en el que todas las células hijas tienen el mismo tamaño (Fig. 1A, panel izquierdo). La cepa MACH060 no purificada muestra una población con polidispersión mejorada en tamaño y presencia de partículas SADA, que son más pequeñas y esféricas (Fig. 1A, panel central). El MACH060 purificado muestra solo la población SADA (Fig. 1A, panel derecho). Usando SEM como se describe anteriormente, ADAS producido a partir de especies bacterianas en los géneros *Vibrio* y *Salmonella* usando diferentes técnicas de producción de ADAS (sobreexpresión de *ftsZ* y delección de minCDE, respectivamente) también se puede

visualizar en poblaciones no purificadas (datos no mostrados). Además, en las imágenes no purificadas, los eventos de septación anómalos son prominentes; la septación anómala es el evento que precede a la producción de SADA.

5 *Microscopía óptica e inmunofluorescencia*

La cepa de *E. coli* MACH060 se generó usando los procedimientos de clonación molecular descritos en el Ejemplo 1, luego se cultivó hasta una densidad celular alta durante la noche. Por separado, se recubrieron placas de
10 vidrio con fondo de cubreobjetos de 35 mm de ibidi® con una solución de polilisina al 0.01 % durante 5 minutos; se aspiró la solución y se dejaron secar las placas. Se colocó una suspensión densa de MACH060 en el fondo del cubreobjetos en gotas de 1 µl y se dejó que casi se seque. Luego se añadió
15 1 ml de fijador de paraformaldehído al 2.8 %/glutaraldehído al 0.04 % durante 30 min. Las muestras se lavaron 3 veces en PBS, se permeabilizaron con Triton™ X-100 al 0.1 % (Sigma-Aldrich), se lavaron 2 veces con PBS, se permeabilizaron adicionalmente con 10 µg/ml de lisozima, se lavaron 2 veces
20 con PBS, se bloquearon con suero de burro al 1 %, se lavaron 2 veces con PBS, se tiñeron con anticuerpo primario (anti-LPS de *E. coli*), se lavaron y se tiñeron con un anticuerpo secundario unido a Alexa Fluor® 555 (Thermo Fisher). Las placas se contratiñeron con DAPI durante 10 min y se lavaron
25 3 veces con PBS. Se obtuvieron imágenes de las placas finales utilizando una lente de objetivo de inmersión en aceite de 100X en un microscopio invertido Olympus IX83 (Olympus). Las imágenes se renderizaron utilizando el paquete informático disponible públicamente Fiji. La Fig. 1B muestra imágenes representativas de microscopía de fase (panel izquierdo) y
30 fluorescencia (paneles central y derecho) a 100X que muestran que dentro de la población original, hay SADA que tienen la

tinción de membrana de LPS, pero carecen de un genoma (sin tinción positiva de DAPI).

Caracterización de nanopartículas

Se generó una cepa productora de SADA de *E. coli* BW25113, MACH124, usando los procedimientos de clonación molecular descritos en el Ejemplo 1, luego se cultivó hasta una densidad celular alta en 1 l de medio de cultivo y se sometió a los procedimientos de purificación de SADA descritos en el Ejemplo 2. La población purificada de SADA se suspendió en PBS a 1x, se diluyó a una concentración entre 10^7 y 10^9 partículas por ml, y se añadió TWEEN® 20 (Sigma Aldrich) hasta una concentración final del 0.1 % (v/v) para minimizar la agregación de partículas. Esta suspensión de SADA se diluyó 20 veces y se cargó en un cartucho TS2000 (Technology® Supplies Ltd.) y se analizó en un analizador de nanopartículas Spectradyn® nCS1™. El nCS1™ mide tanto el tamaño como la concentración de partículas individuales en una suspensión aplicando un voltaje de polarización a través de una constricción de tamaño definido y monitoreando los cambios en la resistencia eléctrica en función del tiempo (Fraikin et al., *Nature Nanotechnology*, 6(5): 308-313, 2011). Se midieron 24,392 partículas dentro del intervalo de 200 a 2,000 nm. En otros ejemplos, el número de partículas medidas está entre 10 y 100,000 partículas. Los datos resultantes se representaron gráficamente como una distribución de tamaño acumulativa (Fig. 1C), que revela la concentración de partículas entre 200 y 2,000 nm de diámetro en la suspensión de SADA purificada de MACH124. La concentración más alta de SADA purificada a partir de MACH124 se encuentra dentro del intervalo de tamaño de 400 a 800 nm. Además, los datos se exportaron como un informe de intervalo de integración, que enumera el volumen agregado de partículas de 200 a 2,000 nm en la suspensión de SADA purificado (Fig.

1D). En conjunto, estos datos demuestran que la concentración y distribución de tamaño de SADA purificado se puede cuantificar mediante métodos de caracterización de nanopartículas. Además, la cuantificación de moléculas pequeñas (por ejemplo, ATP - Ejemplos 4 y 5), ácidos nucleicos o proteínas (por ejemplo, GFP - Ejemplos 4 y 5) observadas dentro de una población purificada de SADA se puede dividir entre el volumen añadido de SADA o el número de partículas presentes en el ensayo, lo que permite el cálculo de la concentración promedio de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos o proteínas de interés dentro de una población purificada de SADA.

Sembrado de células viables

Para determinar la concentración de células bacterianas parentales viables presentes antes y después de la purificación, se ensayaron el cultivo productor de SADA y la población de SADA purificada descrita en el Ejemplo 3C mediante sembrado de células viables. Se prepararon diluciones en serie transfiriendo repetidamente 100 µl del cultivo productor de SADA o de la población purificada de SADA en 900 µl de PBS a 1x. Luego, se colocaron 10 µl de cada dilución en un medio selectivo y se incubaron a 37 °C para permitir el crecimiento de células viables. Después de 24 horas, se contaron las diluciones que contenían de 1-100 colonias, y este recuento de colonias se multiplicó por el factor de dilución apropiado para enumerar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de muestra (es decir, la concentración de células viables presentes en cada muestra) (Fig. 1E). El cultivo de MACH124 tenía $>10^8$ UFC/ml, consistente con un cultivo de alta densidad de *Escherichia coli*; sin embargo, el número de células viables presentes en la población de SADA purificado fue inferior a 100 UFC/ml, el límite de detección para este ensayo. Por lo tanto, la

concentración de células viables presentes en una muestra se puede enumerar mediante sembrado de células viables, y los procedimientos de purificación de SADA descritos en el Ejemplo 2 son suficientes para reducir el número de células viables presentes en SADA purificado al menos por debajo de 100 UFC/ml en algunas realizaciones.

Inmunotransferencia

Para evaluar la capacidad de medir la composición de la proteína SADA, los presentes inventores caracterizaron la presencia en SADA de dos proteínas de mantenimiento, DnaK y GroEL, que se sabe que están presentes en las células bacterianas de *E. coli* parentales. Se generaron cepas productoras de SADA de *Escherichia coli* BW25113 (MACH060) y MG1655 (MACH200) usando los procedimientos de clonación molecular descritos en el Ejemplo 1, luego se cultivaron hasta una alta densidad celular en 100 ml de medio de cultivo y se sometieron a los procedimientos de purificación de SADA descritos en el Ejemplo 2. En paralelo, se sedimentaron alícuotas de 5 ml de los cultivos productores de SADA a 20,000 xg y se resuspendieron en 5 ml de PBS a 1x, luego se diluyeron 100 veces en PBS a 1x. Se añadió tampón de muestra NuPAGE™ LDS (Thermo Fisher) a 4x a alícuotas de 100 µl de los cultivos diluidos y al SADA purificado para lisar las muestras. Los diversos lisados se incubaron a 85 °C durante 2 minutos, luego se redisolviéron 40 µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida-SDS. Un control positivo, que comprende 10 ng de proteína GroEL de *E. coli* recombinante purificada (Abcam, ab51307) o proteína DnaK recombinante (Abcam, ab51121), también se desnaturalizó en tampón de muestra de LDSa 1x a 85 °C durante 2 minutos y se redisolvió en el gel. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en Intercept® (PBS) tampón de bloqueo (LI-COR®) y

se incubaron con una dilución a 1:1,000 de un anticuerpo dirigido a GroEL (Abcam, ab90522) o DnaK (Abcam, ab69617) a temperatura ambiente durante la noche. Las transferencias se lavaron luego en volúmenes en exceso de PBS + TWEEN® 20 al 0.05 %, se incubaron con anticuerpos anti-(LI-COR®, 926-68070) de ratón y anti-(LI-COR®, 926-32211) de conejo conjugados con colorantes fluorescentes durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó de nuevo en volúmenes en exceso de PBS + TWEEN® 20 al 0.05 % y se fotografió en un generador de imágenes Invitrogen™ iBright™ (Thermo Fisher). Las bandas específicas correspondientes a GroEL y DnaK estaban presentes en los carriles que contenían lisados de cultivos productores de SADA y en los carriles que contenían lisados de SADA purificado (Fig. 1F); por tanto, el contenido de proteínas de SADA puede detectarse mediante inmunotransferencia.

Ejemplo 4: Medición de la actividad de SADA

Los presentes inventores probaron la capacidad de SADA para realizar trabajo celular y la capacidad de los presentes inventores para medir este trabajo. Los presentes inventores midieron la capacidad de trabajo examinando el nivel de adenosín trifosfato (ATP) en SADA y mediante la evaluación de la capacidad de SADA para transcribir y traducir una proteína diana. La capacidad de una célula para realizar un trabajo está directamente relacionada con su nivel de ATP. El ATP es el principal vehículo de energía de los organismos procariotas y eucariotas, y lleva energía química dentro de los enlaces entre sus tres grupos fosfato que se libera cuando se rompen. El ATP es necesario para procesos celulares esenciales, como la transcripción, la traducción, el transporte y el metabolismo.

A. Medición de ATP

Se purificaron SADA que provienen de bacterias parentales MACH060 (BW25113 Δ_{minCDE} ; Tabla 2) como se describe en el Ejemplo 2 usando excrecencia selectiva de un sobrenadante de cultivo concentrado. Los SADA purificados se sometieron a caracterización de nanopartículas y procedimientos de placa de células viables, como se describe en el Ejemplo 3. La concentración de SADA en la preparación de SADA purificada fue de 5×10^8 SADA/ml y el volumen total de partículas presentes fue de 3.2×10^{16} nm³/ml. La siembra en placa de UFC reveló que la concentración de células viables (por ejemplo, células parentales) presentes dentro de la población purificada de SADA estaba en el límite de detección o por debajo del mismo (100 UFC/ml).

La concentración de ATP presente en la población purificada de SADA se midió por triplicado usando el ensayo de viabilidad celular microbiana BacTiter-Glo™ (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 100 μ l de tampón de ensayo rehidratado a los pocillos que contenían 100 μ l de SADA purificado o una masa definida de ATP, que sirvió como patrón molecular. La señal de luminiscencia de cada pocillo se registró en un lector de placas. La señal de luminiscencia transformada logarítmicamente para las masas definidas de ATP se representó frente a las masas transformadas logarítmicamente de ATP, y se ajustó una línea a estos datos para generar una curva estándar. Posteriormente, la señal de luminiscencia observada en los pocillos que contenían SADA purificado se ajustó a esta curva estándar para calcular una masa de ATP presente en el pocillo (Fig. 2A). Los niveles de ATP generados por contaminantes de células viables estaban por debajo del límite de detección para el ensayo y se restaron del total de SADA como fondo. La masa de ATP presente dentro

de cada pocillo de SADA purificado se dividió entre el volumen de partículas añadidas de SADA presente dentro del pocillo: esta proporción representa la concentración de ATP presente dentro de una población de SADA purificada a

5

B. Generación de ATP

Para determinar la capacidad de SADA para generar ATP en ausencia de un genoma, se midió la concentración de ATP de SADA purificado a lo largo del tiempo. Los SADA que

10 provienen de MACH124 (BW25113 Δ_{minCDE} ; Tabla 2) se purificaron como se indica en el Ejemplo 2 usando excrecencia selectiva de un sobrenadante de cultivo concentrado. Los SADA purificados se suplementaron con medios ricos en nutrientes (caldo Luria al 10 %) junto con 50 $\mu\text{g/ml}$ del

15 antibiótico carbenicilina. Los SADA se dividieron en dos alícuotas y se probaron en paralelo; una alícuota se colocó inmediatamente en almacenamiento a 4 °C y la otra alícuota se incubó en un Eppendorf ThermoMixer® a 37 °C, a 800 rpm durante dos horas. Después de la incubación de dos horas, se

20 midieron las concentraciones de ATP de ambas alícuotas tal como se describe anteriormente. La incubación durante dos horas dio como resultado un aumento del 54.9 % en la cantidad de ATP, lo que indica que el SADA puede generar ATP en ausencia de un genoma (Fig. 2B).

25

C. Transcripción y traducción de una proteína diana: GFP

Para medir la capacidad de SADA para transcribir y traducir un gen diana, se transformó MACH060 (BW25113 Δ_{minCDE} (Tabla 2)) con pGFP, un plásmido que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). Esta secuencia se optimizó por

30 codones para la expresión en *E. coli* y se clonó en un plásmido que contenía el promotor TetA, el represor TetR (que reprime el promotor TetA), un origen de replicación pMB1 y un gen de resistencia a la kanamicina para la selección de

antibióticos. A continuación, se obtuvieron SADA de esta cepa (MACH124) y se purificaron como se indica en el Ejemplo 2, usando excrecencia selectiva de un sobrenadante de cultivo concentrado. Se determinó que la carga parental estaba en el límite de detección mediante siembra en placa de UFC (<100 UFC/ml). Para examinar la expresión de proteínas en ADAS, se emplearon dos métodos: (1) medir la fluorescencia de GFP a lo largo del tiempo usando un lector de placas, y (2) inmunotransferencia.

(1) Método de lector de placas

Se incubaron bacterias parentales o SADA purificados en medio de crecimiento mínimo (medio de sales mínimas (M9) con casaminoácidos al 0.2 %, glucosa al 0.2 % y ceftriaxona a 100 ug/ml). Las muestras de SADA purificadas se complementaron con un antibiótico para prevenir el crecimiento de cualquier bacteria parental que contenga el genoma. Además, para las muestras inducidas, se añadió al medio el inductor, anhidrotetraciclina, hasta una concentración final de 100 ng/ml. Tras la adición de anhidrotetraciclina, se alivió la represión de TetR del promotor de TetA y se expresó la proteína GFP. La detección de la señal de GFP se midió utilizando longitudes de onda de 479 nm y 520 nm para la emisión y la excitación, respectivamente. Las Fig. 2C-2E demuestran un aumento dependiente del inductor en la transcripción y traducción de GFP, medido por fluorescencia de GFP, en SADA de MACH124 durante 12 horas. En ausencia del inductor (no inducido) no hubo aumento en la señal de GFP. Este hallazgo muestra que los SADA de $\Delta minCDE$ son capaces de transcribir y traducir un gen diana de una manera dependiente del inductor. Además, la Fig. 2C muestra que la señal de GFP generada por SADA purificado no se debe a la contaminación parental, ya que la señal de GFP de 100 UFC/ml de bacterias parentales fue

significativamente menor que la del SADA y no aumentó con el tiempo.

(2) Método de inmunotransferencia

El SADA purificado de MACH124 y un volumen igual de
5 caldo Luria suplementado con carbenicilina a 100 µg/ml e
inductor de anhidrotetraciclina (1000 ng/ml) se dividieron
en alícuotas en tubos de centrifuga estériles. Las muestras
se incubaron en un ThermoMixer® de Eppendorf a 37 °C, 800
rpm durante 24 horas. Después de 24 horas, los SADA se
10 centrifugaron a 20,000×g durante 10 minutos a 4 °C. Se
eliminó el sobrenadante y los SADA sedimentados se
resuspendieron en tampón de lisis (reactivo de extracción de
proteína BugBuster™ 1x (MilliporeSigma™) con tampón de
muestra de LDS NuPAGE™ a 1x (Thermo Fisher)) y se calentaron
15 a 85 °C durante 2 minutos. A continuación, se cargó un
volumen igual de SADA lisado en un gel de poliacrilamida
BisTris al 4-12 %. Las proteínas del gel se redisolviéron,
se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se
incubaron en tampón de bloqueo Intercept® (PBS) (LI-COR®)
20 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después, la
membrana se incubó con anticuerpo primario (anti-GroEL de
ratón (Abcam, ab90522) a una dilución de 1:500 y anti-GFP de
conejo (Abcam, ab6556) a una dilución de 1:500) durante 60
minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos se
25 resuspendieron en el tampón de bloqueo Intercept® PBS
suplementado con TWEEN® 20 al 0.2 %. La membrana se lavó
posteriormente tres veces en PBS a 1x + TWEEN® 20 al 0.05 %,
seguido de incubación en tampón de bloque de PBS Intercept®
con TWEEN® 20 al 0.2 % suplementado con anticuerpos
30 secundarios relevantes (anti-800 de ratón en cabra (Abcam,
ab216772) y anti-680 de conejo en cabra (Abcam, ab175773)
ambos a una dilución de 1:5,000). La membrana se lavó tres
veces en PBS a 1x + TWEEN® 20 al 0.05 % y se fotografió en

un generador de imágenes Invitrogen™ iBright™ (Thermo Fisher). La intensidad de la banda se cuantificó mediante densitometría y la intensidad de GFP se expresó normalizada frente al control de carga, GroEL. La Fig. 2F demuestra un
5 aumento dependiente del tiempo en la cantidad de proteína GFP detectada en el SADA inducido.

Ejemplo 5: Los SADA generados por $\Delta minCDE$ parentales son altamente activos

Los SADA purificados a partir de células parentales que
10 comprenden las mutaciones $\Delta minC$, $\Delta minD$ o $\Delta minCDE$ se analizaron mediante un lector de placas e inmunotransferencia para comparar sus capacidades para transcribir y traducir un gen reportero de GFP. Inesperadamente, se descubrió que el SADA que proviene de
15 células parentales $\Delta minCDE$ tenía mayor actividad que el SADA que proviene de células bacterianas parentales $\Delta minC$ o $\Delta minD$.

A. Purificación de SADA a partir de cultivos de $\Delta minCDE$, $\Delta minC$, o $\Delta minD$

Las cepas productoras de SADA MACH124 (BW25113 $\Delta minCDE$
20 + pGFP), MACH556 (BW25113 $\Delta minC$ + pGFP) y MACH557 (BW25113 $\Delta minD$ + pGFP) (véase la Tabla 2) se cultivaron a alta densidad celular en 1 l de medio de cultivo y se sometieron a los procedimientos de purificación de SADA descritos en el Ejemplo 2. El plásmido pGFP transportado por las 3 de estas
25 cepas se describe con más detalle en la Tabla 3. Los SADA purificados se sometieron a los procedimientos de caracterización de nanopartículas y de sembrado en placa de células viables descritos en el Ejemplo 3. La concentración de SADA fue: MACH124 = 2.4×10^9 SADA/ml, MACH556 = 1.86×10^9
30 SADA/ml, y MACH557 = 1.98×10^9 SADA/ml. Se descubrió que la carga de células bacterianas parentales viables presente en el SADA purificado era menor que el límite de detección por placa de UFC (<100 UFC/ml).

B. Cinética de expresión de GFP ensayada mediante lector de placas

La capacidad de SADA para expresar GFP de una manera dependiente del inductor se evaluó como se describe en el Ejemplo 4C. Las Fig. 3A y 3B muestran un aumento dependiente del inductor en la transcripción y traducción de GFP en los SADA de MACH124, MACH556 y MACH557 que persistió durante 12 horas. En ausencia del inductor (no inducido), el SADA no produjo GFP. Los datos de las Fig. 3A y 3B se normalizan tal como se describe en el Ejemplo 4C. Mientras que los SADA que proviene de las tres cepas de delección del locus min fueron capaces de expresar GFP tras la inducción, el SADA que proviene de MACH124 (BW25113 Δ minCDE) produjo una señal de GFP más alta a lo largo del tiempo. A las 12 horas, la señal GFP del SADA de MACH124 era ~ 119 % más alta que la del SADA de MACH557 y ~ 186 % más alta que la del SADA de MACH556. Los SADA generados a partir de los parentales Δ minCDE expresan, por tanto, niveles más altos de GFP tras la inducción que los generados a partir de los parentales Δ minC o Δ minD.

Las curvas de producción de GFP sin procesar observadas para MACH124, MACH556 y MACH557 se usaron para comparar la producción de proteína total y la tasa promedio de producción de proteína para SADA purificada de cada cepa e incubada en presencia de inductor. Se ajustó una línea de regresión a cada conjunto de datos y se calculó el área bajo la curva, que refleja la producción total de GFP durante 12 horas, utilizando GraphPad Prism. El SADA de MACH124 produjo significativamente más GFP que el SADA de MACH556 o MACH557 (Fig. 3D). Para evaluar la tasa promedio de producción de GFP durante el transcurso del experimento, el área bajo cada curva se dividió entre la duración del experimento. La tasa promedio de producción de GFP durante 12 horas fue

significativamente mayor para el SADA de MACH124 que para los SADA de MACH556 o MACH557 (Fig. 3E). Finalmente, la cantidad total de GFP producida por SADA de MACH556 y MACH 557 se expresó como un porcentaje de la GFP producida por SADA de MACH124, que se normalizó al 100%. Estos datos se representan gráficamente en la (Fig. 3F). El SADA de MACH124 (Δ_{minCDE}) produjo una mayor cantidad total de GFP que MACH556 (Δ_{minC}) y MACH557 (Δ_{minD}).

C. Expresión de GFP ensayada mediante inmunotransferencia

Los SADA de MACH124, MACH556 y MACH557 se incubaron en medio de cultivo LB al 50 % con 50 µg/ml de carbeniclina y en presencia o ausencia de anhidrotetraciclina (1 µg/ml) en un Eppendorf ThermoMixer® a 37 °C, 800 rpm durante 24 horas. La inmunotransferencia se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Después de 24 horas, los SADA se centrifugaron a 20,000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y los SADA sedimentados se resuspendieron en tampón de lisis (reactivo de extracción de proteína BugBuster™ 1x (MilliporeSigma™) con tampón de muestra de LDS NuPAGE™ a 1x (Thermo Fisher)) y se calentaron a 85 °C durante 2 minutos. A continuación, se cargó un volumen igual de SADA lisado en un gel de poliacrilamida BisTris al 4-12 %. Las proteínas del gel se redisoluvieron, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron en tampón de bloqueo Intercept® PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. La membrana se incubó con anticuerpo primario (anti-GroEL de ratón a una dilución de 1:500 y anti-GFP de conejo a una dilución de 1:500) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos se resuspendieron en el tampón de bloqueo Intercept® PBS suplementado con TWEEN® 20 al 0.2 %. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces en PBS a 1x + TWEEN® 20 al 0.05 % seguido de incubación en

tampón de bloqueo Intercept PBS + TWEEN® 20 suplementado con anticuerpos secundarios relevantes (anti-800 de ratón en cabra y anti-680 de conejo en cabra, ambos a dilución de 1:5,000 dilución). La membrana se lavó tres veces en PBS a 1x + TWEEN® 20 al 0.05 % y se fotografió en un generador de imágenes Invitrogen™ iBright™ (Thermo Fisher) (Fig. 3C). La intensidad de la banda se cuantificó mediante densitometría (Fig. 3C, panel central) y la intensidad de GFP se expresó normalizada frente al control de carga, GroEL (Fig. 3C, panel inferior). El SADA de MACH124 demostró una mayor producción de GFP en comparación con los SADA de MACH556 y MACH557, lo que indica que MACH124 (Δ_{minCDE}) muestra una mayor actividad en términos de producción de proteínas.

Ejemplo 6: Los SADA con membrana presentan proteínas

Este ejemplo demuestra la presentación de nanocuerpos en la membrana como un agente de direccionamiento modelo para SADA. Los nanocuerpos son los fragmentos de anticuerpos funcionales más pequeños conocidos, y un trabajo reciente ha demostrado que pueden expresarse en la superficie de las células de *E. coli* (Salema y Fernandez, *Microb Biotechnol*, 10(6), 2017). Los nanocuerpos de superficie pueden unirse de manera eficaz a proteínas diana y se pueden usar para mejorar la afinidad de unión específica de la célula. Este ejemplo demuestra que los agentes de dirección (en este caso nanocuerpos) se pueden expresar en la superficie de SADA.

A. Producción de cepas de E. coli que contienen un nanocuerpo dirigido a HER2

Para construir SADA capaz de dirigirse al receptor HER2 (asociado con cáncer de mama), se sintetizaron plásmidos (pNeae-NB2) (Tabla 3) con secuencias de nanocuerpos fusionadas al gen de intimina de EHEC 0157:H7 cepa EDL933stx-. Específicamente, se fusionaron 583 aminoácidos de la porción N-terminal del gen de intimina (Neae) a una etiqueta

E (SEQ ID NO: 5), un enlazador de glicina-glicina-serina, la secuencia de nanocuerpos NB2 (SEQ ID NO: 6), un enlazador de serina-glicina y una etiqueta FLAG en C-terminal (SEQ ID NO: 7). Esta secuencia se optimizó por codones para la expresión en *E. coli* y se clonó en un plásmido que contenía el promotor TetA, el represor TetR (que reprime el promotor TetA), un origen de replicación CloDF13 y un gen de resistencia a la kanamicina para la selección de antibióticos para crear pNeae-NB2 (véase la Tabla 3). Cuando se añadió anhidrotetraciclina al sobrenadante del cultivo, se alivió la represión TetR del promotor TetA y se expresó la proteína de fusión Neae-NB2. La proteína de fusión Neae-NB2 se ensambla en la membrana externa de la célula bacteriana parental de *E. coli* que lleva el plásmido, y el nanocuerpo NB2 se muestra hacia afuera. El plásmido pNeae-NB2 se transformó en una cepa de *E. coli* BW25113 con una delección del locus minCDE con un casete de resistencia al cloranfenicol y se seleccionó con la adición de 50 µg/ml de kanamicina y 35 µg/ml de cloranfenicol en el medio de crecimiento para crear MACH284 (véase la Tabla 2).

B. Producción de SADA con expresión de nanocuerpos HER2

Se prepararon y purificaron SADA de MACH060 (SADA de control negativo sin modificar) y de MACH284 con anticuerpos dirigidos en su superficie mediante el proceso descrito en el Ejemplo 2, con una ligera modificación del medio de crecimiento. Aquí, se añadió anhidrotetraciclina al cultivo hasta una concentración final de 50 ng/ml durante el crecimiento, de modo que, a medida que se producían SADA a partir de los parentales, expresaban la proteína de fusión dirigida a Neae-NB2 del plásmido.

C. Confirmación de la visualización del nanocuerpo HER2 en la superficie del SADA

Para confirmar la expresión de Neae-NB2 en la superficie del SADA, realizamos un marcaje inmunofluorescente. Se diluyeron SADA de MACH060 y MACH284 a una concentración de ~ 5×10^8 partículas/ml en PBS según se determinó mediante análisis usando un analizador de nanopartículas Spectradyne® nCS1™. Se añadió a las muestras un anticuerpo dirigido a la característica de la etiqueta E en la fusión Neae-NB2 (Abcam, ab3397) hasta una concentración final de 5 µg/ml en 1 ml de las muestras. Estas muestras se mezclaron suavemente y se dejaron incubar durante 2.5 horas en hielo. Después de la incubación, los SADA se recogieron mediante centrifugación a 15,000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió suavemente en 800 µl de PBS + TWEEN® 20 al 0.05 % en v/v. Este lavado se repitió dos veces y el sedimento final se resuspendió en 0.5 ml de PBS + TWEEN®20 al 0.05 %. Se añadieron 2.5 µl de anti-conejo en burro conjugado con fluoróforo DyLight® 550 (Abcam, ab98489) a la muestra, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 1 hora. Después de esta incubación, los SADA se recogieron mediante centrifugación a 15,000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 µl de PBS + TWEEN®20 al 0.05 %. Este lavado se repitió tres veces en total y el sedimento final se resuspendió en 250 µl del tampón. Se extrajeron 200 µl de muestra en una placa de polipropileno de 96 pocillos de fondo transparente y paredes negras. Luego se leyó esta placa para determinar la densidad óptica a 600 nm y la fluorescencia DyLight® 550 (excitación: 487 nm, emisión: 528 nm) utilizando un barrido de área del pocillo. La Fig. 4 muestra los resultados del experimento de etiquetado usando fluorescencia DyLight® 550 normalizada a

densidad óptica. Mientras que el SADA de MACH060 de tipo silvestre mostró una fluorescencia insignificante, el SADA de MACH284 del nanocuerpo Neae-NB2 mostró un aumento estadísticamente significativo de casi 10 veces en la fluorescencia. Por lo tanto, el nanocuerpo diana se expresó y mostró de manera eficaz en la membrana externa del SADA.

Ejemplo 7: Producción y administración de la carga por SADA

Este ejemplo demuestra que los SADA de la invención son capaces de producir y administrar una carga que tiene un efecto específico sobre una célula u organismo diana. Como modelo, los presentes inventores crearon SADA de *E. coli* que generan dinucleótidos cíclicos específicos (CDN). En particular, se indujo a los SADA a producir nucleótidos bacterianos c-di-AMP que activan la vía del Estimulador de Genes de Interferón (STING) a través de RECON (REductasa que CONTrola NF- κ B) de células de mamíferos (Witte *et al.*, *Mol Cell*, 30(2): 167-178, 2008), mediante la expresión de una enzima heteróloga. Este ejemplo demuestra además que un SADA puede expresar una enzima que cataliza la producción de una carga, que luego se puede administrar a una célula diana.

A. Construcción del SADA de E.coli agonista de STING

Para crear un SADA capaz de activar la vía de STING, se expresó una diadenilato ciclasa en una cepa BW25113 de *E. coli* Δ *minCDE::CamR* (MACH060), como se preparó en el Ejemplo 1. Para ello, la secuencia de aminoácidos de la proteína diadenilato ciclasa A (DacA) de *Listeria monocytogenes* (Número de registro: Q8Y5E4) se optimizó por codón para la expresión en *E. coli*, se sintetizó de nueva aparición mediante tecnologías integradas de ADN y se clonó en un plásmido que contenía el promotor TetA (pTet), el represor TetR (que reprime el promotor TetA), un origen de replicación pMB1 y un gen de beta-lactamasa para la selección de antibióticos, produciendo el plásmido pSTING (Tabla 3). Este

plásmido se transformó en MACH060 (BW25113 *E. coli* Δ *minCDE::CamR*) y se seleccionó para usar 100 µg/ml de carbenicilina y 35 µg/ml de cloranfenicol en el medio de crecimiento para producir la cepa MACH198 (Tabla 2). Cuando se indujo con anhidrotetraciclina añadida al medio de crecimiento, MACH198 produjo DacA, que cataliza la condensación de dos moléculas de ATP en el potente activador de STING di-AMP cíclico.

B. Purificación de los SADA de MACH060 y MACH198

Para los ensayos de activación de STING, se prepararon MACH060 y MACH198 usando los métodos descritos en el Ejemplo 2 con modificaciones menores. Brevemente, se usaron dos cultivos de MACH198: uno que creció normalmente (no inducido) y otro con 200 ng/ml de anhidrotetraciclina agregada (inducida). Los SADA se concentraron y recolectaron usando un filtro de tapa de botella de 0.2 µm y se resuspendieron en medio de crecimiento THP1-Dual™ (InvivoGen) hasta una concentración final de aproximadamente 10⁹ partículas/ml. La carga parental residual, según se evaluó mediante el método de placas de UFC descrito en el Ejemplo 2, mostró menos de 200 UFC/ml de células bacterianas parentales.

C. Evaluación de la función mediante ensayos con células de mamíferos

Se utilizó la línea celular de monocitos THP1-Dual™ (Invivogen) para evaluar la activación de la vía STING mediante una lectura de luminiscencia. Las células THP1-Dual™ presentan el gen Lucia, un gen indicador de luciferasa secretado, bajo el control de un promotor mínimo ISG54 junto con cinco elementos de respuesta estimulados por IFN. Cuando los elementos de respuesta estimulados por IFN se activan, por ejemplo, por exposición a c-di-AMP (por ejemplo, por fagocitosis de SADA que comprende c-di-AMP (por ejemplo, el SADA de MACH198)), el promotor mínimo ISG54 se activa y la

luciferasa se transcribió, se tradujo y se secretó de luciferasa al medio celular. Para cuantificar la luciferasa, se añade el sustrato QUANTI-Luc™ (InvivoGen) al medio celular. QUANTI-Luc™ contiene el sustrato de luciferasa coelenterazina, que produce una señal de luz cuando se hidroliza por luciferasa que puede cuantificarse utilizando un lector de placas.

Para evaluar si el SADA activa la vía STING en células THP1-Dual™, se cultivaron células THP1-Dual™ según las especificaciones de InvivoGen y se sembraron en una placa de 96 pocillos a una concentración de 5×10^5 células/ml a 125 µl por pocillo. Se añadieron SADA de MACH060, MACH198 no inducido y MACH198 inducido (Tabla 2) $\sim 4 \times 10^7$ SADA/ml a un volumen de 100 µl por pocillo. Después de incubar a 37 °C durante 42 horas, la placa se centrifugó a 300 xg durante 5 minutos. Finalmente, se extrajeron 20 µl de medio de cada pocillo y se colocaron en una placa de paredes blancas que contenía 50 µl por pocillo de QUANTI-Luc™. La luminiscencia se leyó con un lector de placas inmediatamente. La Fig. 5A muestra la luminiscencia promedio de las muestras de cada condición experimental normalizada al volumen de SADA añadido, según se determina usando un analizador de nanopartículas Spectradyn® nCS1™ como se describe en el Ejemplo 1. Cada condición de SADA incluyó 6 réplicas biológicas. Se obtuvo poca o ninguna señal de luminiscencia del SADA de MACH060, que no contenía el gen DacA y en gran medida no desencadenó elementos de respuesta estimulados por IFN en las células THP1-Dual™. Sin embargo, el SADA de MACH198, que contenía el gen DacA bajo el control de pTet, estimuló las células THP1-Dual. La mayor estimulación se observó en las muestras en las que se indujo la expresión de DacA mediante cultivo con anhidrotetraciclina. Además, cuando los monocitos experimentan la estimulación de los

genes de IFN, las células asumen un fenotipo activado y pasan de monocitos no adherentes en suspensión a macrófagos adherentes activados. Los presentes inventores observaron esta transición en las muestras expuestas a varias poblaciones de SADA. La Fig. 5B muestra que el fenotipo adherente activado es más evidente en las muestras en las que se trataron células THP1-Dual™ con SADA de MACH198 inducido por anhidrotetraciclina.

La obtención de la respuesta del interferón tipo I aguas abajo es esencial para la función de la vía STING. El sello distintivo de esta respuesta es la secreción de interferones de tipo I, como el interferón beta (IFNB1). Para dilucidar aún más la capacidad del SADA para inducir una respuesta de STING funcional, se cuantificó IFNB1 para cada muestra usando un kit ELISA de IFN-beta Quantikina humano (DIFNB0, R&D Systems®). Se aspiraron los sobrenadantes celulares de los pocillos analizados anteriores y se diluyeron en el intervalo lineal del ELISA. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La Fig. 5C muestra los resultados del ELISA. Mientras que el SADA de MACH060 y el agonista de STING de molécula pequeña (proporcionado como control) mostraron niveles de IFNB1 por debajo del límite de detección del ensayo ELISA (<5 pg/ml), el SADA de MACH198 no inducido mostró trazas de IFNB1 (~ 7 ng/ml) y el MACH198 inducido mostró un aumento de más de 40X en el IFNB1 secretado en el sobrenadante celular (~ 300 ng/ml). Por tanto, el SADA demostró la capacidad de producir una carga mediante la expresión de una enzima heteróloga, cuya carga se administró a una célula diana e indujo una respuesta funcional (en este caso inmunomoduladora).

Ejemplo 8: Carga de SADA de *E. coli* con carga de ARN

Este ejemplo describe la expresión y empaquetamiento de carga de ARN, en este caso ARN_{dc} que se dirige al gen de la quimiotripsina (*chy1*) de *Plutella xylostella* en SADA.

A. Construcción de líneas parentales de E. coli que contienen un ARN_{dc}

Para construir un SADA empaquetado con ARN_{dc}, se clonó una secuencia de 412 pb (SEQ ID NO: 8) correspondiente a una porción de la región codificante del gen *chy1* de *Plutella xylostella* para quimiotripsina en el plásmido L4440 (Fire et al., *Nature*, 391(6669): 806-811, 1999), que contiene promotores duales de T7, un origen de replicación pMB1 y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de antibióticos que produce pARN_i (véase la Tabla 3). Este plásmido se transformó en MACH300 (Tabla 2), una cepa de *E. coli* HT115(DE3) Δ _{minCDE} que contiene un casete de resistencia al cloranfenicol, y se seleccionó con la adición de 50 µg/ml de carbenicilina y 35 µg/ml de cloranfenicol en el medio de crecimiento para crear MACH301 (Tabla 2). MACH301 también porta una alteración en el gen *rnc*, que codifica ribonucleasa III, que degrada el ARN_{dc}, con un casete de resistencia a tetraciclina. Esta cepa también lleva el profago DE3, que codifica una copia del gen de la ARN polimerasa de T7 detrás del promotor *lac*. Cuando se añade isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio, se expresa la ARN polimerasa de T7. La ARN polimerasa de T7 luego transcribe la secuencia de *chy1* insertada de ambos promotores de T7, creando un ARN_{dc} correspondiente.

B. Producción de SADA con ARN_{dc}

Se prepararon y purificaron SADA de MACH301 cargados con ARN_{dc} mediante el proceso descrito en el Ejemplo 2, con modificaciones en las condiciones de crecimiento. Brevemente, los cultivos de una noche de MACH301 se diluyeron a 1:200 en LB con 50 µg/ml de carbenicilina y se cultivaron

hasta una $DO_{600} = 0.4$. Posteriormente, se añadió IPTG al cultivo hasta una concentración final de 1 mM y el crecimiento continuó durante 4 horas de modo que a medida que se producían SADA a partir de los parentales, expresaban la construcción de ARNdc del plásmido.

C. Cuantificación de la carga de ARNdc en SADA

Para cuantificar los niveles de ARNdc en SADA, los presentes inventores analizaron el contenido de ácido nucleico mediante electroforesis en gel. Se lisaron SADA a una concentración de aproximadamente 3.3×10^{10} partículas/ml en PBS, según se determinó mediante el análisis del analizador de nanopartículas Spectradyme® nCS1™ como se describe en el Ejemplo 3, mediante tratamiento térmico a 80 °C durante 20 minutos. Este tratamiento condujo a la liberación de los ácidos nucleicos y a una fácil visualización mediante electroforesis en gel de agarosa. Se procesaron 20 µl de lisado de SADA tratado térmicamente junto con una curva estándar creada mediante una serie de diluciones de un ARNdc transcrito *in vitro* a 125 ng/µl en un E-Gel™ EX de agarosa al 2 % (Thermo Fisher) siguiendo los ajustes recomendados por el fabricante. Se obtuvieron imágenes del gel utilizando un generador de imágenes Invitrogen™ iBright™ (Thermo Fisher) en la configuración de gel de ácido nucleico. Las intensidades de banda se cuantificaron con ImageJ. Se calculó que la cantidad de ARNdc cargado era 97 ng por 10^9 de SADA. Este ejemplo demuestra que el SADA se puede cargar eficazmente con carga de ARN.

Ejemplo 9: Administración de SADA de *E. coli* a *Lepidoptera*

Este ejemplo describe el marcaje fluorescente y la visualización de SADA dentro de un insecto lepidóptero, específicamente el barrenador europeo del maíz, después de la adición de SADA a una dieta artificial.

A. Marcaje fluorescente de SADA para visualización

Para visualizar los SADA en el barrenador europeo del maíz, los presentes inventores marcaron el SADA con fluorescencia con un tinte fluorescente de éster de NHS. Se prepararon y purificaron SADA de MACH301 mediante el proceso descrito en el Ejemplo 8. Se añadieron 30 µl de borato de sodio 0.5 M a 1 ml de SADA a una concentración de 1×10^{11} según se midió mediante el análisis del analizador de nanopartículas Spectradyne® nCS1™. El éster de NHS DyLight™ 800 (ThermoFisher), que reaccionó con moléculas que contienen aminos en la superficie de la membrana externa del SADA (por ejemplo, aminos primarias de proteínas), se disolvió en dimetilformamida anhidra a una concentración de 10 mg/ml. Se añadieron 20 µl de solución madre de éster de NHS DyLight™ 800 al SADA en un tubo de 1.5 ml y se agitó brevemente en vórtice. La siguiente mezcla de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un balancín durante una hora a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de tinte, se sedimentaron los SADA a 20,000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Este lavado se repitió 3 veces y los SADA se resuspendieron en un volumen final de 1 ml de PBS.

B. Alimentación con SADA marcado al barrenador europeo del maíz (ECB)

Los huevos del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) se obtuvieron de Benzon Research Inc. y se criaron con una dieta artificial (dieta noctuida general) comprada a Benzon Research Inc. La dieta se preparó de la siguiente manera: se añadieron 162 g del polvo de dieta noctuida general al agua hirviendo; el contenido se mezcló minuciosamente durante 15 minutos mientras se mantenía la temperatura entre 80 °C y 90 °C; la mezcla se enfrió a 70 °C y se añadieron 5 ml de aceite de linaza y se mezclaron a

fondo; y la comida se distribuyó en recipientes de cría y se dejó enfriar y solidificar.

Los huevos de ECB se colocaron en la dieta y se dejaron eclosionar y alimentarse. Todos los contenedores de cría se mantuvieron a 25 °C, ciclo de luz:oscuridad de 16 horas:8 horas y 50-60 % de humedad. Una vez que las larvas alcanzaron el 2º estadio, se utilizaron para el ensayo de alimentación. Para preparar la instalación para la alimentación, se prepararon y vertieron 25 ml de la dieta general noctuida (en caliente, 70 °C) en la tapa de un recipiente de 0.4 litros (caja Sistema 1543 Klip It), e inmediatamente se colocó una placa de PCR de 48 pocillos, con los fondos cortados (retirados aproximadamente 2 mm del fondo) en el alimento mientras se solidificaba: esto creó pocillos individuales con la cantidad correcta de dieta para este ensayo de alimentación para larvas de 2º estadio. Para administrar el SADA marcado con éster de NHS DyLight™ 800 o PBS como control, se añadieron 2 µl del SADA o PBS marcado a 5 pocillos por separado y se dejó secar. A continuación, se añadieron larvas individuales de 2º estadio a cada pocillo y se dejaron alimentar durante 1 hora.

C. Visualización de SADA fluorescentes en el barrenador europeo del maíz

Para visualizar SADA en larvas de ECB, las larvas alimentadas con PBS o SADA marcados con éster de NHS DyLight™ 800 se retiraron del pocillo, se colocaron en una cinta adhesiva para inmovilizarlas y luego se colocaron en la superficie de obtención de imagen. Se utilizaron tanto los canales de 700 nm como los de 800 nm para escanear las larvas. Las larvas autofluorescen en el canal de 700 nm; por lo tanto, este canal se utilizó para localizar las larvas en el dispositivo de obtención de imágenes. El canal de 800 nm se utilizó para detectar el SADA marcado en las larvas.

La Fig. 6 muestra los resultados del experimento de alimentación, con muy poca señal en el canal de 800 nm en las larvas alimentadas con PBS, y una fuerte señal fluorescente presente en las larvas alimentadas con éster de NHS DyLight™ 800 marcado con SADA MACH301. Por lo tanto, los SADA son consumidos y presentes en el barrenador europeo del maíz cuando se agregan a la dieta.

Ejemplo 10: Almacenamiento de SADA

En este ejemplo, los presentes inventores demostraron métodos para formular y almacenar SADA utilizando *E. coli* como modelo de bacteria productora de SADA. Se sintetizaron y purificaron SADA de *E. coli* con plásmidos de GFP inducibles de acuerdo con los métodos proporcionados en los Ejemplos 1-3. Luego se almacenaron en diversas condiciones para evaluar su capacidad para reconstituirse y sobrevivir.

A. Almacenamiento longitudinal de SADA en condiciones frías

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de los SADA para expresar GFP de una manera inducible después del almacenamiento a 4 °C durante 0 y 3 días. Los SADA provenían de tres cepas que contienen el plásmido pGFP (Tabla 3) que dirige la expresión de GFP bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina: MACH124 (BW25113 Δ_{minCDE}), MACH556 (BW25113 Δ_{minC}), y MACH557 (BW25113 Δ_{minD}): véase la Tabla 2 para la información del genotipo. Los SADA se purificaron como se indica en el Ejemplo 2, usando excrecencia selectiva de un sobrenadante de cultivo concentrado. Para la preparación de MACH124 purificada, se determinó que la concentración de SADA era de 2.4×10^9 SADA/ml inmediatamente después de la purificación y 2.18×10^9 SADA/ml después de 3 días de almacenamiento. Para la preparación de MACH556 purificada, se determinó que la concentración de SADA era de 1.86×10^9 SADA/ml inmediatamente

después de la purificación y 2.2×10^9 SADA/ml después de 3 días de almacenamiento. Para la preparación de MACH557 purificada, se determinó que la concentración de SADA era de 1.98×10^9 SADA/ml inmediatamente después de la purificación y 2.08×10^9 SADA/ml después de 3 días de almacenamiento. Todas las mediciones de concentración de SADA se tomaron usando el analizador de nanopartículas Spectradyne® nCS1™ (descrito en el Ejemplo 3). Las preparaciones de SADA purificadas se sometieron a los procedimientos de caracterización de nanopartículas y de sembrado en placa de células viables descritos en el Ejemplo 3. Para cada preparación, se determinó que la carga de células viables estaba en o por debajo del límite de detección (100 UFC/ml) mediante sembrado en placa de UFC, como se describe en el Ejemplo 3. La capacidad de SADA almacenados para expresar GFP de una manera dependiente del inductor se evaluó como se describe en el Ejemplo 4C. En el día 0 (sin días de almacenamiento), se observó una señal de GFP dependiente del inductor que aumentó durante 12 horas en las tres cepas. Después de 3 días de almacenamiento, los presentes inventores observaron un aumento dependiente del inductor en la transcripción y traducción de GFP en los SADA MACH124 y MACH557 que persistió durante 12 horas (Fig. 7A-7F). MACH556 mostró un aumento dependiente del inductor en la señal de GFP hasta ~ 6 horas, y luego la señal volvió a disminuir a niveles no inducidos a las 12 horas. En ausencia del inductor (no inducido), no hubo aumento en la señal de GFP para ninguna cepa probada. Los datos de las Fig. 7A-7F se normalizan como se describe en el Ejemplo 4C.

B. Liofilización y reconstitución de SADA

Para examinar la capacidad de SADA para realizar trabajo después de la liofilización, se midieron los niveles de ATP en SADA rehidratado 1, 2 o 6 semanas después de la

liofilización. Además, también se evaluó la capacidad del SADA liofilizado para transcribir y traducir el gen diana de GFP después de la rehidratación. Los SADA de MACH124 se purificaron tal como se indica en el Ejemplo 2. Para liofilizar los SADA, se sedimentaron SADA purificados a 21,000 xg durante 20 minutos y se resuspendieron en tampón de liofilización microbiana (OPS Diagnostics). Los SADA se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 18 horas en el ajuste automático de un Liofilizador Labconco™ FreeZone ajustado a un vacío de 0.3 mbar. Los SADA liofilizados se almacenaron en la oscuridad en una bolsa Ziploc a temperatura ambiente hasta la rehidratación. Para determinar los niveles de ATP de los SADA después de la liofilización, los SADA se rehidrataron 1, 2 y 6 semanas después de la liofilización, y los niveles de ATP se midieron utilizando el kit de ensayo de viabilidad celular microbiana BacTiter-Glo™ (Promega), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El ensayo mostró que los SADA liofilizados y rehidratados conservan el ATP en niveles similares después de 1, 2 o 6 semanas de almacenamiento, con niveles de ATP a las 2 y 6 semanas aumentando ligeramente (en 1.49 y 1.48 veces, respectivamente) sobre los niveles de ATP medidos en 1 semana. Estos datos demuestran que los niveles de ATP se mantienen mediante los procesos de liofilización, almacenamiento o rehidratación.

Además, se probó la capacidad de SADA rehidratado para transcribir y traducir GFP de una manera dependiente del inductor usando el protocolo descrito en el Ejemplo 4C. Las Fig. 7G y 7H muestran un aumento dependiente del inductor en la señal de GFP en SADA de MACH124 rehidratado que persistió durante 15 horas. En ausencia del inductor (no inducido) no hubo aumento en la señal de GFP. Los datos de las Fig. 7G y 7H se normalizan como se describe en el Ejemplo 4C.

La actividad observada en SADA rehidratado indica que la integridad de los SADA se mantiene mediante el proceso de liofilización.

Ejemplo 11. Métodos complementarios para la caracterización de SADA

Este ejemplo describe diversos métodos analíticos suplementarios que se utilizan para caracterizar la composición de SADA y la célula parental.

A. Microscopía electrónica

Los SADA se purifican a partir de bacterias parentales, restos celulares y endotoxinas como se describe en el Ejemplo 12. Para las estructuras periplásmicas visuales, incluidos los flagelos y los sistemas de secreción, los SADA se someten a descargas osmóticas de manera similar a los métodos anteriores (H C Neu y L A Heppel. 240:3685-3692, 1965) después de la separación. Las estructuras periplásmicas separadas se visualizan luego en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL, Tokio) siguiendo el protocolo de Wu et al., Analyst, 2015.

B. Microscopía de fluorescencia y de luz

El SADA y las bacterias parentales se visualizan utilizando un microscopio vertical de equipo de fluorescencia (Leica, Zeiss, cámara CCD y fuente de luz de amplio espectro). Se obtienen imágenes de las muestras en vivo dentro de pocillos múltiples de cultivo de tejidos de formato de 6, 12, 24 o 96 pocillos (Thermo Fisher), insertos transpocillo (Corning) o placas de Petri de poliestireno recubiertas de agar (Thermo Fisher). Además, las muestras se pueden fijar en estos recipientes o en cubreobjetos de vidrio para su posterior análisis.

C. Medición de la concentración a D0600

Para cuantificar el número de SADA o bacterias parentales presentes en un volumen dado de medio, la densidad óptica se mide a D0600 y se emplea la siguiente ecuación:

$$\text{Número de SADA/ml} = D0600 \times A \times B$$

5 en donde A es el tamaño relativo de SADA en comparación con las células parentales y B es el factor de la curva de calibración relacionado con la D0600 de SADA frente a su contenido de LPS. Esto se deriva de la medición estándar DA600 para células bacterianas.

10 *D. Análisis de seguimiento de nanopartículas de SADA y bacterias parentales*

El análisis de seguimiento de nanopartículas se usa típicamente para medir la pureza de las vesículas y se modifica para medir la pureza de SADA. Brevemente, el
15 seguimiento de nanopartículas se realiza utilizando el sistema NanoSight LM10 (NanoSight Ltd, Amesbury, Reino Unido) configurado con un láser y una cámara digital de alta sensibilidad. Los videos se recopilan y analizan utilizando un programa informático estándar, utilizando el tamaño de
20 partícula esperado como entrada. Cada muestra se diluye a una concentración conocida en el intervalo de 10^8 partículas/ml (usando cuantificación espectrofotométrica) y se administra y registra bajo flujo controlado usando el sistema de bomba en NanoSight. La cámara funciona a la máxima
25 resolución y velocidad de fotogramas. Se cuantifica el número de partículas en el intervalo de tamaño correcto, junto con un porcentaje del total de partículas (por ejemplo, células parentales) fuera del intervalo de tamaño.

E. Dispersión dinámica de la luz y potencial zeta

30 Las distribuciones de tamaño de población de bacterias parentales y SADA se miden usando dispersión de luz dinámica (DLS) (Zetasizer Nano S de Malvern Instruments Ltd.). Al exponer las suspensiones de SADA a la luz, el radio

hidrodinámico se mide relacionando la intensidad de la luz dispersa con el coeficiente de difusión del objeto en solución utilizando protocolos publicados (Jorge Stetefeld, Biophys Rev (2016) 8:409–427). Estos estudios se han realizado previamente con nanopartículas, bacterias, proteínas y ácidos nucleicos de manera similar. Las cubetas desechables se utilizan normalmente para mediciones de tamaño de SADA para mantener la esterilidad y evitar la contaminación cruzada de muestras. Para algunas aplicaciones que requieren disolventes orgánicos, se utilizan cubetas de vidrio reutilizables con protocolos de limpieza cuidadosos que incluyen limpiezas secuenciales de detergente (Alconox), ácido acético al 5 %, agua desionizada y etanol al 70 %, seguidas de un proceso de secado completo.

F. Tinción con inmunofluorescencia:

Los SADA se aíslan de las bacterias parentales usando los métodos descritos en el Ejemplo 12. Los SADA se diluyen y se centrifugan a 500 g sobre cubreobjetos de vidrio limpios y se fijan en paraformaldehído al 4 % en solución de PBS durante 20 minutos. Las muestras se lavan, se incuban en una solución de tinción de anticuerpos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se montan en un portaobjetos con un colorante antidesvanecimiento siguiendo las instrucciones del fabricante, se secan y se obtienen imágenes bajo un microscopio confocal. ImageJ se utiliza para procesar las imágenes.

G. Citometría de flujo:

Las bacterias parentales y los SADA se analizan usando citometría de flujo en un NanoFCM (NanoFCM, China) siguiendo las instrucciones del fabricante. Usando SADA de fluorescencia, el NanoFCM se usa en modo de uno o dos colores (exposición a longitudes de onda de 488 nm y 555 nm) para confirmar varias propiedades del SADA, incluida la captación

de plásmidos, la expresión de proteínas y la pureza. Por ejemplo, un tinte lipofílico fluorescente, como DiOC6 (ICN Biomedical), se incorpora a las membranas de SADA, como describe el fabricante. Los SADA se clasifican y purifican como se explica en el Ejemplo 12 y luego se lavan en solución salina tamponada con fosfato fría (pH = 7), se resedimentan (40,000 g, 5 min, 4 °C) y se diluyen a (1E5, 1E6, 1E7) SADA/ml y la intensidad de la fluorescencia de DiOC6 se mide a 488 nm de excitación y 535 de emisión.

H. PCR

Los SADA purificados se lisan y el ADN se purifica usando un kit de purificación QIAquick PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). Los cebadores de oligonucleótidos con sentido 23S (59 GAA AGG CGC GCG ATA CAG 39) y antisentido 23S (59 GTC CCG CCC TAC TCA TCG A 39) se utilizan para amplificar un fragmento de 70 pb del gen de ARN ribosómico 23S, presente en siete copias en el genoma de *E. coli* como describen Vilalta et al., Anal Biochem, 2001. Las reacciones de amplificación se llevan a cabo utilizando reactivos TaqMan (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

I. Secuenciación de ARN

El análisis del transcriptoma completo se realiza utilizando la secuenciación del ARN tal como describen Giannoukos et al., Genome Biol, 2012. Brevemente, los SADA se purifican hasta una D0600 de ~ 0.5 en caldo LB y se recolectan mediante centrifugación a 4,000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sedimentos se resuspenden en 25 ml de RNeasy lysis buffer (Qiagen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los tubos se agitan en un rotador a 4 °C durante la noche, se centrifugan a 4,000 xg durante 10 minutos, se colocan en un baño de etanol/hielo seco para congelar rápidamente el sedimento y se almacenan a -80 °C.

La extracción de ARN se realiza utilizando el kit Ion Total RNA-seq v2 (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones enzimáticas que utilizan el kit de aislamiento de ARNm procariótico mRNA-ONLY (Epicenter) se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El sistema Ovation Prokaryotic RNA-Seq (NuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA, EE.UU.) se usa de la siguiente manera. El ARN intacto se trata con desoxirribonucleasa como se describió anteriormente y se sintetiza en ADNc de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los productos purificados se seleccionan por tamaño en un gel (aproximadamente de 300 a 450 pb). Las muestras se enriquecen con los cebadores Illumina PE1.0 y PE2.0 (1 μ M cada uno), 1 $\times$ tampón I de PCR AccuPrime (10 $\times$), 0.5 U de polimerasa AccuPrime Taq de alta fidelidad (5 U/ μ l; Invitrogen) en un volumen final de 25 μ l. Las reacciones enriquecidas se purifican usando perlas Agencourt AMPure XP (0.8 $\times$ el volumen de reacción). Las bibliotecas se secuencian en instrumentos Illumina GAII o Hi-Seq. Las lecturas sin procesar de los datos de secuenciación de ARN se procesan utilizando Picard en fase de desarrollo. Brevemente, las lecturas se alinean y se asignan a los genomas de referencia utilizando el programa HISAT2. Los datos de secuencia para *E. coli* se alinean con las respectivas secuencias del genoma. Las lecturas alineadas con HISAT2 se analizan y asignan a genes individuales de acuerdo con las anotaciones del genoma proporcionadas por GenBank.

J. Secuenciación de ADN

El ADN residual de las líneas parentales se mide con el kit de ADN de *E. coli* cuantitativo resDNASEQ (ThermoFisher Scientific) con plataformas de automatización de 96 pocillos profundos KingFisher Flex Express para automatizar la

extracción de ADN residual de la línea de células hospedadoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparan dos placas de lavado y una de elución y se cargan las muestras. Luego, las muestras se lisan y procesan en KingFisher Flex utilizando la secuencia de órdenes PrepSEQ_resDNA_v1. Las curvas estándar se generan usando líneas parentales de *E. coli*, y las muestras se amplifican usando una mezcla maestra y los resultados se leen y analizan usando el programa informático SDS.

K. Geles

El ADN de las líneas parentales de SADA y *E. coli* se extrae usando protocolos estándar y se carga en geles de agarosa para el análisis de tamaño siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico es ~ 4.5 Mb, mientras que el ADN del plásmido es ~ 3-5 kb.

I. ELISA

El kit de ensayo de *E. coli* FluoroSELECT E (Sigma-Aldrich) se utiliza para la detección ELISA de células parentales. El sistema de detección utiliza un sustrato fluorogénico que, cuando es hidrolizado por una enzima específica (durante la hidrólisis del péptido), produce una señal fluorescente. Brevemente, las muestras se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leen con un fluorímetro. Después de la calibración, si se mide $P1 > 30,000$, la muestra es positiva para las células de la línea parental. Si $P1 < 30,000$, medir $P2$. Si el valor numérico ($P2 - P1$) $< (3 \% \times P1)$, la muestra es negativa.

Ejemplo 12. Métodos complementarios para la producción de SADA de *E. coli*

Este ejemplo describe métodos complementarios para la producción y caracterización de SADA de *Escherichia coli*.

*A. Producción de SADA de *E. coli**

Para crear SADA, *E. coli* se transfecta con un plásmido que sobreexpresa la proteína *ftsZ* bajo el promotor T7. Como alternativa, los mutantes de *E. coli* se crean con genes MIN alterados por transfección de *E. Coli* con plásmidos de integración. Los plásmidos son sintetizados comercialmente por Thermo Fisher. La transfección se lleva a cabo utilizando procesos estándar de transfección de bacterias (Thermo Fisher Molecular Biology Handbook). En resumen, las células competentes se cultivan en placas de agar a temperatura ambiente. Se añaden 0.5-2 ng/ml de ADN a las células competentes dentro de un vial y se incuban durante 20-30 minutos. Luego, cada tubo se somete a un choque térmico colocando el tubo en un baño de agua a 42 °C durante 30-60 segundos para crear poros transitorios en la superficie celular. A continuación, las células se cultivan en placas en geles de agar que se han cargado previamente con antibiótico selectivo y se cultivan durante la noche para que solo sobrevivan las bacterias que se han transfectado con el plásmido. Se recoge una sola colonia y se cultiva a 37 °C con agitación continua a 120 rpm en medio LB que contiene 50-100 µg/ml de ampicilina. Con el tiempo, las colonias seleccionadas proliferan y producen SADA de forma continua.

Ejemplo 13. Métodos complementarios para la purificación de SADA que provienen de *E. coli* y medición de la eficacia

Este ejemplo describe métodos complementarios para purificar SADA de *Escherichia coli* a partir de una preparación cruda, así como métodos para caracterizar la cantidad de bacterias vivas contaminantes.

A. Purificación de SADA de E. coli

Para separar SADA de las bacterias parentales para una producción de alta pureza, se usa una combinación de lavado, centrifugación, filtración estéril y tratamiento con

antibióticos. Utilizando protocolos adoptados de métodos previamente publicados (Reeve, J 1979, Jivrajani 2013, Rampley et al 2017) con varias modificaciones. Brevemente, para purificar la solución, se recolecta una mezcla de bacterias parentales y la solución de SADA y se centrifuga a 4 °C (Beckman Coulter) a velocidades crecientes en incrementos de 1000 g que van de 1000 g a 4000 g durante 10 minutos en cada etapa en donde una fracción creciente de las células parentales se eliminan de la suspensión. Para asegurar aún más que se han eliminado las bacterias parentales, se añaden 100 µg/ml de antibiótico potente (ceftriaxona) y la muestra se incuba con la solución de sobrenadante final a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la solución se centrifuga a 400 g a 4 °C para sedimentar cualquier residuo celular, se recoge el sobrenadante rico en SADA y luego se centrifuga a 4000 g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, la solución se filtra de forma estéril usando un filtro de membrana de .2 µm y luego se resuspenden los SADA en PBS estéril con Ca²⁺ y Mg²⁺ a la concentración deseada.

B. Medición de la eficacia de purificación de SADA

En cada etapa de la producción de SADA, el sobrenadante o sedimento se recolecta y se coloca en placas de agar y se incuban a 37 °C para confirmar visualmente que las células parentales se eliminan de la solución. Paralelamente, utilizando un hemocitómetro, se cuenta el número de SADA y bacterias parentales utilizando microscopía de luz. Además, para garantizar que los SADA no contengan ADN residual, se realiza un ensayo basado en fluorescencia con el reactivo NucBlue Live ReadyProbes Reagent (Invitrogen, R37605), que se volverá fluorescente al UV si los SADA son positivos para el ADN residual. El reactivo se añade según las instrucciones del fabricante (2 gotas por ml de muestra), se incuba durante 15-30 minutos y se lava con una solución de PBS antes de la

obtención de imágenes para eliminar el exceso de reactivo. Tras la exposición a la luz de longitud de onda de 405 nm, el tinte se excitará en el espectro azul si se ha acoplado a cualquier resto de ADN. Como contratincción, los tintes rojo-fluorescentes FM 4-64 (Invitrogen) se utilizan como un tinte intercalado a base de membrana lipofílica que tiñe la lámina externa del SADA y las bacterias parentales. Los espectros de excitación y emisión están separados de las tinciones nucleares para garantizar que se pueda recopilar una señal única. La pureza de la muestra se calcula como un porcentaje de SADA en la población restante = $100 \times (\text{n.º de rojo} - \text{n.º de azul}) / (\text{n.º de rojo})$. Además, utilizando el método de dispersión dinámica de luz (DLS) (Zeta Sizer Malvern), la pureza se evalúa comparando la magnitud de los picos asociados con $\sim 1 \mu\text{m}$ (células parentales) y $\sim 500 \text{ nm}$ (SADA) y mostrando que el pico de la célula parental se acerca a cero en muestras de pureza creciente.

Como alternativa, el ADN del SADA residual se determina usando el kit de ensayo de ADN Quant-iT™ PicoGreen™ (Invitrogen, N.º de Cat P11496) usando protocolos establecidos por el proveedor. Los SADA se recogen en PBS y se lisan usando tampón de lisis. Se mezclan los reactivos PicoGreen y se observa la reacción en las muestras mediante mediciones de fluorescencia.

Como alternativa, los SADA se concentran y se esparcen a 2.5×10^{11} SADA/ml en un medio de cultivo adecuado, y se siembran 4 ml en una placa de 60 mm con agar de crecimiento adecuado y se cultivan en condiciones adecuadas. Las colonias se cuentan después de 2 días para determinar el número de bacterias vivas por 10^{12} SADA.

Como alternativa, se emplean el seguimiento de nanopartículas, Zetasizer y otros métodos de seguimiento de distribución de tamaño para determinar la distribución de

tamaño y verificar la presencia de un pico de partículas grandes que indiquen bacterias vivas siguiendo los protocolos del Ejemplo 11. Como alternativa, las muestras se prueban en un qNano Gold (Izon Science Ltd.), que utiliza un sensor de pulso resistivo sintonizable para medir el tamaño, la concentración y la carga de las partículas a medida que atraviesan un nanoporo.

Ejemplo 14. Preparación de SADA grande de *E. coli*

Los SADA del Ejemplo 12 se preparan mediante la alteración de los genes de tabicación que conducen a la división celular asimétrica y la producción de SADA a partir de una cepa de células bacterianas parentales. Este ejemplo demuestra la producción de SADA usando exonucleasas que degradan selectivamente el genoma de las bacterias parentales directamente, lo que ofrece varias ventajas sobre la preparación de SADA descrita en el Ejemplo 12, por ejemplo mejor control de la composición citoplasmática, aumento de la carga del número de copias y aumento de ATP.

*A. Producción de SADA grandes de *E. coli**

Se construyen dos plásmidos, (1) que contiene un promotor de arabinosa para sobreexpresar los genes sbcB o sbcCD, que codifican exonucleasas que degradan los ADN en muchas conformaciones y permiten que RecBCD expresado de forma natural digiera el genoma, y (2) un plásmido que contiene un casete que inactiva el gen recA bajo el control de un promotor lac inducido por IPTG. Los plásmidos se sintetizan comercialmente y (1), (2) o ambos se transfectan en células de *E. coli* siguiendo protocolos estándar como el del Ejemplo 12.

*B. Purificación de SADA grande de *E. coli**

Después de que el cultivo bacteriano alcanza una D.O. 600, el gen Exo1 se activa utilizando medios libres de arabinosa y glucosa al 0.1 % o IPTG o ambos. Después de

15 minutos, 1 hora, 2 horas y 6 horas, las células se recogen y se centrifugan a 4 °C durante 5 minutos y se resuspenden en PBS. Como se describe en el Ejemplo 15, los SADA auxótrofos se usan para aumentar la pureza de la solución que se determina usando las medidas en los Ejemplos 2 o 12.

Ejemplo 15. Métodos complementarios para producir cepas bacterianas auxótrofas productoras de SADA para aumentar la pureza

Este ejemplo describe la síntesis de SADA a partir de cepas parentales que son auxótrofas como un mecanismo para reducir el número de bacterias viables que contaminan las preparaciones de SADA.

A. Preparación de bacterias parentales auxótrofas de E. coli

Los SADA con un número reducido de contaminantes de bacterias parentales se crean utilizando cepas auxótrofas de *E. coli*, como la cepa de inactivación de la síntesis de arginina (argA) JW2786-1. Los SADA de *E. coli* se producen de acuerdo con los métodos del Ejemplo 12 pero con arginina añadida al medio. Los SADA se purifican usando los métodos del Ejemplo 13 y luego se almacenan en un medio sin arginina.

B. Preparación de SADA grandes de E. coli a partir de cepas auxótrofas

Los SADA grandes a partir de cepas parentales auxótrofas se crean utilizando una cepa auxótrofa de *E. coli*, como la cepa de inactivación de la síntesis de arginina (argA) JW2786-1. Se producen SADA grandes de *E. coli* de acuerdo con los métodos del Ejemplo 14 pero se cultivan en medio que contiene arginina. A continuación, los SADA se purifican utilizando los métodos del Ejemplo 14.

C. Demostración de una mayor pureza de SADA auxótrofos grandes y regulares

Los SADA grandes y regulares se preparan utilizando los métodos anteriores. También se preparan SADA de cepas parentales no auxótrofas y SADA grandes y no auxótrofas usando los métodos del Ejemplo 12, Ejemplo 13 y Ejemplo 14. La pureza de los SADA se mide usando los métodos del Ejemplo 15.

Ejemplo 16. Métodos complementarios para medir la actividad del SADA

Este ejemplo describe métodos complementarios para medir la actividad de SADA.

A. Medición de ATP

Una muestra de SADA se divide en dos. El ATP de la mitad de la muestra se mide mediante el ensayo BacTiter Glo (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El tamaño y la concentración de la otra mitad se miden mediante seguimiento de nanopartículas o NanoFCM, utilizando los protocolos del Ejemplo 11. El área de superficie total de la membrana del SADA se calcula usando las fórmulas apropiadas, y la cantidad de ATP del ensayo BacTiter Glo se divide entre el área para producir el ATP por unidad de área de superficie del SADA.

B. Medición de la caída de ATP

Los SADA se incuban a 37 °C para aquellos que son relevantes para mamíferos y a 30 °C para aquellos que no lo son, y la relación de concentración de ATP entre las mediciones tomadas en el momento de la preparación y después de 24 horas se mide utilizando los métodos de la parte a).

C. Medición del índice de vida útil

Los SADA se sintetizan con un plásmido funcional de GFP con promotores apropiados para la especie. La concentración de GFP se mide en relación con el número de SADA, el número medio de plásmidos por SADA y el volumen de la solución con un lector de placas a los 30 minutos y 24 horas. El índice

de vida útil se calcula como la proporción entre la tasa de producción de GFP entre 24 horas y 30 minutos.

D. Medición del consumo de ATP

Para evaluar la actividad de las bacterias parentales y el SADA, se mide la tasa de producción de ATP. La tasa de producción de ATP se mide utilizando un Seahorse XF (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como alternativa, una muestra de SADA se divide por la mitad. La mitad de la muestra se trata con un inhibidor de la síntesis de ATP, como diciclohexilcarbodiimida. A continuación, se analizan ambas mitades con BacTiter-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La diferencia en las dos muestras se considera la tasa de generación de ATP.

Ejemplo 17. Métodos complementarios para almacenar SADA que proviene de *E. coli*

Este ejemplo describe métodos complementarios para almacenar y formular SADA utilizando *E. coli* como modelo de SADA. Los SADA de *E. coli* con plásmidos pBAD GFP se sintetizan de acuerdo con los métodos del Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo 13. Luego se almacenan en diversas condiciones para demostrar su capacidad para reconstituirse y sobrevivir.

*A. Almacenamiento longitudinal de SADA de *E. coli**

Los SADA se almacenan a 4 °C en tampón isotónico para mantener la integridad estructural y la actividad química. Inmediatamente antes de su uso, los SADA se recalientan a 37 °C.

B. Almacenamiento longitudinal de SADA en frío

Los SADA se almacenan a 4 °C en tampón isotónico durante 0, 30, 60, 90 o 180 días.

C. Liofilización y reconstitución de SADA

Los SADA se centrifugan y se resuspenden en las siguientes soluciones: 20 % en p/vol de leche desnatada en medio de crecimiento, 20 % en p/vol de leche desnatada en agua, 12 % en p/vol de sacarosa en una mezcla al 50:50 de agua y medio de crecimiento, Reactivo 18: Caldo de tripticasa de soja, 1.5 g; Sacarosa, 10 g; Fracción V de albúmina de suero bovino, 5 g; Agua destilada, 100 ml y Reactivo 20: Sacarosa, 20 g; Fracción V de albúmina de suero bovino, 10 g; Agua destilada, 100 ml. Todas las soluciones se esterilizan por filtración a través de un filtro de 0.2 µm. A continuación, los SADA se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizan. El polvo se almacena durante 0, 30, 60, 90, 180 días a 0 °C, -20 °C y 25 °C. Al final del período de prueba, el polvo se reconstituye con agua o caldo LB.

La actividad de los SADA después de la reconstitución se evalúa usando los métodos para evaluar en el Ejemplo 16.

D. Congelación y reconstitución de los SADA

Los SADA se centrifugan y se resuspenden en glicerol y medio de crecimiento al 10 %, 20 % y 30 % de vol/vol. Los SADA se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido o se congelan lentamente en un Nalgene Mr. Frosty. Los SADA se almacenan a -20 °C y -80 °C durante 0, 30, 60, 90, 180 días. Al final del período de prueba, el polvo se reconstituye con agua o caldo LB.

La actividad de los SADA después del almacenamiento se evalúa usando los métodos para evaluar en el Ejemplo 16.

E. Secado por pulverización y reconstitución de los SADA

Los SADA se centrifugan y se resuspenden en leche desnatada al 20 % en p/vol en medio de crecimiento, leche desnatada al 20 % en p/vol en agua o sacarosa al 12 % en p/vol en una mezcla al 50:50 de agua y medio de crecimiento. A continuación, los SADA se secan por pulverización en una

unidad a escala de laboratorio y se recogen. El polvo se almacena durante 0, 30, 60, 90, 180 días a 0 °C, -20 °C y 25 °C. Al final del período de prueba, el polvo se reconstituye con agua o caldo LB.

5 La actividad de los SADA después del secado por pulverización se evalúa usando los métodos para evaluar en el Ejemplo 16.

Ejemplo 18. Evaluación de la similitud de SADA grandes con bacterias parentales

10 Este ejemplo describe grandes SADA que son más similares a las bacterias parentales que los SADA regulares.

A. Comparación de grandes SADA de E. coli con otros SADA

15 Los SADA de E. coli se sintetizan de acuerdo con los métodos del Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo 13. Las muestras de SADA, SADA grandes y bacterias parentales se siembran en placas de pocillos y los ensayos se realizan dentro de los 30 minutos de la siembra inicial. La composición citoplasmática se caracteriza usando secuenciación de ARN (descrita en el Ejemplo 14) para caracterizar los diferentes transcritos de
20 ARN presentes en las diferentes muestras. El número de copias de las diferentes muestras se evalúa utilizando qPCR para cuantificar la señal de plásmidos individuales a los de un estándar de plásmido de número de copias conocido utilizando un método basado en protocolos existentes (Anindyajati et al. "Plasmid Copy Number Determination by Quantitative Polymerase Chain Reaction" Scientia pharmaceutica vol. 84,1
25 89-101. 14 de febrero de 2016). Además, la longevidad de las tres condiciones se compara usando el ensayo de actividad de ATP descrito en el Ejemplo 11.

30 Todas las muestras de SADA, SADA grandes y bacterias parentales se preparan y purifican usando métodos descritos previamente en el Ejemplo 12-15. El análisis de transcriptoma completo se realiza usando la secuenciación del ARN tal como

se describe en el Ejemplo 12 y se observan las diferencias en las magnitudes de transcripción.

Ejemplo 19. Métodos complementarios para demostrar una mayor pureza de SADA auxótrofos

5 Este ejemplo describe SADA elaborado a partir de parentales auxótrofos que son más puros después del aislamiento que los elaborados a partir de parentales no auxótrofos.

10 *A. Preparación de bacterias parentales auxótrofas de E. coli*

Los SADA con una disminución de los contaminantes bacterianos parentales se crean utilizando cepas auxótrofas de *E. coli*, como la cepa de inactivación de la síntesis de arginina (*argA*) JW2786-1. Los SADA de *E. coli* se producen de acuerdo con los métodos del Ejemplo 12 pero con arginina añadida al medio. Los SADA se purifican usando los métodos del Ejemplo 13 y luego se almacenan en un medio sin arginina.

B. Preparación de SADA grandes auxótrofos de E. coli

20 Para crear SADA auxótrofos grandes, se usa una cepa auxótrofa de *E. coli*, tal como la cepa de *E. coli* de inactivación de síntesis de arginina (*argA*) JW2786-1. Los SADA grandes se producen de acuerdo con los métodos del Ejemplo 14, con la modificación del plásmido *sbcB* aumentada con la expresión de la proteína *argA*, permitiendo que solo el SADA con *sbcB* sobreviva en el medio. Los SADA se purifican usando los métodos del Ejemplo 14.

C. Demostración de una mayor pureza de SADA auxótrofos grandes y regulares

30 Los SADA auxótrofos grandes y regulares se preparan utilizando los métodos anteriores. También se preparan SADA no auxótrofos y SADA grandes usando los métodos del Ejemplo 12, Ejemplo 13 y Ejemplo 14. La pureza de los SADA se mide usando los métodos del Ejemplo 13.

Ejemplo 20. Métodos complementarios para determinar si los SADA con ATP sintasa expresada son altamente activos

La expresión y el ensamblaje de la ATP sintasa son un proceso estrictamente regulado en todos los organismos. E. coli resiste a la transcripción con plásmidos que contienen ATP sintasa ya que la sobreexpresión puede ser letal para la célula. Este ejemplo describe dos estrategias para sintetizar SADA con sobreexpresión de ATP sintasa.

A. Generación de SADA de E. coli con sobreexpresión de atpI

Las líneas de E. coli K12 se cultivan en condiciones normales de cultivo, el ARN total se purifica usando reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se trata con 2 U de desoxirribonucleasa sin ribonucleasa durante 1 hora. La RT-PCR se realiza en atpI, que es un gen involucrado en la generación de energía por la ATP sintasa, utilizando los siguientes cebadores: 5'-TCAGGCAGTCAGGCGGCTT-3 ', atpI-F; 5'-TTACCCTTTGTTGTTAATTACAGC-3 ', atpI-R como describen Chen et al., Adv Mat Res, 2014. Las condiciones de la PCR incluyen una desnaturalización inicial durante 5 min a 96 °C, seguida de 15 ciclos durante 1 min a 96 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C con una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de la PCR se redisuelven en un gel de agarosa al 1.2 %. La intensidad de las bandas esperadas se analiza y compara con el programa informático Bio-Rad. Para sobreexpresar los genes del metabolismo energético, se emplea el vector de expresión pET15b. El producto de PCR del gen atpI se introduce en los plásmidos pET15b para obtener el vector de expresión, pAtpI. El vector de expresión se electropora en E. coli BL21 (DE3) y se induce mediante la adición de IPTG a una D0550 de 0.4 ~ 0.5.

Los SADA de *E. coli* se generan a partir de esta línea como se describe en el Ejemplo 12 y se purifican como se describe en el Ejemplo 13.

B. Generación de SADA de E. coli con plásmidos que contienen ATP sintasa

El plásmido pBAD33.atp que contiene el casete de ATP sintasa tal como se describe en Brockmann et al., J Bacteriol, 2013 se sintetiza comercialmente y se transfecta en *E. coli* BL21 (DE3) usando los métodos descritos en el artículo. A continuación, se producen SADA a partir de estas células siguiendo el Ejemplo 12 con la eliminación de glucosa y la adición de arabinosa al 0.03 % en peso/volumen al medio. A continuación, los SADA se purifican utilizando los métodos del Ejemplo 13.

C. Comparación de la actividad de SADA de E. coli y SADA de E. coli con ATP sintasa

Se sintetizan y caracterizan SADA de *E. coli* elaborados a partir de los métodos anteriores y SADA de *E. coli* sin adición de ATP sintasa utilizando los métodos del Ejemplo 15.

Ejemplo 21. Ensayos para actividad aumentada en SADA con supresión de componentes ϵ de ATP sintasa

La subunidad ϵ (atpC) de la ATP sintasa bacteriana FoF1 es un inhibidor intrínseco de la actividad de síntesis/hidrólisis de ATP. Los mutantes defectuosos en este dominio regulador no mostraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, rendimiento de crecimiento molar, potencial de membrana o concentración de ATP intracelular en una amplia gama de condiciones de crecimiento y factores estresantes en comparación con las células de tipo silvestre (Klionsky et al., J Bacteriol, 1984). En este ejemplo, las células de *E. coli* se sintetizan con escisión inducible de la subunidad ϵ o se preparan a partir de una cepa inactivada.

A. Generación de líneas parentales de E. coli con escisión inducible de la subunidad ϵ de ATP sintasa

Se obtiene la cepa de E. coli JW3709 u otra cepa con inactivación de atpC. Se construye un plásmido utilizando un transactivador controlado por tetraciclina (tTA) para expresar atpC de forma inducible en ausencia de tetraciclina (tet) mediante un servicio comercial. La construcción se electropora en la cepa inactivada de atpC para permitir la expresión de atpC en ausencia de tet y se cultiva en medio sin tet. Los SADA se sintetizan a partir de estas células usando los protocolos descritos en el Ejemplo 12 y se purifican con los métodos del Ejemplo 13.

Los SADA de E. coli preparados a partir de los métodos anteriores en presencia y ausencia de tet, los SADA de E. coli preparados a partir de la cepa JW3709 y los SADA normales de E. coli se caracterizan usando los métodos del Ejemplo 15.

Ejemplo 22. SADA altamente activos con vías de glucólisis modificadas

Dado que la vía de la glucólisis es una de las formas en que se sintetiza el ATP, la regulación positiva de las enzimas clave puede conducir a más ATP en la célula. Este ejemplo describe la creación de SADA altamente activo a partir de E. coli que contiene un plásmido que expresa pfkA y tpi que se ha demostrado que produce más ATP (véase Shimosaka et al, Ag. Bio. Chem, 1981).

A. Síntesis de SADA que expresa pfkA y tpi

Se cultiva la cepa pLC16-4 de E. coli del Centro de reserva genética de E. coli y se extrae el plásmido pLC16-4 usando un kit comercial de purificación de plásmidos. Se preparan células de E. coli C600 electrocompetentes y se someten a electroporación con el plásmido pLC16-4 siguiendo el protocolo en el protocolo n.º 4308 915.511 de Eppendorf.

En resumen, las células se cultivan a partir de un cultivo reciente de *E. coli* durante la noche a 37 °C en medio LB hasta una densidad de D₀₆₀₀ de 0.5-0.6. A continuación, las células se ponen en hielo, se centrifugan, se enfrían, se resuspenden en agua a 0 °C, se lavan en agua helada y se diluyen a una concentración de 2×10^{11} células/ml. A continuación, se mezclan 40 µl de células con 10 pg de plásmido en agua y se someten a electroporación. A continuación, las células se cultivan inmediatamente durante 30-60 minutos a 37 °C en medio SOC, se cultivan en placas y luego se cultivan en condiciones de cultivo estándar. A continuación, se preparan SADA de *E. coli* a partir de *E. coli* C600 que contienen y no contienen el plásmido pLC16-4 de acuerdo con los protocolos del Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con el Ejemplo 13.

B. Comparación de SADA que sobreexpresa pfkA y tpi con SADA regular

La actividad de *E. coli* C600 que contiene y no contiene el plásmido pLC16-4 se mide usando los protocolos del Ejemplo 15.

Ejemplo 23. Ensayos para la actividad aumentada en SADA sintetizados en condiciones de cultivo especializadas

Las condiciones de cultivo pueden cambiar drásticamente el crecimiento, la maduración, la supervivencia de las células in vitro (Wang D, Yu X, Gongyuan W. Pullulan production and physiological characteristics of *Aureobasidium pullulans* under acid stress. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97:8069-77). Este ejemplo describe la selección de compuestos y condiciones que aumentan el ATP intracelular. De forma no exhaustiva, las *E. coli* se utilizan con un énfasis inicial en el pH, la concentración de oxígeno y el voltaje aplicado. Esto representa un método

complementario para identificar nuevos aditivos de medios para ajustar los niveles de ATP celular.

Los ADAS se sintetizan y aíslan usando los métodos descritos en el Ejemplo 12. Después del aislamiento, los SADA se cultivan en diversas condiciones de medios y la tasa de producción de ATP se mide utilizando Seahorse (Agilent, kit ATP ASSAY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utiliza glucosa 0.1 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 1 mM o 10 mM como niveles iniciales.

A. Síntesis de SADA a pH bajo

El pH del medio de crecimiento de SADA se ajusta mediante la adición gota a gota de ácido cítrico y NaOH. Se utilizan medios de pH 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 y se mide el ATP intracelular inmediatamente y después de 1, 4, 6, 10 horas utilizando el ensayo Seahorse ATP.

El resultado de los presentes inventores muestra un suministro elevado de ATP en condiciones de pH más bajo, como 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5.

B. Síntesis de SADA en un entorno de hipoxia

Para imitar las condiciones de los medios hipóxicos, los medios se incuban en varias mezclas de gases (1, 5, 7.5, 10, 15, 20.95 % de O₂) durante 24 horas antes de la exposición al SADA. A continuación, se cultivan SADA de E. coli en medio preacondicionado y se mide el ATP intracelular inmediatamente y después de 2 horas usando el ensayo Seahorse ATP.

El resultado de los presentes inventores muestra que los medios con una concentración de oxígeno del 1, 5, 7.5, 10, 15, 20.95 % conducen a un aumento de ATP intracelular después de 2 horas.

C. Síntesis de SADA con campos eléctricos alternos aplicados

Se aplica un campo eléctrico alterno aplicado externamente con una amplitud de intensidades entre 1 y 100 V/cm a SADA cultivado en medio LB estándar dentro de una célula de estimulación de acuerdo con el protocolo previamente definido desarrollado para el cultivo de E. Coli (Zrimec et al, CELL. MOL. BIOL. LETT. Vol. 7. N.º 1. 2002). En resumen, el voltaje se establece entre dos electrodos de platino paralelos (0.75 cm² de área activa, 2 mm de distancia) y se utiliza un generador de frecuencia (Metex MS-9150) para aplicar campos eléctricos. La muestra se mantiene a bajas temperaturas (<5 °C durante la estimulación) y la amplitud del voltaje del electrodo se varía de 0 V a 100 V sin componente de CC y una frecuencia que varía de 50 Hz a 1000 kHz.

El resultado indica que la producción de ATP de nueva aparición en SADA aumenta en muestras al voltaje más alto medido por ATP intracelular usando un ensayo BacTiter Glo (Promega) según lo prescrito por el fabricante.

Ejemplo 24. Ensayos para la actividad aumentada en SADA con flagelos eliminados y otras características no esenciales

Para minimizar la presencia de características estructurales no esenciales en SADA de E. coli, las líneas parentales se sintetizan con un genoma simplificado que contiene genes esenciales para el crecimiento, la división y el metabolismo. Los estudios han demostrado que la E. coli sintetizada con estos genomas "esenciales" no solo sobrevive y se divide, sino que incluso puede proporcionar algunas propiedades útiles. Posfai et al., Science, 2006 demostraron que estas cepas muestran una alta eficacia de electroporación y una propagación precisa de genes recombinantes y plásmidos que son inestables en otras cepas no modificadas. Estas cepas modificadas, por lo tanto, no solo dan como resultado SADA de E. coli desprovisto de estructuras innecesarias, sino que

también tienen una actividad mejorada en comparación con las de las líneas parentales no modificadas.

Los enfoques basados en el genoma se utilizan para identificar genes esenciales en el genoma de *E. coli*, como se describe en Arigoni et al., Nature Biotech., 1998 y otros. En resumen, una comparación del genoma de *E. coli* con el de otras bacterias permite identificar genes clave implicados en el crecimiento, la maduración y la división. Las alteraciones genéticas sistemáticas confirman los genes clave implicados en la supervivencia y la división. Además de esto, la arquitectura del genoma se analiza utilizando métodos por simulación computacional para estabilizar los genomas mínimos. La delección de grandes regiones del genoma se realiza utilizando CRISPR-Cas9 y delecciones mediadas por fagos. Para crear delecciones sin cicatrices, se utiliza el protocolo adaptado de Tear et al., Applied Biochem Biotech, 2015. Además, el medio de crecimiento puede enmascarar o mejorar los efectos de tales delecciones de genes, y estas cepas deberán cultivarse en una variedad de medios para probar completamente los efectos (Ish-Am et al., PLoS One, 2015). Se genera una biblioteca de cepas con un número variable de genes no esenciales que son necesarios para funciones específicas (por ejemplo, transportadores, estructura).

A. Generación de SADA de E. coli con delección de flagelos

E. coli MG1655 (CGSC 6300) se obtiene del *E. coli* Genetic Stock Center y es una cepa de tipo silvestre que carece del elemento IS1 en el promotor *flhDC*. Estos mutantes son inmóviles y tienen delecciones de varias longitudes que comienzan inmediatamente aguas abajo de un elemento IS1 ubicado dentro de la región reguladora del operón *flhDC*, que codifica el regulador principal de la biosíntesis del

flagelo, FlhD4C2. Los SADA se sintetizan a partir de estas células usando los protocolos descritos en el Ejemplo 12 y se purifican con los métodos del Ejemplo 13.

*B. Generación de líneas parentales de E. coli con
deleción de Fimbrias y TXSS*

Se generan múltiples líneas parentales de E. coli con alteración de genes que codifican proteínas fimbriales y TXSS utilizando el kit de eliminación de genes de E. coli Quick and Easy (Gene Bridges). Este kit utiliza Recombinación Red/ET, para dirigirse a moléculas de ADN que se alteran con precisión mediante recombinación homóloga en E. coli que expresan los pares de proteínas que provienen de fagos, RecE/RecT o Red α /Red β . RecE y Red α son exonucleasas 5'-3', y RecT y Red β son proteínas de hibridación de ADN. Brevemente, los productos de PCR que se dirigen al gen de interés se insertan en el plásmido de expresión pRedET y la cepa de E. coli que se va a modificar se transforma según las instrucciones del fabricante. La expresión de Red/ET se induce mediante la adición de L-arabinosa y un cambio de temperatura. La recombinación mediada por Red/ET altera el locus diana mediante la inserción de un casete repetido y los resultados se verifican mediante PCR. Los SADA se sintetizan a partir de estas células usando los protocolos descritos en el Ejemplo 12 y se purifican con los métodos del Ejemplo 13.

*C. Comparación de SADA de E. coli con y sin flagelos,
fimbrias y TXSS*

Los SADA se generan a partir de las líneas parentales anteriores y la actividad se mide usando los métodos del Ejemplo 15.

Ejemplo 25. Ensayos para la actividad aumentada en SADA con capacidades fotosintéticas

Este ejemplo describe la síntesis de SADA altamente activos con la capacidad de convertir la luz en PMF o ATP mediante la adición de un plásmido que expresa proteínas que pueden recolectar energía lumínica, con varias rodopsinas como proteína modelo.

A. *Síntesis de SADA de E. coli que expresa proteorrodopsina*

Las líneas de E. coli que expresan proteorrodopsina (PR) se crean utilizando el protocolo descrito por Walter et al., PNAS, 2007. Brevemente, un plásmido que contiene la variante de PR γ -proteobacteriana de SAR86 en células de E. coli se expresa bajo un promotor T7. Las células se cultivan en caldo T y la expresión de PR se induce con β -D-tiogalactósido de isopropilo 1 mM. Los SADA se sintetizan a partir de las células de E. coli que contienen PR y las células de E. coli que no contienen PR usando los métodos del Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo 13, con algo de SADA purificado bajo exposición a 70 μmol de fotón/(m² s) en luz y algunos purificados en la oscuridad.

Las células de E. coli que expresan PR y los genes necesarios para retinal se crean siguiendo una adaptación del protocolo en Kim et al, Microb Cell Fact, 2012. Brevemente, el plásmido pAcyc-RDS en el artículo se sintetiza comercialmente y se transfecta en E. coli BL21 (DE3) químicamente competente siguiendo las instrucciones del fabricante (NEB, protocolo C2527). Brevemente, las células se descongelan en hielo lentamente, se añade 1 pg-100 ng de ADN plasmídico al tubo de células, las células se agitan 4-5 veces, se dejan reposar en hielo durante 30 minutos, se someten a choque térmico a 42 °C durante 10 s, se coloca en hielo durante 5 minutos, se añade SOC a la mezcla y las células se cultivan durante 60 minutos a 37 °C. A

continuación, las células se siembran en placas de cloranfenicol para su selección y se cultivan en medio LB que contiene cloranfenicol. Los SADA se sintetizan a partir de las células de *E. coli* que contienen PR y las células de *E. coli* que no contienen PR usando los métodos del Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo 13, con algo de SADA purificado bajo exposición a $70 \mu\text{mol}$ de fotón/(m² s) en luz y algunos purificados en la oscuridad.

B. Comparación de SADA que contiene proteorrodopsina y SADA que no contiene proteorrodopsina

La actividad de *E. coli* que contiene y no contiene la PR y se cultiva en la oscuridad o en la luz se mide usando los protocolos del Ejemplo 15.

C. Comparación de SADA que contiene proteorrodopsina y SADA que contiene proteorrodopsina y retinal

La actividad de *E. coli* que contiene PR con o sin retinal y cultivada en la oscuridad o la luz se mide usando los protocolos del Ejemplo 15.

Ejemplo 26. Métodos complementarios para crear SADA de *E. coli* con cargas activas estables de ácido nucleico y de proteína

El ARN intracelular estable (por ejemplo, ARNmi, ARNip y aptámeros de ARN) dentro del SADA es una etapa importante hacia la creación de nuevas tecnologías de administración de ARN, ya que los ácidos nucleicos pueden degradarse fácilmente mediante endonucleasas en el citoplasma. Además, al ingresar a la célula hospedadora, los andamiajes del ARNt-ARN se separan con precisión en un ARNt 5' y un pre-ARNmi 3' tras la escisión por la ribonucleasa t Z celular, que funciona para definir el extremo 3' de los ARNt celulares. Utilizando protocolos desarrollados recientemente (RNA. 2015 Sep; 21 (9): 1683-1689.) la ribonucleasa t Z se puede utilizar para escindir las fusiones de ARN-ARNt guía. Este ejemplo describe

un andamiaje de ARN no codificante derivado de ARNt que se expresa dentro de *E. Coli* como un ejemplo ilustrativo, sin embargo, otros ácidos nucleicos, proteínas y moléculas también podrían estabilizarse dentro del SADA usando enfoques similares basados en andamiajes.

A. SADA de E. coli con cargas útiles de ARN recombinante estabilizado con ARNt

Brevemente, los SADA de *E. coli* se producen y purifican usando los métodos descritos en los Ejemplos 12 y 13. Basándose en protocolos desarrollados previamente, se utilizan dos tipos de ARNt: humanRNA_{Lys3} y *E. coli* tRNA_{Met} (Nat. Methods, Ponchon 2007). Ambos han sido bien caracterizados y expresados de forma recombinante. En principio, podría incluirse cualquier ARN estructurado terminado con un motivo de tallo. Estos incluyen aptámeros, ARN_{lnc} y ribozimas. En resumen, se crea un plásmido que contiene una secuencia de ARN de interés que está flanqueada a cada lado por un inserto de ARNt. En este ejemplo, se usa ARN_m que codifica GFP.

Después de que se sintetizan SADA que contienen la construcción de ARNt-ARN_m, se mide la vida media del ARN y la proteína. Brevemente, las células se transfieren a placas de pocillos y se lisan usando un tampón de lisis en diferentes puntos de tiempo y la secuenciación de ARN se realiza en diversos puntos de tiempo que incluyen 1 min, 10 min, 50 min, 100 min, 200 min, 500 min, 1000 min, 2000 min y hasta 1000000 min, y la abundancia relativa se utiliza para evaluar la estabilidad. Además, la expresión de GFP se observa en los mismos puntos de tiempo al lisar un número definido de células y medir la fluorescencia a través de un lector de placas.

Ejemplo 27. Aumento de la estabilidad de la carga mediante eliminación de ribonucleasas de SADA de *E. coli*

La ribonucleasa E es el iniciador universal de la degradación del ARN y la delección cromosómica en *E. coli* altera la capacidad de formación de colonias (CFA) de la cepa de *E. coli*. Este ejemplo muestra que poniendo la ribonucleasa E bajo el control de un promotor condicional, se puede lograr una mayor estabilidad de proteínas y ARN.

A. Síntesis de líneas parentales de E. coli con delección de ribonucleasa E

La línea parental de *E. coli* con una delección cromosómica de *Eco-rne*, que codifica la ribonucleasa E, se genera insertando un gen *Eco-rne* transmitido por un plásmido bajo el control de un promotor *araBAD*, se utiliza para permitir que *E. coli* sintetice la ribonucleasa E en presencia de arabinosa. Un método de integración de plásmidos en *E. coli* se obtiene de protocolos anteriores (Tamura et al. PLoS One, 2017).

B. Síntesis de SADA sin ribonucleasa

Los SADA se generan a partir de líneas parentales de *E. coli* que carecen de *Eco-rne* cromosómico. Antes de la síntesis y purificación de SADA, como se describe en los Ejemplos 12 y 13, las líneas parentales se cultivan en medio sin arabinosa durante 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48 horas o 3, 4, 5, 10, 14 días para permitir la degradación de la ribonucleasa E residual.

C. Actividad metabólica e índice de estabilidad del ARNm

Se cultivan SADA sin ribonucleasa y sin modificar en caldo LB, y se mide la producción de ATP usando un Seahorse XF (Agilent, ensayo de velocidad de ATP) a las 2 h, 12 h, 1 d, 7 d y 30 d. El SADA libre de ribonucleasa muestra niveles comparables de metabolismo al SADA sin modificar. Ambas líneas de SADA expresan GFP después de la transformación con un plásmido que contiene GFP. La expresión

de GFP se mide usando imágenes de fluorescencia y los niveles de ARNm se miden usando secuenciación de ARN.

D. Inhibición de ribonucleasas de SADA de E. coli

5 Para inhibir la degradación del ARN, que es esencial para la generación y el mantenimiento de la función dentro del SADA de E. coli, se pueden inhibir las ribonucleasas existentes. Para ello, se utilizan inhibidores de molécula pequeña de ribonucleasa E. La ribonucleasa E se considera el iniciador global de la descomposición del ARN en E. coli y forma la plataforma para el complejo degradasoma. El extremo N-terminal forma la porción catalítica de esta enzima y, como tal, puede ser inhibida por una pequeña molécula.

10 Los métodos de detección de moléculas pequeñas desarrollados previamente para E. coli intacta (Kime et al., Sci. Rep., 2015) están adaptados para evaluar la inhibición de la ribonucleasa E en SADA de E. coli y los mejores candidatos para la inhibición se prueban in vitro. Los métodos de muestra descritos anteriormente en los que la GFP se cuantifica a lo largo del tiempo se utilizan para calcular el índice de estabilidad.

20 **Ejemplo 28. Síntesis de un SADA de B. subtilis con un péptido señal de Tat**

Este ejemplo describe SADA que se puede usar para secretar péptidos a través de sistemas de secreción en forma de canal, y SADA de B. subtilis altamente activos que son capaces de secretar más proteínas durante períodos de tiempo más largos.

A. Síntesis de SADA de B. subtilis que secreta GFP

30 Los SADA de B. subtilis se sintetizan utilizando métodos modificados (Feucht et al. Microbiology. 2005 Jun;151(Pt 6):2053-64.) con "caga" que está etiquetada para su exportación en el espacio citoplasmático. Como alternativa, los SADA de B. subtilis se crean a través de una mutación

divIVA1 dirigida (JH Cha, GC Stewart - Journal of bacteriology, 1997 - Am Soc Microbiology), pero de otra manera se recolectan, purifican y caracterizan como se describió previamente en el Ejemplo 12 y el Ejemplo 13. La señal del sistema de secreción de Tat se fusiona con una proteína diana para inducir la producción y exportación del citoplasma de SADA al espacio extracelular. Un péptido señal TAT se incorpora a una proteína fluorescente verde (GFP) que se fusiona con el péptido señal PhoD Tat y se excreta de *B. subtilis* usando protocolos modificados descritos anteriormente (Wickner et al. Science 2005, B. C. Berks, Mol. Microbiol. 22, 393, 1996). La GFP extracelular se mide mediante microscopía de fluorescencia.

B. Síntesis de SADA de B. subtilis altamente activo

Los SADA de *B. subtilis* altamente activos se sintetizan adaptando los métodos de los Ejemplos 20-25, para *B. subtilis* mediante el uso de las versiones de *B. subtilis* de los genes, promotores y plásmidos identificados. El plásmido GFP fusionado con señal TAT de la parte a) también se transfecta en *B. subtilis*, lo que conduce a la secreción de GFP. Los SADA sintetizados a partir de la parte a) y la parte b) se analizan para determinar la secreción de proteínas a las 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 36 y 72 horas.

Ejemplo 29. SADA inmunomodulador para la supresión tumoral

Este ejemplo describe SADA altamente activos que son capaces de contener y administrar una carga que tiene un efecto específico sobre el sistema inmunitario del hospedador. Como modelo que no es una realización única o limitante de este concepto, se crea un SADA de *B. subtilis* altamente activo que secreta dinucleótidos cíclicos específicos (CDN). En particular, el SADA secreta específicamente nucleótidos bacterianos c-di-AMP que se involucran en la vía STING a través de RECON (REductasa que

Controla NF- κ B) de células de mamíferos (Mol Cell. 2008; 30:167-78).

Los SADA de *B. subtilis* se sintetizan como se describió previamente en el Ejemplo 28. Brevemente, usando ensayos modificados descritos en (MacFarland et al: Immunity. 21 de marzo de 2017; 46(3): 433-445.), las células mononucleares de sangre periférica humana se exponen a SADA de *B. subtilis* (1E6, 1E7, 1E8, 1E9, 1E10) por ml de concentración durante (10, 20, 30, 60, 120, 1200 min). A continuación, las células se lisan y se utiliza la PCR para determinar el aumento de veces en genes inmunoestimuladores, tales como genes dependientes de IRF3, IFN y NF- κ B en las hPBMC.

Ejemplo 30. Síntesis de SADA y SADA altamente activo de *Pseudomonas putida*

Este ejemplo describe la síntesis de SADA y SADA altamente activo a partir de una bacteria comensal vegetal y que expresa T6SS, utilizando *P. putida* como organismo modelo.

A. Síntesis de SADA de Pseudomonas putida

Pseudomonas putida KT2440 se obtiene de ATCC y se cultiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un plásmido que sobreexpresa *ftsZ* de *P. putida* bajo un promotor inducible pLac-1k-J23107 (Cook et al., J. Ind. Microb. Biotech., 2018) se construye a partir de la estructura principal de pBBR1MCS-2 por una empresa comercial de generación de vectores. Las líneas parentales de SADA de *P. putida* se sintetizan mediante electroporación del ADN plasmídico en las bacterias siguiendo el protocolo descrito en Chen et al, Chin. J. Appl. Env. Bio., 2010. Brevemente, *P. putida* KT2440 se cultiva a una DO600 de 0.6-0.75, se sedimenta a 4 °C, se lava en 3 mmol/l de HEPES, se electropora en un Bio-Rad Gene Pulser o una máquina equivalente, se reconstituye con medio SOC y se incuba a

30 °C. A continuación, las células se cultivan en placas en agar de LB con Kanamicina para su selección y se cultivan de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la adición de IPTG para inducir la formación de SADA. A continuación, los SADA se purifican utilizando los métodos del Ejemplo 13.

B. Síntesis de SADA de Pseudomonas putida altamente activas mediante la eliminación de flagelos y T3SS

Se obtienen *P. putida* EM42 y EM383 o se sintetiza otro derivado libre de flagelos de *P. putida* KT2440 siguiendo el procedimiento de Martínez-García et al, Microb. Cell. Fact., 2014 y Martínez-García et al, Environ. Microbiol., 2013. Brevemente, la región de 750 pb aguas arriba (TS1) y 816 pb aguas abajo (TS2) de los genes PP4329 y PP4297 se amplifica por PCR, y los fragmentos de TS1 y TS2 se ligan mediante PCR solapada (véase Horton et al., Gene, 1989). El fragmento TS1-TS2 completo se digiere con EcoRI y BamHI y se liga en el plásmido pEMG (GenBank: JF965437.1) para generar el plásmido pEMG-flagelos. El plásmido se transforma en *E. coli* DH5 α λ pir y se electropora en *P. putida* KT2440 preparado con la meganucleasa I-SceI bajo el promotor 3-metilbenzoato como se describe en Martínez-García y de Lorenzo, Meth. Mol. Bio., 2012. Los cointegrados positivos se seleccionan mediante amplificación por PCR del fragmento TS1-TS2 y se resuelven mediante la inducción de la enzima I-SceI, derivada del plásmido pSW-I usando 3-metilbenzoato 15 mM. El cultivo se siembra en placas de agar LB-Ap500 y la delección se confirma mediante PCR.

Los SADA se producen a partir de la cepa resultante utilizando los métodos descritos en la parte a).

C. SADA alto que expresa T6SS

El K1 T6SS como se indica en Bernal et al, ISME J., 2017 se clona en un vector de origen pBBR1 con resistencia a amp mediante síntesis de genes comerciales con su promotor

natural y con el promotor natural reemplazado por un promotor pLac-1k-J23107 (Cook et al., J. Ind. Microb. Biotech., 2018). A continuación, el plásmido se transfecta en una línea de *P. putida* productora de SADA usando los métodos descritos anteriormente y se cultiva en medio LB que contiene ampicilina y kanamicina y los SADA se purifican usando los métodos del Ejemplo 13.

D. Determinación del número de T6SS en SADA

Se usa un anticuerpo marcado con puntos cuánticos contra el trímero de VgrG para marcar los sistemas de secreción de T6SS activos en la superficie del SADA. Esto se obtiene mediante microscopía confocal y los T6SS activos se cuentan manualmente por la presencia de manchas puntiformes. La distancia promedio entre T6SS en la membrana se calcula y eleva al cuadrado y se trata como el área de superficie cubierta por T6SS.

Ejemplo 31. SADA de expresión de T6SS como un antimicrobiano y un protector de plantas

Pseudomonas putida es una bacteria que se encuentra en las plantas y se ha demostrado que tiene actividades protectoras de las plantas debido al ataque de T6SS de posibles patógenos de las plantas. Este ejemplo describe SADA de *P. putida* que son capaces de lisar bacterias usando sistemas T6SS usando *E. coli* como bacteria modelo y *X. campestris* como patógeno de planta modelo.

A. Uso de SADA de Pseudomonas putida para destruir Escherichia coli

El SADA de *Pseudomonas putida* y el SADA altamente activo se sintetizan usando los métodos del Ejemplo 30. Los SADA se utilizan para lisar células de *E. coli* utilizando el protocolo adaptado de Bernal et al., ISME J., 2017. Brevemente, los ensayos de competición se realizan en placas LB. Se cultivan *E. coli* hasta una DO600 de 1 en PBS y se

mezclan en una proporción 1:1 con SADA de *P. putida* en las placas. Las placas también se cultivan sin ningún SADA de *P. putida*. Las placas se incuban a 30 °C durante 5 h y las unidades formadoras de colonias se cuentan por selección de antibióticos.

B. Uso de SADA de Pseudomonas putida para destruir Xanthomonas campestris.

Se usan SADA de *Pseudomonas putida* para lisar células de *X. campestris* usando el mismo ensayo que se describe en la parte b), con la excepción de que las células de *X. campestris* se cultivan durante 24 horas en la placa. Se realiza el mismo ensayo para demostrar que el SADA de *P. putida* reduce el número de colonias de *X. campestris* y el SADA altamente activo reduce el número más.

C. Uso de SADA de Pseudomonas putida como un protector de plantas

Los SADA de *P. putida* se utilizan para proteger las plantas de daños siguiendo el protocolo adaptado de Bernal et al., ISME J., 2017. Brevemente, los ensayos de competición en plantas se llevan a cabo mediante la infiltración de bacterias en las hojas de *Nicotiana benthamiana*. Los cultivos nocturnos de *Xanthomonas campestris* se ajustan a una OD₆₀₀ de 0.1 en PBS. Los SADA de *P. putida* se mezclan con las bacterias en una proporción de 1:1. Se infiltran aproximadamente 100 µl de volumen en el reverso de una hoja de 1 mes y se marca el área de infiltración. Después de 24 h de incubación en una cámara de planta (23 °C, 16 h de luz), se determinan las unidades formadoras de colonias. Se corta una sección de la hoja del área de infiltración, se homogeneiza en PBS y posteriormente se diluye en serie. Las hojas se visualizan mediante microscopía de fluorescencia. La evaluación de la necrosis se basa en la coloración de las hojas siguiendo a Katzen et al., J. Bacteriol, 1998

utilizando cambios visibles en el color del tejido de la hoja, que puede cambiar de verde a amarillento (clorosis), de amarillento a pardusco y ennegrecido de la hoja (necrosis), hasta completar la pudrición de la hoja en etapas posteriores.

Ejemplo 32. SADA de *Serratia marcescens* como un modelo de SADA antifúngico

S. marcescens es una bacteria Gram negativa en forma de bastón que recientemente se ha demostrado que destruye a las células fúngicas mediante la liberación de T6SS de los efectores Tfe1 y Tfe2 (Trunk et al., Nat Microb, 2018). Este ejemplo describe el uso de SADA de *S. marcescens* para reducir la aptitud de los hongos.

A. Síntesis y purificación de SADA de S. marcescens

Se introduce un plásmido que contiene el promotor *Pseudomonas* ampR PampR y el gen *ftsZ* de *S. marcescens* en la estructura principal de pUC19 con un RBS sintético de una manera similar al plásmido PQY38 en Yan y Fong, Appl. Microbiol. Biotech., 2017. El plásmido se introduce en *S. marcescens* Db10 del Centro de Genética Caenorhabditis usando electroporación siguiendo los métodos de Yan y Fong, Appl. Microbiol. Biotech., 2017. Brevemente, las células se lavan en frío en agua fría a través de una centrífuga enfriada, se resuspenden en agua fría, se añade ADN plasmídico y la mezcla se electropora. Posteriormente, las células se cultivan en 1 ml de medio SOC a 30 °C durante 60 minutos y luego se cultivan en placas de agar LB amp. A continuación, se cultivan células de *S. marcescens* con *ftsZ* en medio M9, extracto de levadura al 0.1 %, glucosa al 2 % y 200 mg/l de ampicilina a 30 °C. A continuación, los SADA se purifican utilizando los métodos del Ejemplo 13.

B. Demostración de la capacidad del SADA de S. marcescens para destruir hongos

La actividad antifúngica se mide mediante un ensayo de cocultivo similar al de Trunk et al., Nat Microb, 2018. Las líneas parentales, los SADA y las células diana se normalizan usando densidad óptica. Las células diana y las líneas parentales, los SADA o E. coli de control se mezclan en una proporción de volumen de 1:1 y se colocan 12.5 µl de la mezcla en un medio sólido SC + glucosa al 2 %. Los cultivos se incuban durante 2, 7 y 24 horas, y las células fúngicas supervivientes se cuantifican mediante dilución en serie y recuentos viables en medio YPDA suplementado con estreptomycin para eliminar bacterias y SADA. Las células fúngicas también se visualizan usando DIC en tiempo real para medir el crecimiento y la división celular. E. coli se usa en cocultivos como control negativo. Tanto las líneas parentales de S. marcescens como las SADA son capaces de destruir a las células fúngicas después de 7 horas de cocultivo.

Ejemplo 33. Administración de proteínas a las células epiteliales del intestino humano a través de T3SS sobreexpresado

La capacidad de administrar proteínas intracelulares a células de mamíferos podría permitir una variedad de aplicaciones en los compuestos terapéuticos humanos. Este ejemplo describe que la proteína heteróloga se puede administrar a las células epiteliales del intestino humano utilizando sistemas de secreción SADA T3. Esta realización modelo podría aplicarse a cualquier número de aplicaciones animales y vegetales en las que la proteína intracelular podría tener un efecto marcado sobre el organismo diana.

En este experimento, las células epiteliales del intestino humano se exponen a diversas concentraciones de SADA (1E6, 1E7, 1E8, 1E9, 1E10 SADA por ml) y se mide la GFP intracelular en las células epiteliales usando microscopía

de fluorescencia. El número de células positivas para GFP se divide entre el número total de células para diversas condiciones para calcular la administración y la eficacia de la dosificación.

5 Las líneas celulares de mamíferos Caco-2 se cultivan de acuerdo con la ATCC. Las células se modifican para expresar GFP truncada (tGFP) como describen Huang y Bystroff, Biochemistry, 2009. Esta forma truncada de GFP se expresa y se pliega correctamente pero no es fluorescente hasta que se
10 suministra la cadena β que falta. E. Coli y SADA se producen y se purifican como se describe en los Ejemplos 12 y 13, respectivamente. En resumen, se cultivan a 37 °C en matraces de cultivo de tejidos Corning® (T-25, 75, T-150 o T255, n.º de catálogo 430641) con los medios esenciales mínimos Eagles
15 personalizados de ATCC (n.º de catálogo 30-2003) que contienen aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 1500 mg/l de bicarbonato de sodio suplementado con suero fetal bovino al 20 %. Para recolectar células Caco-2 para el ensayo de administración, las células
20 se lavan con PBS sin cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y se añaden 2-3 ml de tripsina al 0.25 % (p/v) y soluciones de EDTA 0.05 mM a la superficie celular durante 10-15 minutos y la actividad enzimática se apaga con 6-8 ml de medio de crecimiento completo. Después de la recolección, las células
25 se cuentan usando un contador celular automático (Countess II, Thermo Fisher) y tinciones vivas/muertas (calceína viva, homodímero de etidio muerto).

A. Preparación y purificación de SADA de E. coli con T3SS de Shigella SPI-1

30 Los SADA de E. coli se preparan usando los métodos descritos en el Ejemplo 12. Para aumentar la abundancia de T3SS en la superficie del SADA, se introduce un plásmido que codifica Hila. Hila regula SPI-1 T3SS que se adopta de un

protocolo existente (Bajaj et al. Molecular Microbiology (1995) 18(4), 715-727). Los SADA se preparan usando los métodos descritos en el Ejemplo 13. Los T3SS se inspeccionan visualmente y se cuentan usando microscopía de inmunofluorescencia y TEM. Después de la comparación de T3SS aislada altamente pura que expresa SADA con T3SS no purificada que expresa SADA.

B. Fusión de etiquetas del sistema de secreción de proteínas

Para permitir la secreción de proteínas usando un T3SS funcional, la cadena β de GFP se fusiona con los primeros 104 aminoácidos de la etiqueta de secreción de T3SS, SopE usando una metodología de diseño de plásmidos previamente descrita (Evans, et. al. J. Virol., Feb. 2003, p. 2400-2409). El plásmido se expresa en *E. coli* parental y los SADA posteriores contienen el híbrido SopE-GFP truncado.

C. Ensayo de administración de proteínas

Antes de la exposición a SADA, las células se cultivan 1, 3 o 5 días después de la confluencia para asegurar la madurez celular y la polarización reproducibles. Para cada muestra, se añaden SADA a la muestra epitelial confluyente y se incuban a 37 °C durante 2 horas. La eficacia de la administración de SADA se calcula dividiendo el número total de células de fluorescencia entre el número total de células en cultivo y comparándolo entre las diversas condiciones.

Ejemplo 34. Métodos complementarios para la administración dirigida de SADA de *E. coli* con sistemas T3SS

La administración dirigida es importante en la administración de fármacos. Este ejemplo describe el uso de nanocuerpos como un agente de direccionamiento modelo para SADA. Los nanocuerpos son los fragmentos de anticuerpos funcionales más pequeños conocidos, y un trabajo reciente ha demostrado que pueden expresarse en la superficie de *E. coli*

(Salema y Fernandez, Microb Biotechnol, 2017). Los nanocuerpos de superficie pueden unirse de manera eficaz a proteínas diana y se pueden usar para generar especificidad para tipos celulares individuales.

5 *A. Síntesis de líneas parentales de E. coli que contienen nanocuerpos de EGFR*

Las líneas parentales de E. coli se sintetizan expresando nanocuerpos de superficie para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como describen Salema et al.,
10 MAbs, 2016. Brevemente, la secuencia que codifica el nanocuerpo para EGFR (TYPYSRDHYFPRMTTEYDY) se clona en los sitios del vector de presentación de E. coli pNeae2, que fusiona el nanocuerpo con el extremo C-terminal del polipéptido de intimina Neae permitiendo la expresión en la
15 superficie. El plásmido pNeae2 (CmR) es un derivado del vector pNeae, que codifica los restos de Intimin 1-659 (de la cepa EDL933stx- de EHEC 0157:H7) seguido de la etiqueta E, el epítipo de hexahistidina (His) y una etiqueta de myc en C-terminal (EQKLISEED).

20 Las bacterias que portan plásmidos con nanocuerpos se cultivan a 30 °C en caldo LB en placas de agar con el antibiótico apropiado para la selección de plásmidos. Las placas LB y los medios de preinóculo antes de la inducción contenían glucosa al 2 % (p/v) para la represión del promotor
25 lac. Los cultivos de preinoculación se inician a partir de colonias individuales (para clones individuales) o de una mezcla de clones (en el caso de bibliotecas), recién cultivados y recolectados de placas, diluidos a una D0600 inicial de 0.5 y cultivados durante la noche en condiciones
30 estáticas. Para la inducción, las bacterias (correspondientes a una D0600 de 0.5) se recolectan por centrifugación (4000xg, 5 min) y se cultivan en el mismo medio con isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) 0.05 mM, pero

sin glucosa durante 3 h con agitación (160 rpm), a menos que se indique lo contrario.

B. Síntesis de SADA con expresión de nanocuerpos de EGFR

Los SADA se sintetizan a partir de estas líneas parentales como se describe en el Ejemplo 12 y se cargan con carga (administración de proteínas y genes para GFP) como se describe anteriormente.

C. Ensayo de especificidad para SADA con nanocuerpos de EGFR

Las líneas celulares Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal epitelial humano) y A-431 (carcinoma epidermoide) se cultivan conjuntamente de acuerdo con los protocolos de cultivo celular estándar proporcionados por el fabricante. A continuación, los cocultivos se incuban con líneas parentales modificadas o SADA que porta una carga (GFP) como se describe anteriormente. El FACS se usa para separar las células A-431 y Caco-2 y para cuantificar el porcentaje de células diana que expresan GFP. La microscopía fluorescente también se usa para cuantificar los niveles de fluorescencia en células individuales para medir el número de subunidades de proteínas inyectadas o la cantidad de expresión de proteínas debido a la transfección. La microscopía también se usa para cuantificar la expresión de GFP en el tipo de célula en función de la morfología celular para diferenciar entre las células Caco-2 y A-431 junto con la inmunocitoquímica para marcar los marcadores específicos de la célula.

Ejemplo 35. Síntesis de SADA de *Xanthomonas citri* para administrar T3SS a las plantas

Este ejemplo describe la creación de SADA a partir de bacterias fitopatógenas y el uso de sus funciones de suministro natural con *Xanthomonas citri* como organismo modelo. La T3SS que se encuentra en los patógenos vegetales

forma la base de un sistema de administración de proteínas eficaz para las células vegetales. Dado que los efectores de T3SS de *X. citri* no están bien caracterizados, se usa un ensayo para medir la formación de biopelículas para evaluar la capacidad de T3SS en SADA de *X. citri*. A continuación, los efectores se pueden reemplazar con proteínas reporteras (por ejemplo, GFP) para evaluar la capacidad de transferir proteínas expresadas heterológamente a través de T3SS.

A. Síntesis de X. citro deficiente en T3SS

T3SS es necesario en *X. citri* para la formación de biopelículas durante la infección y aumenta la virulencia. Un *X. citri* deficiente en T3SS se crea creando un mutante con deficiencia en el operón *hrpB* que codifica las proteínas T3SS clave (descrito por Dunger et al, Plant Pathol, 2005). Los cebadores usados son 5'-GAACTGGGCGGGAAGAACGACGAG-3' y 5'-GCCGCCGCCGAAGAAGTGATG-3'. Se utiliza ADN genómico (100 ng) como molde en una mezcla de reacción de 50 µl. La PCR se realiza en un termociclador Eppendorf, con desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos amplificados por PCR se analizan en geles de agarosa al 0.9 %. Las hibridaciones de transferencia de Southern se realizan utilizando fragmentos de ADN mutante de *Xachrp* producidos por digestión con *Bam*HI, fraccionados por electroforesis y luego transferidos a membranas Hybond-N. Los protocolos de hibridación y detección se realizan utilizando productos de PCR de *hrp840* pb amplificados marcados con [α - 32P] dATP.

El mutante *hrpB* se construye mediante integración de plásmidos. El producto amplificado se clona en el vector suicida pK19mobGII digerido con *Sma*I, produciendo pKmobB y pKmobF, respectivamente. Los plásmidos se transfieren a *X.*

axonopodis pv. citri por apareamiento biparental de la cepa S17-1 de E. coli movilizadora de amplio rango de hospedadores. Las mezclas bacterianas se colocan en membranas Hybond-C, se colocan en agar nutritivo y se incuban durante 48 h a 28 °C. A continuación, se lavan las membranas y se transfieren las bacterias a un medio selectivo. Las cepas mutantes de Xanthomonas axonopodis pv. citri se seleccionan mediante la resistencia a los antibióticos codificada por el vector (Km) y se verifican mediante la hibridación de Southern.

B. Síntesis de SADA de X. citri

Para crear SADA de X. citri, las X. citri (mutantes de hrpB y sin transformar) se transfectan con un plásmido que sobreexpresa la proteína ftsZ bajo el promotor de arabinosa (Lacerda et al, Plasmid, 2017), similar al Ejemplo 12. La secuencia del gen ftsZ es de Kopacz et al., MicrobiologyOpen, 2018. Las secuencias del cebador usadas son: directo-GAGCCCATGGCACATTTCTGAAGTATTGAAAAATGGCTCCCAACGCGGTC ATCAAGG; inverso-AGTTCATATGCGACGCGACCGACGCTCCTCAG. Los plásmidos son sintetizados comercialmente por Thermo Fisher. La transfección se lleva a cabo utilizando el proceso descrito anteriormente. Con el tiempo, las colonias seleccionadas proliferan y producen SADA de forma continua.

C. Capacidad de SADA de X. citri para formar biopelículas en Citrus sinensis

T3SS es esencial para la formación de biopelículas de X. citri. Se utilizan SADA de cepas normales y mutantes de hrpB en un ensayo de infección en plantas de C. sinensis. Todas las plantas se cultivan en una cámara de crecimiento con luz incandescente a 28 °C con un fotoperíodo de 16 h. Los SADA se purifican hasta una OD₆₀₀ de 1 y se resuspenden en MgCl₂ 10 mM a 10⁴ a 10⁷ ufc/ml. Estos se infiltran en las hojas con jeringas sin aguja. Los cancros se cuentan a partir de 20

hojas de naranja inoculadas con las diferentes cepas y las áreas de las hojas contadas se miden a partir de imágenes digitalizadas utilizando el programa informático Adobe Photoshop. Los SADA de *X. citri* que expresan T3SS muestran una formación de cancro significativamente mayor que los de las líneas parentales deficientes en T3SS.

Ejemplo 36. Síntesis de SADA de *Agrobacterium* como un agente de transformación de plantas usando T4SS

Este ejemplo describe la creación de SADA que puede entregar cargas útiles, como un plásmido de ADN modelo, con T4SS. *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza como una forma de transformar plantas utilizando sus sistemas T4SS naturales. Esto permite emplear agrobacterias no replicativas en una modalidad de pulverización en grandes campos sin riesgo de escape.

*A. Transfección de *Agrobacterium* con un plásmido*

Para la transfección de *Nicotiana Benthamiana*, se introducen plásmidos con genes de resistencia a antibióticos en la cepa de *Agrobacterium* GV3101 usando el método de congelación-descongelación y materiales como se describe en el *Agrobacterium Transformation Kit* (MPbio). Brevemente, *Agrobacterium* se cultiva a una OD₆₀₀ de 1.0 a 2.0, se resuspende en una solución de transformación, se mezcla con el ADN plasmídico, se sumerge en nitrógeno líquido durante 1 minuto, se sumerge en un baño de agua a 30 °C durante 5 minutos y se vuelve a cultivar en medio Luria-Bertani con el marcador de selección en el plásmido.

Para la transfección de tomate, se introducen plásmidos con genes de resistencia a antibióticos en células ElectroMAX de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* (Thermo Fisher) utilizando los métodos descritos por las instrucciones del fabricante. Brevemente, la agrobacteria se descongela en hielo húmedo y se mezcla con ADN plasmídico purificado libre

de sales, etanol y otros contaminantes. La mezcla se electropora, se mezcla inmediatamente con medio a temperatura ambiente y se vuelve a cultivar durante 3 horas.

5 A continuación, las células de cualquiera de los protocolos se diluyen y se colocan en placas en agar con los antibióticos necesarios para seleccionar. Al día siguiente, o cuando las colonias son visibles, se seleccionan para secuenciar. Después de la confirmación de la identidad del plásmido, las colonias adecuadas se cultivan durante la noche
10 agitando en medio de cultivo (especificado por las instrucciones del fabricante) que contiene los marcadores de selección necesarios.

B. Síntesis de SADA de Agrobacterium

Se sintetiza comercialmente un plásmido que contiene la
15 agrobacteria ftsZ en una estructura principal de pSRKGm (Khan et al, Appl. Environ. Microbiol., 2008). Luego se transfecta en agrobacterium usando los métodos descritos en la parte a) para formar líneas parentales SADA de *A. tumefaciens*. A continuación, la línea parental se cultiva de acuerdo con
20 las instrucciones del fabricante con la adición de IPTG y se purifican SADA usando los métodos del Ejemplo 15.

C. Síntesis de SADA grandes de Agrobacterium

Se sintetiza comercialmente un plásmido que contiene la
25 exonucleasa V en una estructura principal de pSRKGm (Khan et al, Appl. Environ. Microbiol., 2008). Luego se transfecta en agrobacterium usando los métodos descritos en la parte a) para formar líneas parentales SADA de *A. tumefaciens*. A continuación, la línea parental se cultiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la adición de IPTG y se
30 purifican SADA usando los métodos del Ejemplo 13.

D. Síntesis de SADA de A. tumefaciens con carga útil de GFP

Se utiliza el plásmido pLSLGFP.R al que se hace referencia en Baltes et al., The Plant Cell, 2014. El plásmido pLSLGFP.R se transfecta utilizando los métodos mostrados en la parte a). Los SADA de *A. tumefaciens* se sintetizan utilizando los métodos de la parte b) o c).

E. Transfección de plantas con SADA de Agrobacterium con carga útil de GFP

Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var Xanthi) se cultivan a 21 °C con el 60 % de humedad en un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las hojas (hojas superiores completamente expandidas) de plantas de tabaco de 4 a 6 semanas se utilizan para la transformación de SADA. Se infiltra una hoja por planta. Las hojas de las plantas de tabaco se infiltran con *Agrobacterium* usando una jeringa de 1 ml. Inmediatamente después de la infiltración, las plantas se riegan y se cubren con una cúpula de plástico para mantener una alta humedad. Las cúpulas de plástico se retiran ~24 h después de la infiltración. Se obtienen imágenes de las plantas con un lector fluorescente y se mide el porcentaje de hojas con GFP visible.

Ejemplo 37. Medición de la eficacia de secreción de SADA

Para medir la eficacia de secreción de SADA, se mide la capacidad para sintetizar y secretar proteínas expresadas de forma endógena y heteróloga.

A. Líneas parentales de E. coli que sintetizan GFP

Las líneas de *E. coli* que contienen vectores que portan GFP y resistencia a ampicilina se solicitan a ATCC (ATCC® 25922GFP™) y se cultivan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

B. Capacidad de los SADA para sintetizar moléculas

Los SADA se generan a partir de líneas parentales de *E. coli* que expresan GFP así como de *E. coli* natural. Las mediciones fluorescentes se realizan a partir de líneas

parentales de *E. coli* que expresan GFP como control positivo y se utilizan como valores iniciales para medir la intensidad de GFP de SADA. Los SADA se sintetizan de acuerdo con el Ejemplo 12, se cultivan en placas sobre una placa de 96 pocillos y se mide la fluorescencia utilizando un lector de placas. Dado que los SADA no necesitan sintetizar las proteínas requeridas para el crecimiento o la división, ambos SADA generados son más eficaces en la síntesis de proteínas y presentan una mayor intensidad de GFP en comparación con las líneas parentales. Para medir la intensidad a nivel celular, las líneas parentales de *E. coli* y SADA se fijan y montan en portaobjetos de vidrio utilizando protocolos de preparación de células estándar. Se obtienen imágenes de estos utilizando un microscopio confocal con imágenes de fluorescencia. Estas imágenes se utilizan para medir la intensidad fluorescente por unidad cuadrada de área y se utilizan para la comparación directa con las líneas parentales.

C. Capacidad de los SADA para secretar moléculas

E. coli usa la secreción de lipasa mediada por T1SS para facilitar la infección. T1SS contiene transportadores ABC que reconocen secuencias C-terminales específicas en la proteína secretada. Las líneas parentales de *E. coli* se generan expresando T1SS natural junto con lipasas endógenas, así como otra línea transfectada con un plásmido que contiene GFP fusionado con la secuencia de C-terminal para el transporte como describen Chung et al., Microb Cell Fact, 2009.

En resumen, los dominios transportadores ABC de la lipasa (LARD) están diseñados para la secreción de proteínas de fusión. Los LARD incluían cuatro repeticiones ricas en glicina que comprenden una estructura de rodillo β y se agregan al extremo C-terminal de las proteínas de prueba. Se

agrega un enlazador Pro-Gly o un sitio de Factor Xa entre las proteínas de fusión y los LARD. Antes de analizar la secreción de la proteína de fusión GFP, se comprueba la expresión de las proteínas de fusión GFP. Estas proteínas se expresan en *E. coli* y sus tamaños esperados se confirman mediante análisis por transferencia de Western (Rockland Inc., PA, n.º de catálogo KCA215). Además, se demuestra la fluorescencia de GFP. Las colonias representativas de *E. coli* que expresan estas proteínas se ven bajo luz ultravioleta (UV). El fenotipo secretor se pudo rastrear mediante la actividad de la lipasa. *E. coli* se cultiva en agar tributilestaño para detectar la secreción de proteínas de fusión TliA. Cuando las proteínas de fusión de GFP también se detectan con anticuerpos contra GFP, las mismas bandas detectadas por el anticuerpo contra LARD se detectan en la célula y el sobrenadante.

Métodos adaptados de Chung et al. también se utilizan para medir la secreción y se describen a continuación. Los SADA se generan a partir de las líneas parentales de *E. coli* descritas en el Ejemplo 12.

Para medir la secreción de lipasa por SADA, los SADA se siembran en un medio sólido (caldo LAT: LB, agar Bacto al 1.5 %, tributilestaño al 0.5 %). La lipasa secretada hace que se desarrolle un halo alrededor de la colonia como un fenotipo típico. Los SADA desarrollan halos más rápido que las líneas parentales. Además de esto, la actividad de la lipasa se mide espectrofotométricamente añadiendo palmitato de p-nitrofenilo (pNPP) como sustrato disuelto en etanol y Tris-HCL. Se añaden 50 µl de sobrenadante de SADA y cultivos de la línea parental a 200 µl del sustrato y se mide la absorbancia de 420 m utilizando un lector de placas. La actividad se mide mediante el aumento de la densidad óptica.

Dado que las lipasas son proteínas expresadas de forma endógena, la GFP se utiliza para medir la secreción de proteínas expresadas de forma heteróloga. Las líneas de SADA y parentales se cultivan en caldo LB y se recoge el sobrenadante del caldo para medir la expresión de GFP. La inmunotransferencia estándar (Rockland Inc., PA, n.º de catálogo KCA215) se usa de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un anticuerpo específico de GFP para medir la secreción de GFP.

Ejemplo 38. SADA que contiene nanopartículas sin forma de bastón (*Magnetospirillum magneticum*)

Este ejemplo describe que SADA puede sintetizarse a partir de bacterias sin forma de bastón y puede contener estructuras más grandes, como nanopartículas.

A. Preparación de SADA de M. magneticum

Para crear SADA, *M. magneticum* se transfecta con un plásmido que sobreexpresa la proteína ftsZ (Q2W8K6_MAGSA) bajo el promotor T7. Los plásmidos son sintetizados comercialmente por Thermo Fisher. La transfección se lleva a cabo utilizando procesos estándar de transfección de bacterias (véase Thermo Fisher Molecular Biology Handbook). En resumen, las células competentes se cultivan en placas de agar a temperatura ambiente. Se añaden 0.5-2 ng/ml de ADN a las células competentes dentro de un vial y se incuban durante 20-30 minutos. Luego, cada tubo se somete a un choque térmico colocando el tubo en un baño de agua a 42 °C durante 30-60 segundos para crear poros transitorios en la superficie celular. A continuación, las células se siembran en geles de agar que se han cargado previamente con antibiótico selectivo y se cultivan durante la noche. Solo sobreviven las bacterias que han sido transfectadas con el plásmido. Se recoge una sola colonia y se cultiva a 37 °C con agitación continua a 120 rpm en medio LB que contiene

50-100 µg/ml de ampicilina. Con el tiempo, las colonias seleccionadas proliferan y producen SADA de forma continua. Como alternativa, se usa un protocolo similar al usado en el Ejemplo 14 para preparar SADA grandes.

5 Además de esto, la delección de un gen similar a *ftsZ* da como resultado la producción de magnetosomas de magnetita superparamagnéticos en estas bacterias (Ding et al., J Bacteriol., 2010).

10 *B. Caracterización de la retención de nanopartículas de SADA de M. magneticum*

La morfología de los magnetosomas de SADA se analiza utilizando TEM como lo describen Wang et al., Front Microbiol., 2013. En resumen, se dejan caer 20 µl de células en una rejilla TEM de cobre cubierta con una película de formvar recubierta de carbono durante 2 h, luego se lavan dos veces con agua destilada esterilizada y se secan al aire. Los tamaños de los magnetosomas se definen como (largo + ancho)/2, y los factores de forma como ancho/largo midiendo micrografías TEM.

20 *C. Demostración del magnetismo de los SADA de M. magneticum*

Para caracterizar las propiedades magnéticas de los SADA de *M. magneticum*, se utiliza un protocolo modificado de Ding et al., J Bacteriol., 2010. Brevemente, las muestras se liofilizan y las mediciones magnéticas de baja temperatura se toman utilizando un magnetómetro Quantum Design MPMS XL-5 (sensibilidad, 5.0×10^{-10} Am²). La desmagnetización térmica de la remanencia adquirida en un campo de 2.5 T a 5 K (de aquí en adelante llamado SIRM5K_2.5T) después de dos pretratamientos se mide de 5 K a 300 K. El primer pretratamiento es enfriar la muestra de 300 K a 5 K en un campo cero (campo cero enfriado [ZFC]), y el segundo lo enfría de 300 K a 5 K en un campo de 2.5 T (campo enfriado

[FC]). La temperatura de transición de Verwey (Tv) se define como la temperatura correspondiente a la derivada máxima de primer orden dM/dT de la curva FC. Las curvas de inversión de primer orden (FORC) de temperatura ambiente se miden en un magnetómetro de gradiente alterno (sensibilidad, 1.0×10^{-11} Am²; MicroMag modelo 2900). Los diagramas FORC se calculan utilizando el programa informático FORCinel versión 1.05, con un factor de suavizado (SF) de 2. Los diagramas FORC proporcionan información sobre el estado del dominio, la coercitividad y la interacción magnetostática de los cristales magnéticos.

Ejemplo 39. SADA sensible al entorno

Las operaciones lógicas basadas en puertas lógicas booleanas se pueden codificar en redes reguladoras de genes para permitir que las células se integren o diferencien entre diferentes señales ambientales y celulares y respondan en consecuencia. Se pueden diseñar circuitos lógicos genéticos personalizados para vincular varios sensores y actuadores celulares que no se encuentran en las células naturales. Estas células modificadas se pueden programar para generar los resultados deseados en respuesta a entradas específicas, intracelularmente o extracelularmente. A pesar de algunos inconvenientes, como la no modularidad de los circuitos genéticos y las limitaciones del armazón del hospedador, son extremadamente útiles en organismos diseñados y la biblioteca de circuitos lógicos genéticos se está expandiendo actualmente. Se han descrito varios de estos circuitos en *E. coli*, que se incorporan en SADA de *E. coli*.

Estos circuitos forman la base de los SADA ambientalmente sensibles, que puede producir una salida ajustable en respuesta a la entrada (por ejemplo, metabolitos, pH, calor, luz, ligandos externos). Están diseñados con puertas AND para responder a la presencia de

múltiples entradas, o con puertas OR para responder a cualquiera de las entradas codificadas. Este repertorio se puede ampliar para incluir otras puertas lógicas como NOR, NAND, XOR, etc.

5 *A. Síntesis de SADA de E. coli con AND/OR*

P. syringae contiene un sistema regulador para la secreción de Tipo III llamado sistema hrpR/hrpS que forma una puerta AND que regula estrechamente la expresión de T3SS. La expresión de ambas proteínas es necesaria para la producción del sistema T3SS. La construcción del plásmido y la manipulación del ADN se realizan utilizando técnicas estándar de biología molecular, y la construcción de la puerta AND se modifica del protocolo descrito por Wang et al., Nat Commun., 2011. Brevemente, se construyen plásmidos que contienen a) el promotor Plac inducible por IPTG y la parte hrpR de la puerta AND, y b) el promotor inducido por calor pL (del fago lambda, que generalmente es suprimido por una proteína termolábil) y la parte hrpS de la puerta AND. El resultado es la expresión de la proteína GFP, que contiene el promotor T3SS y se expresa cuando se expresan tanto hrpR como hrpR.

 La construcción del plásmido y las manipulaciones del ADN se realizan siguiendo técnicas estándar de biología molecular. El promotor de los genes hrpR y hrpS son sintetizados por GENEART siguiendo el estándar de BioBrick. El plásmido pAPT110 (p15A ori, Kanr) que contiene Plac inducible por IPTG se usa para caracterizar y albergar hrpR (XbaI/KpnI) de la puerta AND. Se obtiene el plásmido pBAD18-Cm (pBR322 ori, Cmr) que contiene el promotor pL inducible por calor que alberga hrpS de la puerta AND. pSB3K3 (p15A ori, Kanr) se usa para clonar y caracterizar el promotor Flux sintético inducible por AHL (BBa_F2620) que se usa más tarde para dirigir hrpR (XbaI/PstI). Las diversas secuencias

para cada construcción génica se introducen mediante amplificación por PCR (usando ADN polimerasa PfuTurbo de Stratagene y un termociclador de gradiente Eppendorf Mastercycler) con cebadores que contienen el RBS correspondiente y los sitios de restricción apropiados. Como alternativa, todas las construcciones se sintetizan comercialmente. Todas las construcciones se verifican mediante secuenciación de ADN (Eurofins MWG Operon) antes de su uso en cepas de células diana.

Todos los experimentos de caracterización se realizan en medio mínimo M9 (11.28 g de sales M9/l, clorhidrato de tiamina 1 mM, casaminoácidos al 0.2 % (p/v), MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0.1 mM), suplementado con una fuente de carbono adecuada. Se utilizan dos medios M9 con diferente fuente de carbono: M9-glicerol (0.4 % (v/v) de glicerol) y M9-glucosa (0.01 % (v/v) de glucosa). Las concentraciones de antibiótico utilizadas son 25 µg/ml para kanamicina, 25 µg ml⁻¹ para cloranfenicol y 25 µg/ml para ampicilina. Las células inoculadas de colonias individuales en placas recién sembradas se cultivan durante la noche en 4 ml de M9 en tubos Falcon de 14 ml a 37 °C con agitación (200 r.p.m.). Los cultivos de una noche se diluyen en medio M9 precalentado a una D₀₆₀₀ = 0.05 para los cultivos del día, que se inducen y se hacen crecer durante 5 h a 30 °C antes del análisis, a menos que se indique lo contrario. Para el ensayo de fluorescencia por fluorometría, los cultivos diluidos se cargan en una microplaca de 96 pocillos (Bio-Greiner, negro chimenea, fondo plano transparente) y se inducen con inductores de 5 µl (para inducción de entrada única) o 10 µl (para inducción de entrada doble) de concentraciones variables hasta un volumen final de 200 µl por pocillo mediante una pipeta multicanal.

Para diseñar una puerta OR, se utiliza el sistema descrito por Rosado *et al.*, *PLoS Genetics*, 2018. En primer lugar, se construye un ARNm reprimido en cis que codifica RFP bajo un promotor constitutivo. Luego, la represión se
5 elimina en presencia de ARNs de RAJ11. A continuación, se sintetizan plásmidos que contienen el promotor inducible por IPTG PLac y el promotor inducido por calor pL, que inducen ambos la expresión del ARNs de RAJ11. La salida es la expresión RFP, que se ve en respuesta a cualquiera de las
10 entradas.

Los promotores sintéticos basados en PL regulados por los factores de transcripción LacI y pL se utilizan como elementos para detectar las señales de entrada (IPTG y calor). Las secuencias riborreguladoras (ARNs y 5' UTR) de
15 los sistemas RAJ11 se obtienen de trabajos previos (Rodrigo *et al.*, *PNAS*, 2012). Las diversas secuencias para cada construcción génica se introducen mediante amplificación por PCR (usando ADN polimerasa PfuTurbo de Stratagene y un termociclador de gradiente Eppendorf Mastercycler) con
20 cebadores que contienen el RBS correspondiente y los sitios de restricción apropiados. Todas las construcciones se verifican mediante secuenciación de ADN (Eurofins MWG Operon) antes de su uso en cepas de células diana.

El medio LB se utiliza para cultivos durante la noche, mientras que el medio mínimo M9 (1x sales M9, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0.1 mM, glucosa al 0.4 %, casaminoácidos al 0.05 % y
25 tiamina al 0.05 %) para los cultivos de caracterización. La ampicilina y la kanamicina se utilizan como antibióticos a una concentración de 50 µg/ml.

Los cultivos de GFP y RFP se analizan en un fluorómetro (Perkin Elmer Victor X5) para medir la absorbancia (filtro de absorbancia de 600 nm), la fluorescencia verde (filtro de
30 excitación de 485/14 nm, el filtro de emisión de 535/25 nm)

y la fluorescencia roja (filtro de excitación de 570/8 nm, filtro de emisión de 610/10 nm). Los valores medios de fondo de absorbancia y fluorescencia, correspondientes al medio mínimo M9, se restan para corregir las lecturas. La fluorescencia normalizada se calcula como la proporción de fluorescencia y absorbancia. A continuación, se resta el valor medio de la fluorescencia normalizada correspondiente a las células transformadas con plásmidos de control para obtener una estimación final de la expresión.

Estas compuertas son sistemas modelo y pueden modificarse aún más para activarse con cualquier entrada, incluidos otros productos químicos, contacto celular, pH y luz.

B. Generación de SADA con puertas AND/OR

Los SADA se generan de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo 13.

C. Las puertas lógicas son funcionales en SADA

Como se describió anteriormente, hrpR/hrpS requiere ambas entradas para generar el producto de manera eficaz creando una puerta lógica AND. Los SADA de *E. coli* están sujetos a cuatro condiciones: 1. Sin IPTG/sin calor, 2. IPTG/sin calor, 3. Sin IPTG/calor, y 4. IPTG/calor. Solo la condición 4, en la que están presentes tanto el calor como el IPTG, provocará la expresión de hrpR/hrpS, lo que conduce a la expresión de GFP.

La expresión de GFP puede modularse potencialmente cambiando la concentración de IPTG y la duración de la exposición al estímulo. Se cargan SADA de *E. coli* expuestos a diferentes condiciones en una placa de 96 pocillos y se usa un lector de placas fluorescentes para cuantificar la expresión de GFP en relación con diferentes condiciones. Los experimentos de doble enmascaramiento confirman que la presencia de GFP

indica la presencia tanto de IPTG como de calor, formando la base de un sistema que responde a los estímulos.

Ejemplo 40. SADA de eliminación de metales pesados de *E. coli* y extremófilos

Los metales pesados representan un riesgo para el medio ambiente y la salud y, a menudo, son difíciles de eliminar de forma eficaz y no invasiva. Las bacterias pueden diseñarse para eliminar metales pesados como el mercurio, utilizando la expresión de proteínas como MerR, que es una proteína metalorreguladora con alta afinidad y selectividad hacia el mercurio.

A. Síntesis de líneas parentales de E. coli que expresan MerR

Las líneas parentales de *E. coli* se sintetizan utilizando métodos descritos por Bae et al., App Environ Microbiol, 2003. Brevemente, MerR se fusiona con una proteína de nucleación de hielo (INP) para la expresión de la superficie. Se añade una etiqueta de hexahistidina al extremo C-terminal de la proteína de fusión para confirmar la expresión.

Brevemente, la fusión INP-MerR se construye como sigue. El fragmento merR se amplifica por PCR del plásmido pT7KB con los cebadores merR1 (5' CCGGGATCCTATGGAAAACAATTTGGAGA 3') y merR2 (5' CAGCTGCAGCCCTAAGGCATAGCCGAACC 3'). El fragmento amplificado se digiere con BamHI y PstI, se purifica en gel y se subclona en un pUNI digerido de manera similar, que contiene un fragmento INP EcoRI-BamHI insertado en pUC18Not, para generar pUNIM. La construcción resultante permite la expresión de MerR en la superficie de *E. coli*.

Para probar la localización superficial de MerR, se añade una etiqueta de hexahistidina a la parte C-terminal de la fusión INP-MerR. El fragmento merR se vuelve a amplificar con un nuevo cebador inverso, merR3 (5'

ATTCTGCAGCTAATGATGATGGTGGTGGTGATAAGGCATAGCCGAACCTGCCAAGCTT 3'), que codifica seis histidinas en el extremo C-terminal. Se prepara el plásmido resultante, pUNIMH, que codifica la fusión INP-MerR-H6.

5 La eliminación de mercurio se mide haciendo crecer los clones bacterianos junto con *E. coli* no transformada como control en caldo LB en presencia de HgCl₂ en concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 120, 140 y 160 µM. La absorbancia se mide a 600 nm para cada clon bacteriano después de 16 y 120 horas de incubación para determinar el crecimiento y su resistencia relativa al mercurio.

B. Síntesis y purificación de SADA de E. coli

10 Los SADA se generan de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 12 y se purifican de acuerdo con los métodos del Ejemplo 13.

C. Eliminación de mercurio por SADA de E. coli

15 Los SADA de *E. coli* se incuban durante 16 y 120 horas en caldo LB que contiene HgCl₂ a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 120, 140 y 160 µM. Los niveles residuales de mercurio se analizan utilizando ensayos diseñados para detectar mercurio a niveles extremadamente bajos (por ejemplo, tira quelante diseñada por Brummer et al., Bioorg. Med. Chem., 2001)

20 **Ejemplo 41. Captación de lactosa y metabolismo mediante SADA de *E. coli***

25 La captación de lactosa en *E. coli* se produce a través de la proteína beta-galactósido permeasa unida a la membrana, que permite el transporte de lactosa y otros beta-galactósidos al interior de la célula. El transporte de la molécula de azúcar está acompañado por el cotransporte de un protón, lo que permite analizar la absorción utilizando colorantes sensibles al pH.

30

A. Síntesis de líneas parentales de E. coli que expresan beta-galactosidasa permeasa

Las líneas parentales de *E. coli* se sintetizan utilizando un caldo que contiene solo lactosa como fuente de
5 azúcar. *E. coli* contiene el sistema de operón lac para la absorción y utilización de lactosa como fuente de azúcar en ausencia de azúcares preferidos. La eliminación de los azúcares preferidos induce la expresión de las proteínas implicadas en la captación y metabolismo de la lactosa. Dado
10 que la captación se realiza a través de un transportador unido a la membrana, la inducción de este sistema es necesaria para aumentar la expresión del transportador en la línea parental, lo que determina en parte la expresión en SADA. Además, los plásmidos que contienen el sistema del
15 operón lac se introducen en SADA de *E. coli* para la expresión del transportador.

B. Captación de lactosa por SADA de E. coli

Los SADA de *E. coli* se sintetizan y purifican como se describe en los Ejemplos 12 y 13. La captación de lactosa
20 por SADA de *E. coli* se mide usando un ensayo sensible al pH. Como describen Prabhala et al., FEBS Letters, 2014, el colorante piranina sensible al pH se usa para medir la captación de lactosa. Brevemente, los SADA de *E. coli* se sedimentan y se lavan al menos tres veces con una solución
25 de Krebs no tamponada que contiene NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 0.8 mM, piranina 0.3 mM y concentraciones variables de lactosa (1 mM-5 mM), y se resuspenden. El pH de la suspensión se ajusta cuidadosamente a 6.5 mientras se burbujea nitrógeno a través de la suspensión
30 durante 5 min y se añaden 30 ml de parafina líquida por encima de la suspensión celular para evitar cambios en el pH como resultado de la disolución del dióxido de carbono. La suspensión celular se transfiere directamente a las placas

de ensayo para las mediciones de fluorescencia (usando un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 455 nm y una longitud de onda de emisión de 509 nm). Los experimentos de control se realizan usando células de E. coli transformadas vacías como controles negativos y líneas parentales como controles positivos.

C. SADA de E. coli que convierten la lactosa en glucosa y galactosa

En ausencia de glucosa, E. coli usa el operón lac del operón bacteriano para usar lactosa como fuente de azúcar. Los operones bacterianos son transcritos policistrónicos que pueden producir múltiples proteínas a partir de un transcrito de ARNm, que son lacZ, lacY y lacA en el caso del operón lac. Los productos génicos de lacZ, lacY y lacA son beta-galactosidasa, que escinde la lactosa en glucosa y galactosa, beta-galactósido permeasa, que permite el transporte de lactosa al interior de la célula, y galactósido acetiltransferasa, que es una enzima que transfiere un grupo acetilo de acetil-CoA a galactósidos, glucósidos y lactósidos respectivamente. La conversión de lactosa en glucosa y galactosa está mediada por la enzima beta-galactosidasa, la función de esta enzima puede medirse directamente usando ensayos de actividad enzimática.

D. Síntesis y purificación de SADA de E. coli

Los SADA de E. coli se sintetizan y purifican como se describe en los Ejemplos 12 y 13. La captación de lactosa se evalúa en SADA de E. Coli en ausencia de glucosa.

E. Conversión de lactosa en glucosa y galactosa por SADA de E. coli

Para evaluar la actividad de la enzima beta-galactósido permeasa, se recogen SADA de E. coli y se lisan primero usando un tampón de lisis con inhibidores de proteasa para

prevenir la degradación de proteínas, por ejemplo, como se describe en el protocolo EMBL.

La actividad de esta enzima se mide usando un kit disponible comercialmente de ThermoFisher (n.º de catálogo K145501) usando las instrucciones del fabricante. Brevemente, la beta-galactosidasa cataliza la hidrólisis de los β -galactósidos como el orto-nitrofenil-D-galactopiranosido (ONPG). La hidrólisis de ONPG al anión ONP produce un color amarillo brillante. La actividad de la β -galactosidasa de la solución se cuantifica usando un espectrofotómetro o un lector de microplacas para determinar la cantidad de sustrato convertido a 420 nm.

Las líneas parentales de *E. coli* se utilizan como control positivo. La capacidad de los SADA de *E. coli* para descomponer la lactosa estará determinada por el índice de conversión de lactosa (L), donde $L = (\text{actividad enzimática en SADA de } E. coli) / (\text{actividad enzimática en la línea parental}) \times 100$

Ejemplo 42. SADA de *E. coli* que expresa PETasa para la degradación de plástico

Ideonella sakaiensis es una bacteria aislada del exterior de una instalación de reciclaje de botellas que puede descomponer y metabolizar un plástico común, poli(tereftalato de etileno) o PET (Yoshida et al., Science, 2016). Secreta la enzima PETasa para descomponer el polímero en monómero. Los SADA de *E. Coli* que expresan PETasa de *I. sakaiensis* son capaces de degradar el plástico PET ampliamente utilizado (~ 3500 millones de libras de botellas de PET por sí solas terminan en vertederos en los EE.UU. anualmente).

A. Transformación de E. coli para expresar PETasa

Las líneas parentales de SADA de *E. coli* que sintetizan PETasa se sintetizan usando el protocolo descrito por Han et

al., Nat. Comun., 2017. Brevemente, la PETasa de Ideonella sakaiensis (número de registro de GenBank: GAP38373.1) sin los 29 aminoácidos en N-terminal se clona y se liga al vector pET32a comercial. El plásmido pET32a-PETasa, ya sea de tipo silvestre o variantes, se transforma en células de E. coli BL21trxB (DE3) que se cultivan en medio LB a 37 °C hasta una DO600 de ~ 0.8 y luego se induce con isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.6 mM a 16 °C durante 24 h. Las líneas parentales se incuban con películas de PET (descritas a continuación en c) para confirmar la actividad de PETasa.

B. Síntesis y purificación de SADA de E. coli

Los SADA de E. coli se sintetizan y purifican como se describe en los Ejemplos 12 y 13. La captación de lactosa se evalúa en SADA de E. Coli en ausencia de glucosa.

C. Utilización de PETasa que expresa SADA de E. coli para degradar PET

Ideonella sakaiensis 201-F6 se obtiene de BCRC y se cultiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esto sirve como control positivo para medir la actividad de E. coli que expresa PETasa.

La capacidad para degradar la PET se mide utilizando el protocolo descrito por Yoshida et al., Science, 2016. Brevemente, las muestras cultivadas de SADA de I. sakaiensis y E. coli se suspenden en tampón fosfato 10 mM (a pH 7.0) con película fina de PET de baja cristalinidad (película de PET) (aproximadamente 60 mg, 20 × 15 × 0.2 mm, Pm: 45 × 10³, Pm/Mn: 1.9, Tg: 77°C, Tm: 255°C, cristalinidad: 1.9 %, densidad: 1.3378 g/cm³). La película de PET se esteriliza en etanol al 70 % y se seca en aire estéril antes de colocarla en el tubo de ensayo. El tubo se agita a 300 golpes/min a 30 °C.

La cuantificación de la generación de CO₂ se utiliza como medida de la degradación del PET. El CO₂ generado se

atrapa en Ascarite y se mide el peso para calcular el CO₂ absorbido. Los materiales similares a las biopelículas y las películas de PET tratadas se separan del medio para determinar el peso de carbono de la película degradada. La tasa de conversión de PET a CO₂ (R) se calcula de la siguiente manera.

$$R \% = \frac{CO_2 (PET+) \times CO_2 (PET-) \times 100}{\text{Peso de carbono de la película degradada}}$$

donde CO₂ (PET+) y CO₂ (PET-) indican el peso de carbono del CO₂ generado cultivado en presencia y ausencia de PET, respectivamente.

La eficacia de degradación plástica de SADA de E. coli se mide utilizando el índice de PETasa (Y), que se calcula de la siguiente manera:

$$Y = R (\text{SADA de E. coli}) / R (\text{I. sakaiensis})$$

en donde R indica la tasa de conversión mostrada anteriormente.

El SADA se puede optimizar aún más para expresar enzimas PETasa mutadas que han demostrado tener una mayor actividad y aumentar la gama de plásticos degradados, como describen Austin et al., PNAS, 2018.

Ejemplo 43. Secreción de ARN mediante un sistema de secreción de T4

Se ha demostrado que las T4SS son capaces de secretar ADN, pero aún no se ha demostrado que las T4SS sean capaces de secretar ARN. Este ejemplo describe la secreción de ARN a través del acoplamiento de una proteína de unión a ARN al ARN.

A. Síntesis de agrobacterias con el sistema de secreción de T4 secretor de ARN

Las secuencias de Cas9 optimizado para S. cerevisiae (de Generoso et al, J. Microbiol. Meth., 2016) y p19 de

tombusvirus (Uniprot Q66104) se fusionan al N-terminal de VirE2 y VirF bajo el promotor virF. También se coloca una secuencia de ARNgu o ARNip en esta secuencia bajo el control del promotor virF. La secuencia de ARNgu contra ILV1 se describe en Generoso et al, J. Microbiol. Meth., 2016. El protocolo es como se describe en Vergunst et al, PNAS, 2005 y Vergunst et al, Science, 2000 con algunas modificaciones. Brevemente, los plásmidos se sintetizan comercialmente y se electroporan en sistemas T4SS que contienen Agrobacterium y agrobacterium sin sistemas T4SS. A continuación, la agrobacteria se cultiva en placas LB y luego se hace crecer de acuerdo con protocolos estándar. La presencia de la proteína de fusión se verifica mediante análisis por transferencia de Western. Además, la secuencia de ARNgu o ARNip se verifica mediante el ensayo Quantigene después del aislamiento de ARN con kits comerciales de aislamiento de ARN pequeños de Thermo Fisher.

B. Demostración de la administración de T4SS de ARN a la levadura

El protocolo para la administración de T4SS a la levadura se describe en Schrammeijer et al., Nucl. Acids Res., 2003. Brevemente, las cepas de agrobacterium se cultivan durante la noche en medio mínimo con antibiótico, se recolectan y diluyen en medio de inducción y luego se cultivan durante 5 h antes de su uso. Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivan durante la noche en medio estándar, se diluyen a 1:10 y se vuelven a cultivar durante otras 5 h. Los cultivos de la agrobacteria y la levadura se mezclan juntos a 1:1 y se hacen crecer en filtros de nitrato de celulosa. Después de 6 días de cocultivo, la mezcla se analiza colocándola en medio de levadura con cefotaxima y las colonias de levadura se cultivan y analizan mediante ensayos Quantigene para determinar la presencia del ARN

administrado después del aislamiento del ARN con kits comerciales de aislamiento de ARN pequeños de Thermo Fisher.

C. Demostración de edición de ADN en levadura mediada por T4SS

5 Siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, las colonias de levadura se cultivan en medio sin isoleucina y las colonias se miden para aquellas cocultivadas con *Agrobacterium* con y sin T4SS y con y sin el casete de ARN_g/Cas9.

10 **OTRAS REALIZACIONES**

Algunas realizaciones de la invención están dentro de los siguientes párrafos numerados.

1. Un sistema activo dinámico acromosómico (SADA) altamente activo aislado.

15 2. El SADA altamente activo del párrafo 1, que comprende una concentración de ATP sintasa de al menos: 1 por 10000 nm², 1 por 5000 nm², 1 por 3500 nm², 1 por 1000 nm².

20 3. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el SADA comprende ATP sintasa, que opcionalmente carece de un dominio regulador, tal como que carece de un dominio épsilon.

4. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que además comprende una bomba de protones fotovoltáica.

25 5. El SADA altamente activo del párrafo 4, en donde la bomba de protones fotovoltáica es una proteorrodopsina.

30 6. El SADA altamente activo del párrafo 5, en donde la proteorrodopsina comprende la secuencia de aminoácidos de la proteorrodopsina del clado bacteriano marino no cultivado SAR86, número de registro de GenBank: AAS73014.1.

7. El SADA altamente activo del párrafo 4, en donde la bomba de protones fotovoltáica es una rodopsina de *Gloeobacter*.

8. El SADA altamente activo del párrafo 4, en donde la bomba de protones fotovoltáica es una bacteriorrodopsina, deltarrodopsina o halorrodopsina de *Halobium salinarum*, *Natronomonas pharaonis*, *Exiguobacterium sibiricum*,
5 *Haloterrigena turkmenica* o *Haloarcula marismortui*.

9. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que además comprende retinal.

10. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que además comprende una proteína de
10 síntesis de retinal (o un sistema de proteínas) o un ácido nucleico que codifica al mismo.

11. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores que además comprende una o más proteínas de la vía de la glucólisis.

15 12. El SADA altamente activo del párrafo 11 en donde la proteína de la vía de la glucólisis es una fosfofructoquinasa (Pfk-A).

20 13. El SADA altamente activo del párrafo 12, en donde la Pfk-A comprende la secuencia de aminoácidos de número de registro de UniProt P0A796.

14. El SADA altamente activo del párrafo 12 en donde la proteína de la vía de la glucólisis es triosafosfato isomerasa (tpi).

25 15. El SADA altamente activo del párrafo 14, en donde la tpi comprende la secuencia de aminoácidos de número de registro de UniProt P0A858.

16. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que carece de una o más proteínas metabólicamente no esenciales.

30 17. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que carece de una o más de una ribonucleasa, una proteasa o una combinación de las mismas y, en realizaciones particulares, carece de una o más

endorribonucleasas (tales como ribonucleasa A, ribonucleasa h, ribonucleasa III, ribonucleasa L, ribonucleasa PhyM) o exorribonucleasas (tales como ribonucleasa R, ribonucleasa PH, ribonucleasa D); o serina, cisteína, treonina, aspártico, glutámico y metaloproteasas; o una combinación de cualquiera de los anteriores.

18. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores que además comprende un sistema de secreción bacteriano.

19. El SADA altamente activo del párrafo 18, en donde el sistema de secreción bacteriano es capaz de exportar una carga a través de la membrana externa del SADA en una célula diana, tal como una célula animal, fúngica, bacteriana o vegetal.

20. El SADA altamente activo del párrafo 18 o 19, en donde el sistema de secreción bacteriano es T3SS, T4SS o T6SS.

21. El SADA altamente activo del párrafo 18 o 19, en donde el sistema de secreción bacteriano es un T3/4SS.

22. El SADA altamente activo del párrafo 21, en donde el T3/4SS tiene una función efectora modificada, por ejemplo, un efector seleccionado entre SopD2, SopE, Bop, Map, Tir, EspB, EspF, NleC, NleH2 o NleE2.

23. El SADA altamente activo del párrafo 22, en donde la función efectora modificada es para el direccionamiento intracelular tal como la translocación al núcleo, golgi, mitocondrias, actina, microvellosidades, ZO-1, microtúbulos o citoplasma.

24. El SADA altamente activo del párrafo 22, en donde la función efectora modificada es el direccionamiento nuclear basado en NleE2 que proviene de *E. coli*.

25. El SADA altamente activo del párrafo 22, en donde la función efectora modificada es para la formación de

filopodios, ruptura de uniones estrechas, borramiento de microvellosidades o inactivación de SGLT-1.

26. El SADA altamente activo del párrafo 18 o 19, en donde el sistema de secreción bacteriano es un T6SS.

5 27. El SADA altamente activo del párrafo 26, en donde el T6SS, en su hospedador natural, se dirige a una bacteria y contiene un efector que destruye a la bacteria.

10 28. El SADA altamente activo del párrafo 26 o del párrafo 27, en donde el T6SS proviene de *P. putida* K1-T6SS y, opcionalmente, en donde el efector comprende la secuencia de aminoácidos de Tke2 (registro AUZ59427.1).

29. El SADA altamente activo del párrafo 26, en donde el T6SS, en su hospedador natural, se dirige a un hongo y contiene un efector que destruye al hongo.

15 30. El SADA altamente activo del párrafo 29, en donde el T6SS proviene de *Serratia marcescens* y los efectores comprenden las secuencias de aminoácido de: Tfe1 (Genbank: SMDB11_RS05530) o Tfe2 (Genbank: SMDB11_RS05390).

20 31. El SADA altamente activo del párrafo 18, en donde el sistema de secreción bacteriano es capaz de exportar una carga por vía extracelular.

32. El SADA altamente activo del párrafo 31, en donde el sistema de secreción bacteriano es T1SS, T2SS, T5SS, T7SS, Sec o Tat.

25 33. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que comprende un transportador en la membrana.

30 34. El SADA altamente activo del párrafo 33, en donde el transportador es específico para glucosa, sodio, potasio, un ión metálico, un soluto aniónico, un soluto catiónico o agua.

35. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la membrana comprende un agente de direccionamiento.

5 36. El SADA altamente activo del párrafo 35, en donde el agente de direccionamiento es un nanocuerpo, tal como un nanocuerpo dirigido a un antígeno tumoral, tal como HER2, PSMA o VEGF-R.

10 37. El SADA altamente activo del párrafo 35, en donde el agente de direccionamiento es una proteína de unión a carbohidrato, tal como una lectina, por ejemplo, lectina de unión a manosa (MBL).

15 38. El SADA altamente activo del párrafo 35 en donde el agente de direccionamiento es un péptido de direccionamiento al tumor, tal como un motivo RGD o péptido CendR.

39. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la membrana del SADA comprende una enzima.

20 40. El SADA altamente activo del párrafo 39, en donde la enzima es una proteasa, oxidorreductasa, o una combinación de las mismas.

25 41. El SADA altamente activo del párrafo 39 o del párrafo 40, en donde la enzima se conjuga químicamente a la membrana SADA, opcionalmente mediante un enlazador a la membrana exterior.

30 42. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que comprende una carga dispersa en el volumen interior del SADA, en donde la carga comprende un ácido nucleico, ribosoma, péptido, hormona, aminoácido, carbohidrato, lípido, proteína, partícula orgánica, partícula inorgánica, molécula pequeña o una combinación de las mismas.

43. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el SADA comprende un sistema de secreción bacteriano y una carga, en donde opcionalmente la carga comprende un resto que dirige la exportación por el sistema de secreción bacteriano, por ejemplo, en algunas realizaciones, el resto es Pho/D, Tat, o un péptido señal sintético.

44. El SADA del párrafo 42 o 43, en donde la carga se modifica para mejorar la estabilidad en comparación con una versión sin modificar de la carga.

45. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos 42-44, en donde la carga comprende una proteína.

46. El SADA altamente activo del párrafo 45, en donde la proteína es una hormona, por ejemplo, paracrina, endocrina, autocrina.

47. El SADA altamente activo del párrafo 60 o 61, en donde la proteína tiene una estabilidad mayor de aproximadamente: 1.01, 1.1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000 en citoplasma celular u otros entornos.

48. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos 42-44, en donde la carga comprende una hormona vegetal, tal como ácido abscísico, auxina, citoquinina, etileno, giberelina o una combinación de las mismas.

49. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos 42-44, en donde la carga es un inmunomodulador, tal como un inmunoestimulador, inhibidores del punto de control (por ejemplo, de PD-1, PD-L1, CTLA-4), supresores, superantígenos, moléculas pequeñas (ciclosporina A, dinucleótidos cíclicos (CDN) o agonista STING (por ejemplo, MK-1454)).

50. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos 42-44, en donde la carga comprende un ARN, tal como

un ARN circular, ARNm, ARNip, ARNhc, ASO, ARNt o una combinación de los mismos.

51. El SADA altamente activo del párrafo 50, en donde la carga comprende un ARNm codificante de proteína.

5 52. El SADA altamente activo del párrafo 51, en donde el ARNm que codifica la proteína codifica una enzima (por ejemplo, una enzima que imparte actividad enzimática hepática, como ARNm de PBGD humano (hPBGD)) o un antígeno, por ejemplo, que provoca una respuesta inmune (como provocar
10 un título potente y duradero de anticuerpos neutralizantes), tales como ARNm que codifica las glucoproteínas gB y/o complejo pentamérico (PC) de CMV).

53. El SADA altamente activo del párrafo 50, en donde l ARN es un ARN no codificante pequeño, tal como ARNhc, ASO,
15 ARNt o una combinación de los mismos.

54. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos 50-53, en donde el ARN se estabiliza, por ejemplo, con una estructura de bucle escalonado adjunta, tal como un andamiaje de ARNt.

20 55. El SADA de uno cualquiera de los párrafos 65-70, en donde el ARN tiene una estabilidad mayor de aproximadamente: 1.01, 1.1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, por ejemplo, en plasma de SADA.

56. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el SADA altamente activo no degrada una carga.
25

57. El SADA altamente activo del párrafo 42 o 43, en donde la carga comprende un sistema de edición de genes.

58. El SADA altamente activo del párrafo 58, en donde
30 la carga es ADN, tal como un plásmido, o un ARN circular, en donde opcionalmente el ADN o el ARN circular comprende una secuencia codificante de la proteína.

59. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el SADA es un SADA de dos membranas.

5 60. El SADA altamente activo del párrafo 59, en donde el SADA de dos membranas comprende además un sistema de secreción bacteriano.

61. El SADA altamente activo del párrafo 60, en donde el sistema de secreción bacteriana se selecciona de T3SS, T4SS, T3/4SS o T6SS, opcionalmente en el que T3SS, T4SS, 10 T3/4SS o T6SS tienen un efector atenuado o no funcional que no afecta a la aptitud de una célula diana.

62. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos 59-61, que proviene de una cepa bacteriana parental, en donde la cepa parental se selecciona de una bacteria 15 vegetal, como un comensal de plantas (por ejemplo, *B. Subtilis* o *Pseudomonas putida*) o una bacteria patógena vegetal (por ejemplo, *Xanthomonas* sp. o *Pseudomonas syringae*) o una bacteria humana, como una bacteria comensal de humanos (por ejemplo, *E. coli*, *Staphylococcus* sp., 20 *Bifidobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp. o *Actinomyces* sp.) o una bacteria patógena de humanos (por ejemplo, *Escherichia coli* EHEC, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*) o un extremófilo, incluidos los derivados funcionalizados de cualquiera de los anteriores, por 25 ejemplo, que incluye un casete funcional, como un casete funcional que induce a la bacteria a hacer uno o más de: secretar antimicrobianos, digerir plástico, secretar insecticidas, sobrevivir en entornos extremos, fabricar nanopartículas, integrarse con otros organismos, responder 30 al medio ambiente y crear señales de reportero.

63. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que proviene de una cepa parental

seleccionada de *E. coli*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Anaplasma*, *Helicobacter*, *Serratia*, *Vibrio*, *Salmonella* o *Shigella*.

5 64. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que proviene de una cepa parental diseñada genéticamente o inducida para sobreexpresar ATP sintasa.

10 65. El SADA altamente activo del párrafo 64, en donde el SADA comprende una ATP sintasa heteróloga a la cepa parental.

66. El SADA altamente activo del párrafo 64 o 65, en donde la cepa parental se modifica para expresar una ATP sintasa FoF1 funcional.

15 67. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que se obtiene de una cepa parental cultivada bajo una condición seleccionada de: voltaje aplicado (por ejemplo, 37 mV), concentración de oxígeno no atmosférico (por ejemplo, O₂ al 1-5 %, O₂ al 5-10 %, O₂ al 10-15 %, O₂ al 25-30 %), pH bajo (aproximadamente: 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5) o una combinación de los mismos.

20 68. El SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que proviene de una cepa parental auxótrofa durante al menos 1, 2, 3, 4 o más de: arginina (por ejemplo, inactivación en *argA*, tal como las cepas JW2786-1 y NK5992), inactivación de cisteína en *cysE* (tal como las cepas JW3582-2 y JM15), glutamina por ejemplo, inactivación en *glnA* (tal como las cepas JW3841-1 y M5004), glicina, por ejemplo inactivación en *glyA* (tal como las cepas JW2535-1 y AT2457), Histidina, por ejemplo, la inactivación en *hisB* (tal como las cepas JW2004-1 y SB3930), isoleucina, por ejemplo, inactivación en *ilvA* (tal como las cepas JW3745-2 y AB1255), leucina, por ejemplo, inactivación en *leuB* (tal como las cepas JW5807-2 y CV514), lisina, por ejemplo, la

25

30

inactivación en lysA (tal como las cepas JW2806-1 y KL334), metionina, por ejemplo, inactivación en metA (tal como las cepas JW3973-1 y DL41), fenilalanina, por ejemplo, inactivación en pheA (tal como las cepas JW2580-1 y KA197),
5 prolina, por ejemplo, inactivación en proA (tal como las cepas JW0233-2 y NK5525), Serina, por ejemplo, inactivación en serA (tal como las cepas JW2880-1 y JC158), treonina, por ejemplo, inactivación en thrC (tal como las cepas JW0003-2 y Gif 41), triptófano, por ejemplo, inactivación en trpC
10 (tal como las cepas JW1254-2 y CAG18455), tirosina, por ejemplo, inactivación en tyrA (tal como por ejemplo las cepas JW2581-1 y N3087), Valina/Isoleucina/Leucina, por ejemplo, inactivación en ilvd (tal como las cepas JW5605-1 y CAG18431).

15 69. El SADA altamente activo de cualquiera de los párrafos anteriores que se prepara a partir de una célula bacteriana, en donde la cepa parental se selecciona de una bacteria vegetal, como un comensal de plantas (por ejemplo, *B. Subtilis* o *Pseudomonas putida*) o una bacteria patógena
20 vegetal (por ejemplo, *Xanthomonas* sp. o *Pseudomonas syringae*) o una bacteria humana, como una bacteria comensal de humanos (por ejemplo, *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp. o *Actinomyces* sp.) o una bacteria patógena de humanos (por
25 ejemplo, *Escherichia coli* EHEC, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*) o un extremófilo, incluidos los derivados funcionalizados de cualquiera de los anteriores, por ejemplo, que incluye un casete funcional, como un casete
30 funcional que induce a la bacteria a hacer uno o más de: secretar antimicrobianos, digerir plástico, secretar insecticidas, sobrevivir en entornos extremos, fabricar

nanopartículas, integrarse con otros organismos, responder al medio ambiente y crear señales de reportero.

70. El SADA altamente activo de cualquiera de los párrafos anteriores que comprende una membrana modificada.

5 71. El SADA altamente activo del párrafo 70, en donde la membrana se modifica para que sea menos inmunogénica o inmunoestimuladora en plantas o animales.

10 72. El SADA altamente activo del párrafo 71, que está hecho a partir de una cepa parental, en la que las capacidades inmunoestimuladoras de la cepa parental se reducen o eliminan mediante el tratamiento posterior a la producción con detergentes, enzimas o funcionalizadas con PEG.

15 73. El SADA altamente activo del párrafo 71, que está hecho de una cepa parental y la membrana se modifica a través de la inactivación de las vías de síntesis de LPS en la cepa parental, por ejemplo, mediante inactivación de msbB y/o purI.

20 74. El SADA altamente activo del párrafo 71, que está hecho a partir de una cepa parental que produce partículas deficientes en la pared celular a través de la exposición a condiciones hiperosmóticas.

75. Una composición que comprende el SADA altamente activo de uno cualquiera de los párrafos anteriores.

25 76. Una composición que comprende SADA, en donde al menos aproximadamente: 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 %, o más de los SADA contienen un sistema de secreción bacteriano.

30 77. La composición del párrafo 76, en donde el sistema de secreción bacteriano es uno de T3SS, T4SS, T3/4SS o T6SS.

78. Una composición de SADA, que comprende un T3SS, en donde el SADA comprende una densidad media de T3SS mayor de

1 en aproximadamente: 40000, 35000, 30000, 25000, 19600, 15000, 10000 o 5000 nm².

79. La composición del párrafo 78, en donde el SADA proviene de una cepa parental de *S. typhimurium* o de *E. coli*.

80. Una composición de SADA que comprende un T3SS, en donde el SADA comprende una densidad media de T3SS mayor de 1 en aproximadamente: 300000, 250000, 200000, 150000, 100000, 50000, 20000, 10000, 5000 nm².

81. La composición del párrafo 80, en donde el SADA proviene de una cepa parental de *Agrobacterium tumefaciens*.

82. Una composición de SADA, en donde al menos aproximadamente: 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 % o más de los SADA contienen un sistema de secreción bacteriana, que incluye T3, T4, T3/4SS, T6SS, y opcionalmente incluyen uno o más de: carbohidratos exógenos, sintasas productoras de fosfato, proteínas sensibles a la luz, proteínas de importación, enzimas, carga funcional, efectores específicos de organismo, proteínas de fusión.

83. La composición de uno cualquiera de los párrafos 75-82, en donde el SADA es SADA altamente activo.

84. La composición de uno cualquiera de los párrafos 75-83, que se formula para administración IP, IV, IM, oral, tópica (crema, gel, pomada, parche transdérmico), aerosolizada o nebulizada.

85. La composición de uno cualquiera de los párrafos 75-84, que es una formulación líquida, o una formulación liofilizada.

86. Un método para hacer uno cualquiera de los SADA de los párrafos 1-74, que comprende cultivar una cepa parental bajo condiciones para promover la formación de los SADA y recolectar los SADA, que comprende opcionalmente una etapa

de aislar los SADA de cualquiera de las células de la cepa parental residual u otros contaminantes.

5 87. El método del párrafo 86, que comprende usar una cepa parental auxótrofa simple, doble, triple o cuádruple, comprendiendo adicionalmente dicha cepa parental un plásmido que expresa un ftsZ.

10 88. El método del párrafo 86, que comprende transformar una cepa parental con un sistema de desoxirribonucleasa inducible, tal como el exoI (ID del gen del NCBI: 946529) y sbcD (ID del gen del NCBI: 945049) nucleasas o la nucleasa I-CeuI (por ejemplo, Swissprot: P32761.1).

15 89. El método del párrafo 88, que comprende usar una cepa auxótrofa simple, doble, triple o cuádruple y tener los genes complementarios en el plásmido que codifican las nucleasas inducibles.

20 90. El método del párrafo 86, en donde la cepa parental se cultiva en una condición seleccionada entre: voltaje aplicado (por ejemplo, 37 mV), concentración de oxígeno no atmosférico (por ejemplo, O₂ al 1-5 %, O₂ al 5-10 %, O₂ al 10-15 %, O₂ al 25-30 %), pH bajo (4.5-6.5) o una combinación de los mismos.

25 91. El método del párrafo 86, en donde la cepa parental carece de flagelos y sistemas de secreción no deseados, opcionalmente donde los flagelos y los sistemas de secreción no deseados se eliminan usando recombinación con rojo lambda.

30 92. El método del párrafo 86, en donde los componentes de control de flagelos se escinden del genoma de la cepa parental mediante la inserción de un plásmido que contiene un dominio CRISPR que está dirigido a genes de control de flagelos, tales como flhD y flhC.

93. Un método de preparación de un SADA altamente activo en donde un SADA que comprende un plásmido que

contiene un gen codificante de rodopsina se cultiva en presencia de luz.

5 94. El método del párrafo 93, en donde la rodopsina es proteorrodopsina de bacterias no cultivadas SAR86, que tienen la secuencia de aminoácidos con número de registro de GenBank: AAS73014.1, y además, opcionalmente el cultivo se suplementa con retinal.

10 95. El método del párrafo 93 o 94, en donde la rodopsina es proteorrodopsina y el plásmido contiene además genes que sintetizan retinal (tal plásmido es el plásmido pACYC-RDS de Kim et al., *Microb Cell Fact*, 2012).

15 96. El método de uno cualquiera de los párrafos 86-95, en donde la cepa parental contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un nanocuerpo que luego se expresa en la membrana del SADA.

97. El método de uno cualquiera de los párrafos 86-95, en donde la cepa parental contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más operones del sistema de secreción bacteriana.

20 98. El método de uno cualquiera de los párrafos 86-97, en donde la cepa parental comprende una carga.

25 99. El método de uno cualquiera de los párrafos 86-97, en donde la cepa parental contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un conjunto de genes que sintetiza una carga de molécula pequeña.

100. Un SADA preparado por el método de uno cualquiera de los párrafos 86-99.

30 101. Un método de modulación de un estado de una célula animal, que comprende proporcionar acceso de una cantidad eficaz de un SADA o de una composición de uno cualquiera de los párrafos anteriores a la célula animal.

102. El método del párrafo 101, en donde se proporciona al SADA o composición acceso a la célula animal in vivo, en un animal, como un mamífero, como un ser humano.

5 103. El método del párrafo 102, en donde la célula animal se expone a las bacterias en un animal sano.

10 104. El método del párrafo 103, en donde la célula animal es epitelio pulmonar, una célula inmunitaria, célula cutánea, célula epitelial oral, célula epitelial intestinal, célula epitelial del tracto reproductivo o célula del tracto urinario.

15 105. El método del párrafo 104, en donde la célula animal es una célula epitelial intestinal, tal como una célula epitelial intestinal de un sujeto humano con una enfermedad inflamatoria intestinal, tal como enfermedad de Crohn o colitis.

20 106. El método del párrafo 105, en donde la célula animal es una célula epitelial intestinal de un sujeto con una enfermedad inflamatoria intestinal, y el SADA comprende un sistema de secreción bacteriana y una carga que comprende un agente antiinflamatorio.

107. El método del párrafo 102, en donde la célula animal se expone a las bacterias en una patología.

108. El método del párrafo 102, en donde la célula animal es patógena, tal como un tumor.

25 109. El método del párrafo 102, en donde la célula animal se expone a bacterias en una patología, como una herida, una úlcera, un tumor o un trastorno inflamatorio

30 110. El método de uno cualquiera de los párrafos 102-109, en donde el SADA proviene de una cepa parental comensal animal.

111. El método de uno cualquiera de los párrafos 102-109, en donde el SADA proviene de una cepa parental patógena animal.

112. El método de uno cualquiera del párrafo 102, en donde la célula animal se pone en contacto con una cantidad eficaz de un SADA que comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, en el que la carga se administra a la célula animal.

5 113. El método del párrafo 102, en donde se proporciona acceso a la célula animal a una cantidad eficaz de un SADA que comprende una carga y un sistema de secreción, en el que la carga se secreta por vía extracelular y entra en contacto con la célula animal.

10 114. Un método de modulación de un estado de una célula animal, que comprende proporcionar acceso de una cantidad eficaz de un SADA o de una composición de uno cualquiera de los párrafos 1-85 a una célula bacteriana o fúngica en la proximidad de una célula animal.

15 115. El método del párrafo 114, en donde la célula bacteriana o fúngica es patógena.

116. El método del párrafo 115, en donde se reduce la aptitud de la célula bacteriana o fúngica patógena.

20 117. El método del párrafo 114, en donde la célula bacteriana o fúngica es comensal.

118. El método del párrafo 117, en donde aumenta la aptitud de la célula bacteriana o fúngica comensal.

25 119. El método del párrafo 118, en donde la aptitud aumenta mediante la reducción en la aptitud del número de una bacteria u hongo competente, que puede ser neutra, de comensal o patógena.

30 120. El método del párrafo 114, en donde la célula bacteriana o fúngica se pone en contacto con una cantidad eficaz de SADA que comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, en donde la carga se administra a la célula bacteriana o fúngica.

121. El método de la reivindicación 120, en donde a la célula bacteriana o fúngica se le proporciona acceso a una

cantidad eficaz de SADA que secreta una carga por vía extracelular que se pone en contacto con una célula bacteriana o fúngica.

5 122. El método de uno cualquiera de los párrafos 114-121, en donde el SADA proviene de una cepa parental que es un competidor de la célula bacteriana o fúngica.

123. El método de uno cualquiera de los párrafos 114-121, en donde el SADA proviene de una cepa parental que es una bacteria mutualista de la célula bacteriana o fúngica.

10 124. Un método para modular el estado de una célula de planta o fúngica que comprende proporcionar acceso a una cantidad eficaz de un SADA o composición de uno cualquiera de los párrafos 1-85 a: a) la célula vegetal o fúngica, b) una célula bacteriana o fúngica adyacente en la vecindad de la célula de planta o fúngica, o c) una célula de insecto o nemátodo en la vecindad de la célula vegetal o fúngica.

15 125. El método del párrafo 124, en donde se proporciona al SADA o a la composición acceso a la célula vegetal en la planta, por ejemplo, en una planta de cultivo como cultivos en hileras, que incluyen maíz, trigo, soja y arroz, y cultivos de hortalizas que incluyen solanáceas, como tomates y pimientos; cucurbitáceas, como melones y pepinos; brasicáceas, como coles y brócoli; verduras de hoja verde, como col rizada y lechuga; raíces y tubérculos, como patatas y zanahorias; verduras grandes sin semillas, como frijoles y maíz; y setas.

20 126. El método del párrafo 125, en donde la célula vegetal o fúngica se expone a las bacterias en una planta u hongo sanos.

30 127. El método del párrafo 125, en donde la célula vegetal o fúngica se expone a las bacterias en una patología.

128. El método del párrafo 125, en donde la célula vegetal o fúngica se está dividiendo, como una célula de meristemo, o es patógena, como un tumor.

5 129. El método del párrafo 125, en donde la célula vegetal o fúngica se expone a bacterias en una patología, como una herida, o en donde la célula de planta o fúngica no es parte de un alimento humano.

130. El método de uno cualquiera de los párrafos 124-129, en donde el SADA proviene de una cepa parental comensal.

10 131. El método de uno cualquiera de los párrafos 124-129, en donde el SADA proviene de una cepa parental patógena de planta u hongo.

15 132. El método del párrafo 124, en donde el SADA comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, y la carga se administra a la célula vegetal o fúngica.

20 133. El método de la reivindicación 124, en donde a la célula vegetal o fúngica se le proporciona acceso a una cantidad eficaz de un SADA que comprende un sistema de secreción bacteriana y una carga, en donde el sistema de secreción bacteriana secreta la carga extracelularmente, poniendo en contacto así la célula vegetal o fúngica con la carga.

25 134. El método del párrafo 124, que comprende proporcionar una cantidad eficaz de SADA o acceso a la composición a la célula bacteriana o fúngica adyacente en la vecindad de la célula vegetal o fúngica.

30 135. El método de la reivindicación 134, en donde la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente es patógena, opcionalmente en donde la aptitud de la célula bacteriana o fúngica adyacente patógena se reduce.

136. El método de la reivindicación 134, en donde la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente es comensal,

opcionalmente en donde la aptitud de la célula bacteriana o fúngica adyacente comensal aumenta.

137. El método del párrafo 136, en donde la aptitud aumenta mediante la reducción del número de una bacteria competente u hongo competente, que puede ser neutra, de comensal o patógena.

138. El método del párrafo 134, en donde la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente se pone en contacto con una cantidad eficaz de SADA que comprende un T3/4SS o T6SS y una carga, en donde la carga se administra a la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente.

139. El método del párrafo 134, en donde a la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente se le proporciona acceso a una cantidad eficaz de SADA que comprende un sistema de secreción bacteriana y una carga, donde el sistema de secreción bacteriana secreta la carga por vía extracelular, poniendo en contacto así la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente con la carga.

140. El método de uno cualquiera de los párrafos 134-139, en donde el SADA proviene de una cepa parental que es un competidor de las células bacteriana adyacentes o fúngicas adyacentes.

141. El método de uno cualquiera de los párrafos 134-139, en donde el SADA proviene de una cepa parental que es una bacteria mutualista de la célula bacteriana adyacente o fúngica adyacente.

142. El método del párrafo 124 que comprende proporcionar una cantidad eficaz de SADA o acceso a la composición a una célula de insecto o nemátodo en las proximidades de la planta u hongo.

143. El método del párrafo 142, en donde el insecto o el nemátodo es patógeno.

144. El método del párrafo 142, en donde se reduce la aptitud del insecto o nemátodo patógeno.

5 145. El método del párrafo 144, en donde la aptitud de la célula de insecto o nematodo patógeno se reduce mediante la modulación de simbioses en la célula de insecto o nematodo.

146. El método del párrafo 142, en donde el insecto o el nemátodo es comensal.

10 147. El método del párrafo 146, en donde aumenta la aptitud del insecto o nemátodo comensal.

148. El método del párrafo 147, en donde la aptitud aumenta mediante la reducción del número de una bacteria u hongo competente, que puede ser neutra, de comensal o patógena.

15 149. Un método de eliminar uno o más materiales indeseables de un entorno que comprende poner en contacto el entorno con una cantidad eficaz de un SADA, tal como un SADA o una composición de uno cualquiera de los párrafos 1-84, en donde el SADA comprende una o más moléculas (tales como
20 proteínas, polímeros, nanopartículas, agentes de unión o una combinación de los mismos), que absorben, quelan o degradan los uno o más materiales indeseables.

25 150. El método del párrafo 149, en donde el material indeseable comprende un metal pesado, como mercurio, y el SADA comprende una o más moléculas (como proteínas, polímeros, nanopartículas, agentes aglutinantes o una combinación de los mismos) que se unen a metales pesados, como MerR para mercurio.

30 151. El método del párrafo 149, en donde el material indeseable comprende un plástico, como el PET, y el SADA comprende una o más enzimas que degradan el plástico, como la PETasa.

152. El método del párrafo 149, en donde el material indeseable comprende una o más moléculas orgánicas pequeñas y el SADA comprende una o más enzimas capaces de metabolizar dicha una o más moléculas orgánicas pequeñas.

5 153. Una composición que comprende una bacteria o SADA, en donde la bacteria o SADA comprende un T4SS, un ARN que se une a la carga de la proteína, y una carga de ARN que se une mediante la proteína de unión al ARN y es adecuada para la administración en una célula diana a través de T4SS.

10 154. La composición del párrafo 153, en donde la proteína de unión a ARN es una Cas9 fusionada a VirE2 y VirF, la carga de ARN es un ARN guía y, opcionalmente, en donde la T4SS es el sistema Ti de *Agrobacterium*.

15 155. La composición del párrafo 153, en donde proteína de unión a ARN es p19 de Carnation Italian Ringspot Virus fusionado a VirE2 o VirF, la carga de ARN es un ARNip y, opcionalmente, la T4SS es el sistema Ti de *Agrobacterium*.

20 156. Un método para preparar la composición del párrafo 156, en donde un plásmido que contiene el Cas9 fusionado a VirE2 y VirF y carga de ARN se transfectan en una célula de *Agrobacterium*.

25 157. Un método para administrar ARN a una célula vegetal o animal que comprenden poner en contacto dicha célula vegetal o animal con una bacteria o SADA, donde la bacteria o SADA comprende un T4SS, una carga de proteína de unión a ARN, y una carga de ARN.

30 158. Un método para administrar ARN y una proteína a una célula vegetal o animal que comprenden poner en contacto dicha célula vegetal o animal con una bacteria o SADA, donde la bacteria o SADA comprende un T4SS, una carga de proteína de unión a ARN, y una carga de ARN.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica

la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

5

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5 1. Un método para fabricar una composición que comprende una pluralidad de SADA, estando la composición sustancialmente libre de células bacterianas viables, comprendiendo el método:

10 (a) preparar, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular;

 (b) exponer las bacterias parentales a condiciones que permitan la formación de minicélulas; y

15 (c) separar las minicélulas de las bacterias parentales, produciendo así una composición que comprende una pluralidad de SADA que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido minE.

30 5. El método de la reivindicación 4, en donde las bacterias parentales son *E. coli* y el polipéptido minE es minE de *E. coli*.

6. El método de la reivindicación 4, en donde las bacterias parentales son *Salmonella typhimurium* y el polipéptido minE es minE de *S. typhimurium*.

5 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las bacterias parentales tienen una reducción en el nivel o la actividad de una proteína de inhibición del anillo Z.

10 8. El método de la reivindicación 7, en donde la proteína de inhibición del anillo en Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.

15 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

10. El método de la reivindicación 8, en donde la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minC.

11. El método de la reivindicación 9, en donde la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minD.

20 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde los SADA tienen una reducción en la expresión de al menos dos proteínas de inhibición del anillo Z.

25 13. El método de la reivindicación 12, en donde el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC y un polipéptido minD.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC, un polipéptido minD y un polipéptido minE.

30 15. El método de la reivindicación 1, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

5 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 15 y 16, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido DivIVA.

10 18. El método de la reivindicación 17, en donde las bacterias parentales son *Bacillus subtilis* y el factor de especificidad topológica de división celular es DivIVA de *B. subtilis*.

15 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde la reducción del nivel o la actividad está provocada por una mutación de pérdida de función.

20 20. El método de la reivindicación 19, en donde la mutación con pérdida de función es una delección del operón minCDE o una delección de DivIVA.

20 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM.

25 22. El método de la reivindicación 21, en donde la bacteria parental es *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Aquifex*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Buchnera*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chromobacterium*, *Crocospaera*, *Dechloromonas*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotalea*, *Erwinia*,
30 *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Magnetospirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylococcus*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Nostoc*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Polaromonas*, *Prochlorococcus*,

Pseudomonas, Psychrobacter, Ralstonia, Rubrivivax, Salmonella, Shewanella, Shigella, Sinorhizobium, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Thermotoga, Thermus, Thiobacillus, Trichodesmium, Vibrio, Wigglesworthia, Wolinella, Xanthomonas, Xylella, Yersinia, Bacillus, Clostridium, Deinococcus, Exiguobacterium, Geobacillus, Lactobacillus, Lactobacillus, Moorella, Oceanobacillus, Symbiobacterium, o Thermoanaerobacter y el factor de especificidad topológica de división celular es el minE o DivIVA endógeno de las bacterias parentales.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la composición de la etapa (c) comprende menos de 100 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de células bacterianas viables.

24. El método de la reivindicación 23, en donde la composición de la etapa (c) comprende menos de 10 UFC/ml, menos de 1 UFC/ml o menos de 0.1 UFC/ml de células bacterianas viables.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde el SADA comprende una carga.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde la composición se formula para la administración a un animal.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde la composición se formula para la administración a una planta.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde la composición se formula para la administración a un insecto.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde la composición se formula como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel o una composición gaseosa.

30. Una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

31. La composición de la reivindicación 30, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.2 nM, 1.3 nM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 2 mM o 2.5 mM.

32. Una composición que comprende una pluralidad de SADA altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 3 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

33. La composición de la reivindicación 32, en donde el SADA tiene una concentración inicial de ATP de al menos 4 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM.

34. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 30-33, en donde la concentración de ATP del SADA aumenta en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, al menos un 150 % o al menos un 200 % después de la incubación a 37 °C durante 12 horas.

35. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 30-34, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en un nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular.

36. Una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA no comprenden un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

37. Una composición que comprende una pluralidad de SADA, estando la composición sustancialmente libre de

células bacterianas viables y produciéndose mediante un proceso que comprende:

(a) preparar, proporcionar u obtener una pluralidad de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular;

(b) exponer las bacterias parentales a condiciones que permitan la formación de minicélulas; y

(c) separar las minicélulas de las bacterias parentales, produciendo así una composición que está sustancialmente libre de células bacterianas viables.

38. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 30-37, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

39. La composición de la reivindicación 38, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

40. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 30-37, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido minE.

41. La composición de la reivindicación 40, en donde las bacterias parentales son *E. coli* y el polipéptido minE es minE de *E. coli*.

42. La composición de la reivindicación 42, en donde las bacterias parentales son *Salmonella typhimurium* y el polipéptido minE es minE de *S. typhimurium*.

43. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 37-42, en donde la bacteria parental es *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Aquifex*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*,

Brucella, Buchnera, Burkholderia, Candidatus, Chromobacterium, Crocosphaera, Dechloromonas, Desulfitobacterium, Desulfotalea, Erwinia, Francisella, Fusobacterium, Gloeobacter, Gluconobacter, Helicobacter, Legionella, Magnetospirillum, Mesorhizobium, Methylococcus, Neisseria, Nitrosomonas, Nostoc, Photobacterium, Photorhabdus, Polaromonas, Prochlorococcus, Pseudomonas, Psychrobacter, Ralstonia, Rubrivivax, Salmonella, Shewanella, Shigella, Sinorhizobium, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Thermotoga, Thermus, Thiobacillus, Trichodesmium, Vibrio, Wigglesworthia, Wolinella, Xanthomonas, Xylella, Yersinia, Bacillus, Clostridium, Deinococcus, Exiguobacterium, Geobacillus, Lactobacillus, Lactobacillus, Moorella, Oceanobacillus, Symbiobacterium, o Thermoanaerobacter y el factor de especificidad topológica de división celular es el minE o DivIVA endógeno de las bacterias parentales.

44. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 30-43, en donde el SADA tiene una reducción en un nivel de una proteína de inhibición del anillo Z.

45. La composición de la reivindicación 44, en donde la proteína de inhibición del anillo en Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.

46. La composición de la reivindicación 44, en donde la proteína de inhibición del anillo en Z es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

47. La composición de la reivindicación 44, en donde la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minC.

48. La composición de la reivindicación 44, en donde la proteína de inhibición del anillo Z es un polipéptido minD.

5 49. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 44-48, en donde los SADA tienen una reducción en la expresión de al menos dos proteínas de inhibición del anillo Z.

10 50. La composición de la reivindicación 49, en donde el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC y un polipéptido minD.

51. La composición de la reivindicación 50, en donde el SADA tiene una reducción en la expresión de un polipéptido minC, un polipéptido minD y un polipéptido minE.

15 52. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 35-51, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

20 53. La composición de la reivindicación 52, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

25 54. La composición de la reivindicación 52 o 53, en donde el factor de especificidad topológica de división celular es un polipéptido DivIVA.

55. La composición de la reivindicación 53 o 54, en donde las bacterias parentales son *Bacillus subtilis* y el factor de especificidad topológica de división celular es DivIVA de *B. subtilis*.

30 56. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 35-51, en donde la reducción del nivel o la actividad está provocada por una mutación de pérdida de función.

57. La composición de la reivindicación 56, en donde la mutación de pérdida de función es una delección del gen.

5 58. La composición de la reivindicación 56 o 57, en donde la mutación con pérdida de función es una mutación con pérdida de función inducible y en la que la pérdida de función se induce al exponer la célula madre a una condición inductora.

10 59. La composición de la reivindicación 58, en donde la mutación de pérdida de función inducible es una mutación sensible a la temperatura y en la que la condición inductora es una condición de temperatura.

60. La composición de la reivindicación 59, en donde la célula parental tiene una delección del operón minCDE.

15 61. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-60, en donde el SADA comprende un sistema de transcripción funcional y un sistema de traducción funcional.

62. La composición de la reivindicación 61, en donde el SADA produce una proteína heteróloga.

20 63. La composición de la reivindicación 62, en donde el SADA comprende un plásmido, comprendiendo el plásmido un promotor inducible y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga, y en donde el contacto del SADA con un inductor del promotor inducible en condiciones apropiadas da como resultado la producción de la proteína heteróloga.

25

64. La composición de la reivindicación 63, en donde la producción de la proteína heteróloga aumenta al menos 1.6 veces en un SADA que se ha puesto en contacto con el inductor en relación con un SADA que no se ha puesto en contacto con el inductor.

30

65. La composición de la reivindicación 64, en donde la tasa de producción de la proteína heteróloga alcanza un

nivel diana dentro de las 3 horas posteriores al contacto del SADA con el inductor.

5 66. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 64-65, en donde la proteína heteróloga se produce a una velocidad de al menos 0.1 femtogramos por hora por SADA.

67. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 62-66, en donde la proteína heteróloga se produce durante una duración de al menos 8 horas.

10 68. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-67, en donde la composición comprende menos de 100 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de células bacterianas viables.

15 69. La composición de la reivindicación 68, en donde la composición comprende menos de 10 UFC/ml, menos de 1 UFC/ml, o menos de 0.1 UFC/ml de células bacterianas viables.

70. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-69, en donde el SADA comprende una carga.

20 71. La composición de la reivindicación 70, en donde la carga es un ácido nucleico, un plásmido, un polipéptido, una proteína, una enzima, un aminoácido, una molécula pequeña, un sistema de edición de genes, una hormona, un inmunomodulador, un carbohidrato, un lípido, una partícula orgánica, una partícula inorgánica o un complejo de
25 ribonucleoproteína (RNP).

72. La composición de la reivindicación 71, en donde la carga se encapsula por el SADA.

73. La composición de la reivindicación 71, en donde la carga está anclada a la superficie del SADA.

30 74. La composición de la reivindicación 71, en donde el ácido nucleico es un ADN, un ARN o un plásmido.

75. La composición de la reivindicación 71 o 74, en donde el ácido nucleico codifica una proteína.

76. La composición de la reivindicación 71, en donde la enzima altera un sustrato para producir un producto diana.

77. La composición de la reivindicación 76, en donde el sustrato está presente en el SADA y en donde el producto diana se produce en el SADA.

78. La composición de la reivindicación 76, en donde el sustrato está presente en una célula o entorno diana al que se administra el SADA.

79. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-78, en donde el SADA comprende un sistema de secreción bacteriano heterólogo.

80. La composición de la reivindicación 79, en donde el sistema de secreción bacteriano heterólogo es un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS).

81. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 79-80, en donde la carga comprende un resto que dirige la exportación por el sistema de secreción bacteriano.

82. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-81, en donde el SADA comprende un resto de direccionamiento.

83. La composición de la reivindicación 82, en donde el resto de direccionamiento es un nanocuerpo, una proteína de unión a carbohidratos o un péptido de direccionamiento a tumores.

84. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-83, en donde el SADA tiene un nivel o actividad de proteasa reducido en relación con un SADA producido a partir de una bacteria parental de tipo silvestre.

85. La composición de la reivindicación 84, en donde el SADA se produce a partir de una bacteria parental que se

ha modificado para reducir o eliminar la expresión de al menos una proteasa.

5 86. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-85, en donde el SADA tiene un nivel o actividad de ribonucleasa reducido en relación con un SADA producido a partir de una bacteria parental de tipo silvestre.

10 87. La composición de la reivindicación 86, en donde el SADA se produce a partir de una bacteria parental que se ha modificado para reducir o eliminar la expresión de al menos una ribonucleasa.

88. La composición de la reivindicación 86 u 87, en donde la ribonucleasa es una endorribonucleasa o una exorribonucleasa.

15 89. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-88, en donde el SADA se ha modificado para tener un lipopolisacárido (LPS) reducido.

20 90. La composición de la reivindicación 60, en donde el SADA se produce a partir de bacterias parentales que se han modificado para tener LPS reducido.

91. La composición de la reivindicación 89, en donde la modificación es una mutación en miristoiltransferasa de biosíntesis de lípido A (msbB).

25 92. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-91, en donde el SADA proviene de bacterias parentales que son un patógeno de mamíferos o una bacteria comensal de mamíferos.

30 93. La composición de la reivindicación 92, en donde la bacteria comensal de mamíferos es una especie de *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* o *Actinomyces*, o la bacteria patógena de mamíferos es *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Salmonella*

typhimurium, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* o *Helicobacter pylori*.

94. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-91, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que un patógeno de planta o una bacteria comensal de planta.

95. La composición de la reivindicación 94, en donde la bacteria comensal de la planta es *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas putida* o la bacteria patógena de la planta es una especie de *Xanthomonas* o *Pseudomonas syringae*.

96. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-95, en donde el SADA proviene de bacterias parentales auxótrofas.

97. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-96, en donde los SADA se liofilizan y reconstituyen, y en donde los SADA reconstituidos tienen una concentración de ATP que es al menos el 95 % de la concentración de ATP de un SADA que no se ha liofilizado.

98. La composición de la reivindicación 97, en donde los SADA reconstituidos tienen una concentración de ATP que es al menos igual a la concentración de ATP de un SADA que no se ha liofilizado.

99. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-98, en donde la composición se formula para la administración a un animal.

100. La composición de la reivindicación 99, en donde la composición se formula para administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, oral, tópica, en aerosol o nebulizada.

101. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-98, en donde la composición se formula para la administración a una planta.

102. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-97, en donde la composición se formula para la administración a un insecto.

5 103. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 99-102, en donde la composición se formula como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel o una composición gaseosa.

104. Un método para administrar un SADA altamente activo a una célula diana, comprendiendo el método:

10 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

15 (B) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

105. Un método para administrar un SADA a una célula diana, comprendiendo el método:

20 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

25 (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

106. El método de la reivindicación 104 o 105, en donde la célula diana es una célula animal.

30 107. El método de la reivindicación 104 o 105, en donde la célula diana es una célula vegetal.

108. El método de la reivindicación 104 o 105, en donde la célula diana es una célula de insecto.

109. Un método para administrar una carga a una célula diana, comprendiendo el método:

- 5 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM, los SADA comprenden una carga y la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y
- 10 (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

110. Un método para administrar una carga a una célula diana, comprendiendo el método:

- 15 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular el SADA comprende una carga y la composición está sustancialmente libre de
- 20 células bacterianas viables; y
- (b) poner en contacto la célula diana con la composición de la etapa (a).

111. El método de la reivindicación 109 o 110, en donde la célula diana es una célula animal.

25 112. El método de la reivindicación 109 o 110, en donde la célula diana es una célula vegetal.

113. El método de la reivindicación 109 o 110, en donde la célula diana es una célula de insecto.

30 114. Un método para modular un estado de una célula animal, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una

concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

5 (b) poner en contacto la célula animal con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula el estado de la célula animal.

115. Un método para modular un estado de una célula vegetal, comprendiendo el método:

10 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

15 (b) poner en contacto la célula vegetal con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula el estado de la célula vegetal.

116. Un método para modular un estado de una célula de insecto, comprendiendo el método:

20 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

25 (b) poner en contacto la célula de insecto con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula el estado de la célula de insecto.

30 117. Un método para modular un estado de una célula animal, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad

de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

5 (b) poner en contacto la célula animal con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula el estado de la célula animal.

118. Un método para modular un estado de una célula vegetal, comprendiendo el método:

10 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

15 (b) poner en contacto la célula vegetal con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula el estado de la célula vegetal.

119. Un método para modular un estado de una célula de insecto, comprendiendo el método:

20 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

25 (b) poner en contacto la célula de insecto con la composición de la etapa (a), mediante lo cual se modula el estado de la célula de insecto.

30 120. Un método para tratar a un animal que lo necesita, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos

(SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

5 (b) poner en contacto al animal con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así al animal.

121. Un método para tratar a un animal que lo necesita, comprendiendo el método:

10 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

15 (b) poner en contacto al animal con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así al animal.

122. El método de la reivindicación 120 o 121, en donde el animal tiene un cáncer.

20 123. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 120-122, en donde el SADA lleva una carga de quimioterapia.

124. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 120-122, en donde el SADA lleva una carga de inmunoterapia.

25 125. Un método para tratar a una planta que lo necesita, comprendiendo el método:

30 (a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA) altamente activos, en donde los SADA tienen una concentración inicial de ATP de al menos 1.25 mM y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

(b) poner en contacto a la planta o a una plaga de la misma con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así a la planta.

126. Un método para tratar a una planta que lo necesita, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA provienen de bacterias parentales que tienen una reducción en el nivel o actividad de un factor de especificidad topológica de división celular y en donde la composición está sustancialmente libre de células bacterianas viables; y

(b) poner en contacto a la planta o a una plaga de la misma con una cantidad eficaz de la composición de la etapa (a), tratando así a la planta.

127. Una composición que comprende una pluralidad de SADA, en donde los SADA comprenden una enzima y en donde la enzima altera un sustrato para producir un producto diana.

128. La composición de la reivindicación 127, en donde el sustrato está presente en el SADA y en donde el producto diana se produce en el SADA.

129. La composición de la reivindicación 127 o 128, en donde el sustrato está presente en una célula o entorno diana al que se administra el SADA.

130. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 127-129, en donde la enzima es diadenilato ciclasa A, el sustrato es ATP y el producto diana es di-AMP cíclico.

RESUMEN

La invención proporciona sistemas activos dinámicos acromosómicos (SADA), incluyendo SADA altamente activos.

5 Estos SADA proporcionados por la invención se pueden obtener mediante una variedad de medios. Se proporcionan diversos métodos de preparación asociados y que usan estos
SADA.

10

15

20

25

30