

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 729**

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2008 PCT/EP2008/050352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08084115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2008 E 08701465 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2115146**

54 Título: **Promotores de Lactococcus y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.01.2007 EP 07447001
14.11.2007 EP 07120653

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2017

73 Titular/es:

INTREXON ACTOBIOTICS NV (100.0%)
Technologiepark 4
9052 Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

STEIDLER, LOTHAR;
VANDEBROUCKE, KLAAS y
NEIRYNCK, SABINE

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 595 729 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Promotores de *Lactococcus* y usos de los mismos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se encuentra en el campo de la biología molecular, y se refiere a ingeniería recombinante y expresión de proteínas. Más en particular, la invención se refiere a ácidos nucleicos para la expresión recombinante de proteínas que comprenden secuencias obtenidas a partir de *Lactococcus* y útiles como promotores. La invención se refiere adicionalmente a vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células huésped transformadas con los mismos. La invención también incluye el uso de células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos o vectores para expresar proteínas heterólogas u homólogas, y también para la administración, especialmente administración terapéutica, de dichas proteínas a sujetos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las bacterias lácticas son cada vez más importantes como huéspedes para la expresión recombinante de polipéptidos heterólogos *in vitro* (por ejemplo, documento US 5.559.007), así como para la expresión *in vivo* o *in situ* y la administración de antígenos y/o polipéptidos terapéuticamente relevantes (por ejemplo, documento WO 97/14806).

Las bacterias de ácido láctico, y en particular *Lactococcus*, se consideran como microorganismos GRAS (es decir, considerado como generalmente seguros) y, por lo tanto, pueden administrarse de forma relativamente fácil a seres humanos y animales.

Sin embargo, lograr un fuerte nivel de expresión heteróloga en bacterias de ácido láctico a menudo requiere la introducción de promotores y otras secuencias que sean exógenas a estas bacterias (por ejemplo, véase Wells y col., 1993a) y, por lo tanto, puede comprometer la percepción GRAS de las mismas.

Por consiguiente, existe la necesidad de proporcionar promotores adicionales que se obtengan de bacterias de ácido láctico, más preferiblemente de *Lactococcus*, y se pueden utilizar favorablemente para la expresión de proteínas, preferiblemente la expresión de proteínas heterólogas, en las mismas.

El documento WO 02/090551 describe un *L. lactis* genéticamente modificado en el que el gen hLL10 fusionado a la secuencia de secreción de *usp45* se expresa bajo el control del promotor *thyA* y el uso del mismo en el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

También son necesarios tales promotores que puedan conseguir altos niveles de expresión con el fin de obtener cantidades suficientes de proteínas así expresadas en entornos industriales y/o terapéuticos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los aspectos de la presente invención abordan al menos algunas, por ejemplo, una o más, de las necesidades que se han analizado anteriormente de la técnica.

En particular, los presentes inventores reconocieron ácidos nucleicos y secuencias de ácido nucleico derivadas de *Lactococcus* que pueden usarse ventajosamente como promotores adicionales para la expresión recombinante, tal como, preferiblemente, la expresión de polipéptidos, en células huésped, preferiblemente en bacterias, y más preferiblemente en *Lactococcus*.

Más en particular, los inventores expusieron y tuvieron éxito para identificar ácidos nucleicos y secuencias de ácidos nucleicos a partir de *Lactococcus* que pueden funcionar como promotores fuertes, es decir, los que alcanzan un alto nivel de expresión, para la expresión recombinante, tal como, preferiblemente, la expresión de polipéptidos, en células huésped, preferiblemente en bacterias, y más preferiblemente en *Lactococcus*. La fuerte expresión puede aumentar favorablemente la cantidad de productos de expresión, por ejemplo, polipéptidos, producidos de forma recombinante por las células huésped, que se vuelven disponibles para otros usos, tales como, por ejemplo, para la purificación de o para la administración terapéutica por las células huésped.

Incluso más sorprendentemente, los inventores comprendieron que los ácidos nucleicos y secuencias de ácidos

nucleicos de la invención pueden actuar como promotores que son aún más fuertes, especialmente cuando se usan en *Lactococcus*, que los promotores derivados previamente de *Lactococcus*. Más específicamente, los ácidos nucleicos y las secuencias de la invención pueden funcionar así como promotores aún más fuertes, por ejemplo, promotores constitutivos aún más fuertes, que el promotor del gen de timidilato sintasa (*thyA*) de *Lactococcus lactis*,
 5 que, para el mejor conocimiento de los inventores, es el promotor derivado de *Lactococcus* más fuerte, más en particular, el promotor constitutivo derivado de *Lactococcus* más fuerte, hasta la fecha. El promotor *thyA* de *Lactococcus lactis* es, para el mejor conocimiento de los inventores, también el promotor más fuerte actualmente conocido para la expresión génica recombinante, por ejemplo, heteróloga, en *Lactococcus*, y preferiblemente en *Lactococcus lactis*.

10

Sorprendentemente, un análisis del transcriptoma combinado como se describe en los ejemplos junto con los datos de la proteómica sofisticada no era competente en lo que sugiere la resistencia o la actividad de los promotores candidatos. En particular, algunos promotores identificados fueron sólo débilmente activos cuando se ensayaron. Además, algunas secuencias promotoras potenciales no estaban activas fuera del entorno natural o la configuración
 15 nativa, es decir, cuando se ensayaron con genes heterólogos.

Como una ventaja añadida, se observa una expresión particularmente alta usando los promotores de la invención *inter alia* para IL-10 humana, péptido YY humano (PYY), péptido tipo glucagón humano 1 (GLP-1), GLP-2 humano (GLP-2) y factores trefoil humanos (TTF) como dianas preferidas.

20

También se apreciará que los ácidos nucleicos y secuencias de ácidos nucleicos que se identifican por los inventores se obtienen a partir de *Lactococcus*, que se establece como un microorganismo GRAS (es decir, "considerado generalmente como seguro"). En consecuencia, las composiciones, por ejemplo, células huésped, que comprenden dichos promotores, pueden administrarse a seres humanos y animales con menos preocupación por la
 25 seguridad biológica que cuando se introducen secuencias que se originan de, por ejemplo, microorganismos no GRAS u otras fuentes.

Por lo tanto, la invención proporciona ácidos nucleicos y secuencias ventajosas derivadas de *Lactococcus*, es decir, comparativamente seguras, que constituyen promotores adicionales, más preferiblemente promotores fuertes
 30 adicionales, e incluso más preferiblemente promotores más fuertes que el promotor *thyA*, para su uso en numerosas aplicaciones que implican la expresión recombinante, por ejemplo, de polipéptidos, en células huésped, preferiblemente en bacterias, e incluso más preferiblemente, en *Lactococcus*.

La presente invención integra las realizaciones pertinentes anteriores en sus diversos aspectos.

35

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor (P), que es un promotor nativo de una especie de *Lactococcus* o una variante funcional o fragmento funcional del mismo, unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor (P), caracterizado porque el promotor (P) es más fuerte en *Lactococcus* que el promotor del gen timidilato sintasa (*thyA*)
 40 de *Lactococcus lactis*.

A este respecto, por lo tanto, la invención también proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor (P) unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor (P), en el que el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los promotores nativos de genes de
 45 *Lactococcus* para 1) ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad 160 kD (*rpoC*), 2) ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad 140 kD (*rpb2*), 3) proteína tipo ferritina de unión a ADN (protector del daño oxidativo) (*dps*), 4) piruvato cinasa (*pyk*), 5) glutamil y glutaminil-ARNt sintetetasas (*glnS*), 6) enolasa (*eno*), 7) glutamina sintetasa (*glnA*) 8) Regulador transcripcional tipo HTH (*glnR*), 9) Xaa-His dipeptidasa (*argE* o *pepV*), 10) subunidad beta ATP sintasa tipo F0F1- (subunidad beta ATP sintasa F1) (*atpD*), 11) 3-fosfoglicerato cinasa (*pgk*),
 50 12) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa/eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), 13) acetato cinasa (*ackA*), 14) 3-oxoacil-(acil-vehículo-proteína) sintasa (*fabB*), 15) 3-oxoacil-(acil-vehículo-proteína) reductasa (*fabG*), 16) ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad alfa/subunidad 40 kD (*rpoA*), 17) Xaa-Pro aminopeptidasa (*pepP*), 18) fructosa/tagatosa bisfosfato aldolasa (*tbp*), 19) proteína ribosomal S4 (*rpsD*), 20) superóxido dismutasa (*sodA*), 21) proteína ribosomal S12 (*rpsL*) y proteína ribosomal S7 (*rpsG*), 22) proteína ribosomal L18 (*rpIR*) y proteína ribosomal L19
 55 S5 (*rpsE*) y proteína ribosomal L30/L7E (*rpmD*), 23) S-ribosilhomocisteína liasa (*luxS*), 24) proteína ribosomal L19 (*rpIS*), 25) proteína ribosomal S11 (*rpsK*), 26) proteína ribosomal L10 (*rpIJ*), 27) proteína ribosomal L7/L12 (*rpIL*), 28) proteína de unión a ADN nucleico bacteriano/proteína de unión a ADN HU (*hup*), 29) proteína ribosomal 50S L28 (*rpmB*), 30) componente específico celobiosa del sistema fosfotransferasa IIB (*lacE*), 31) Subunidad alfa ATP sintasa de tipo F0F1 (*atpA*), 32) Sistema de transporte de azúcar tipo ABC (componente ATPasa) (*malK*), 33) subunidad alfa

del componente E1 del complejo de acetoina deshidrogenasa (*acoA*), 34) proteína de división celular (*diffVA* o *ftsA*), 35) UDP-galactopiranos mutasa (*glf*), 36) glutamil aminopeptidasa (*frvX*), 37) proteína relacionada con deshidrogenasa predicha (*mviM*), 38) proteína ribosomal S2, 39) factor de inicio de la traducción 3 (IF-3) (*infC*), 40) proteína ribosomal L4 (*rplD*) y proteína ribosomal L23 (*rplW*) y proteína ribosomal L2 (*rplB*), 41) dominio EMAP 5 (*yjdD*), 42) factor de elongación de la transcripción (*greA*), 43) subunidad proteasa de Clp proteasa dependiente de ATP (*clpP*), 44) proteína ribosomal L15 (*rplO*), 45) proteína ribosomal L11 (*rplK*), 46) proteína ribosomal S8 (*rpsH*), 47) proteína ribosomal L21 (*rplU*), 48) proteína ribosomal S13 (*rpsM*), 49) proteína ribosomal S19 (*rpsS*) y proteína ribosomal L22 (*rplU*) y proteína ribosomal L16 (*rplP*) y proteína ribosomal L14 (*rplN*), 50) proteína ribosomal S10 (*rpsJ*), 51) co-chaperonina GroES (Hsp10) (*cpn10*), 52) proteína ribosomal L24 (*rplX*) y 53) proteína hipotética 10 LACR_0137 (*duf965*), y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos.

La invención proporciona un ácido nucleico recombinante, en el que el promotor (P) se escoge entre el grupo que consiste en los promotores nativos de genes de *Lactococcus*, preferiblemente de *Lactococcus lactis*, para 1) ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta'/subunidad 160 kD (*rpoC*), 3) ferritina de unión a hierro no hemo (*dpsA*), 15 4) piruvato cinasa (*pyk*), 5) glutaminil-ARNt sintetetas (*gltX*), 6) fosfopiruvato hidratasa (*eno*), 9) dipeptidasa PepV (*pepV*), 12) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapB*), 13) acetato cinasa (*ackA*), 18) fructosa bisfosfato aldolasa (*fbA*), 20) superóxido dismutasa (*sodA*), 21) proteína ribosomal S12 (*rpsL*) y proteína ribosomal S7 (*rpsG*), 22) proteína ribosomal L18 (*rplR*) y proteína ribosomal S5 (*rpsE*) y proteína ribosomal L30/L7E (*rpmD*), 24) proteína ribosomal L19 (*rplS*), 26) proteína ribosomal L10 (*rplJ*), 28) proteína de unión de ADN tipo HU (*hllA*), 29) proteína ribosomal 50S L28 (*rpmB*), 30) componente IIB del sistema fosfotransferasa (*ptcB*), 31) Subunidad alfa ATP sintasa de tipo F0F1 (*atpA*), 32) proteína de unión a ATP de transporte de unión a azúcar múltiple (*msmK*), 33) subunidad alfa del componente E! de piruvato deshidrogenasa (*pdhA*), 34) proteína de división celular (*diffVA* o *ftsA*), 35) UDP-galactopiranos mutasa (*glf1*), 36) glutamil aminopeptidasa (*pepA*), 37) proteína relacionada con deshidrogenasa predicha (*llmg_0272*), 38) proteína ribosomal S2 (*rpsB*), 39) factor de inicio de la traducción 3 (IF-3) (*infC*), 40) 25 proteína ribosomal L4 (*rplD*) y proteína ribosomal L23 (*rplW*) y proteína ribosomal L2 (*rplB*), 41) cadena beta de fenilalanil-ARNt sintetasa (*pheT*), 42) factor de elongación de la transcripción GreA (*greA*), 43) subunidad proteolítica de Clp proteasa dependiente de ATP (*clpP*), 44) proteína ribosomal L15 (*rplO*), 45) proteína ribosomal L11 (*rplK*), 46) proteína ribosomal S8 (*rpsH*), 47) proteína ribosomal L21 (*rplU*), 48) proteína ribosomal S13 (*rpsM*), 49) proteína ribosomal S19 (*rpsS*) y proteína ribosomal L22 (*rplU*) y proteína ribosomal L16 (*rplP*) y proteína ribosomal L14 (*rplN*), 30 50) proteína ribosomal S10 (*rpsJ*), 51) co-chaperonina GroES (Hsp10) (*groES*), 52) proteína ribosomal L24 (*rplX*) y 53) resolvasa de unión de holiday putativa (*llmg_0151*), y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos.

En una realización incluso más preferida, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante, en el que el 35 promotor (P) se escoge entre el grupo que consiste en los promotores nativos de genes de *Lactococcus*, preferiblemente de *Lactococcus lactis*, para 1) ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta'/subunidad 160 kD (*rpoC*), 3) ferritina de unión a hierro no hemo (*dpsA*), 4) piruvato cinasa (*pyk*), 5) glutaminil-ARNt sintetetas (*gltX*), 6) fosfopiruvato hidratasa (*eno*), 9) dipeptidasa PepV (*pepV*), 12) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapB*), 13) acetato cinasa (*ackA*), 18) fructosa bisfosfato aldolasa (*fbA*), 20) superóxido dismutasa (*sodA*), 21) proteína ribosomal S12 (*rpsL*) y proteína ribosomal S7 (*rpsG*), 22) proteína ribosomal L18 (*rplR*) y proteína ribosomal S5 (*rpsE*) y proteína ribosomal L30/L7E (*rpmD*), 24) proteína ribosomal L19 (*rplS*), 26) proteína ribosomal L10 (*rplJ*), 28) 40 proteína de unión de ADN tipo HU (*hllA*), 29) proteína ribosomal 50S L28 (*rpmB*), 30) componente IIB del sistema fosfotransferasa (*ptcB*), como se define en la Tabla 1.

45 En una realización preferida adicional, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende el promotor 28) proteína de unión a ADN nucleoide bacteriano/proteína de unión de ADN tipo HU (*hllA* o *hup*), unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor. Incluso más preferiblemente, dicho promotor es el promotor PhIIA.

50 En una realización preferida adicional, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende el promotor 3) ferritina de unión a hierro no hemo (*dpsA* o *LACR_2311*), promotor 9) dipeptidasa PepV (*pepV* o *LACR_0908*), o el promotor 20) superóxido dismutasa (*sodA* o *LACR_0458*), respectivamente, dicho promotor unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor. Incluso más preferiblemente, dicho promotor es el promotor PdpsA, PpepV o PsodA.

55 En una selección preferida, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor (P) unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor (P), en el que el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los promotores nativos de los genes de *Lactococcus* enumerados en los puntos 1) a 30) anteriormente, o la Tabla 1, preferiblemente el promotor PhIIA, PdpsA, PpepV o

PsodA, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos.

En una realización preferida adicional, los genes que se han mencionado anteriormente, y los promotores nativos respectivos y variantes funcionales y fragmentos funcionales de los mismos, se obtienen a partir de *Lactococcus*
5 *lactis*.

En aspectos ejemplares relacionados, también se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos recombinantes de la invención; casetes de expresión integrados cromosómicamente, células huésped transformadas con los ácidos nucleicos recombinantes de la invención o con vectores que los comprenden; el uso de los ácidos
10 nucleicos recombinantes de la invención para conseguir la expresión de productos de expresión, preferiblemente de uno o más polipéptidos, codificados por dichos marcos de lectura abiertos, en una célula huésped; métodos para la expresión recombinante y el aislamiento de productos de expresión, preferiblemente polipéptidos, de interés usando dichas células huésped; métodos de tratamiento que implican la administración *in situ* de productos de expresión
15 terapéuticamente relevantes, preferiblemente polipéptidos, por ejemplo, antígenos y/o polipéptidos no vacinógenos terapéuticamente activos, a seres humanos o animales por dichas células huésped; y usos relacionados de las células huésped para la fabricación de medicamentos para facilitar dicha administración; composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células huésped; etc.

Estos y aspectos adicionales y realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y
20 en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1 (A-H)** ilustra secuencias promotoras preferidas.
25

La **figura 2** ilustra la separación electroforética de polipéptidos MG1363 de *Lactococcus lactis*.

La **figura 3** ilustra una estrategia de clonación.

30 La **figura 4** Subclonación de las fusiones promotor-Usp45-h[Gly2]GLP2. P se refiere a cualquiera de los siguientes promotores: P1 (Waterfield, y col. 1995), PthyA (promotor de timidilato sintasa) y PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleico bacteriano/proteína de unión a ADN HU); usp45 se refiere a la señal de secreción de usp45 de tipo silvestre (van Asseldonk, y col. 1990) o mutante del mismo, incluyendo Usp45 N₄ en el que la lisina en la posición 4 se sustituyó por asparagina; Em se refiere al marcador de selección de eritromicina; ori se refiere a origen
35 de replicación.

La **figura 5** Producción y secreción de h[Gly2]GLP-2 por cepas de *L. lactis* recombinantes reveladas por el anticuerpo anti-hGLP2. (A) Secreción de h[Gly2]GLP-2. 1 µg de hGLP-2 recombinante se cargó como control positivo. (B) Producción celular y secreción de h[Gly2]GLP-2. Cada carril en la transferencia representa 1 ml de
40 fracción celular de *L. lactis* o sobrenadante de cultivo obtenido después de tres horas de crecimiento. Se usó SeeBlue® Plus2 (Invitrogen) como marcador del peso molecular (PM).

La **figura 6** Comparación esquemática de MG1363 de *L. lactis* y de las diversas cepas de expresión de hIL-10 usadas en este estudio. Durante la construcción, los casetes de expresión de hIL-10 se integran en el cromosoma
45 MG1363 de *L. lactis* por recombinación homóloga en secuencias idénticas, tanto aguas arriba, así como aguas debajo de thyA y los casetes de expresión de hIL-10 respectivamente. Los puntos de recombinación se representan esquemáticamente por \. Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión sean idénticas para las cepas que se han descrito anteriormente. Los elementos genéticos no están dibujados a escala.

50 La **figura 7** Comparación de la expresión de hIL-10 a partir de PthyA (promotor de timidilato sintasa, cepas sAGX0005 y Thy12) con expresión de hIL-10 a partir del (A) promotor PdpsA (proteína tipo ferritina de unión a ADN, SEQ ID NO: 3, sAGX0012), (B) PpepV (promotor de Xaa-His dipeptidasa SEQ ID NO: 9 o 158, Cepa sAGX0018), (C) PsodA (promotor de superóxido dismutasa, SEQ ID NO: 20 sAGX0029) y (D) PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleico bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, cepa sAGX0037). "Promotor"
55 indica el promotor que está delante del gen de hIL-10.

La **figura 8** Comparación de la expresión de hIL-10 por 10⁹ células de MG1363, sAGX0005 y sAGX0037

La **figura 9** Comparación esquemática de MG1363 de *L. lactis* y las diversas cepas de expresión de hTFF usadas en

este estudio. Durante la construcción, los casetes de expresión de TFF se integran en el cromosoma MG1363 de *L. lactis* por recombinación homóloga en secuencias idénticas, tanto aguas arriba como aguas abajo de *thyA* y los casetes de expresión de TFF respectivamente. Los puntos de recombinación se representan esquemáticamente por \. Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión sean idénticas para las cepas que se han descrito anteriormente. *usp45* mutante se indica por *. Los elementos genéticos no están dibujados a escala.

La **figura 10** Comparación de

- 10 (A) expresión de hTFF1 a partir de P_{thyA} (promotor de timidilato sintasa) unido a la señal de secreción de *usp45* de tipo silvestre (*ts*) y hTFF1 (cepa sAGX0041), PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28) unido a la señal de secreción de *usp45* mutante (*mut*) y hTFF1 (cepa sAGX0049) o PhIIA unido a la señal de secreción de *usp45* *ts* y hTFF1 (cepa sAGX0048).
- 15 (B) expresión de hTFF3 a partir de P_{thyA} (promotor de timidilato sintasa) unido a la señal de secreción de *usp45* *ts* y hTFF3 (cepa sAGX0043), promotor P_{pdpsA} (proteína tipo ferritina de unión a ADN, SEQ ID NO: 3) unido a la señal de secreción de *usp45* *ts* y hTFF3 (sAGX0059) y PhIIA unido a la señal de secreción de *usp45* *mut* y hTFF3 (cepa sAGX0057).

20 "Promotor" y "señal de secreción" indican el promotor y la señal de secreción que está delante del gen TFF.

La **figura 11** Análisis por transferencia Western de los sobrenadantes de las diversas cepas indicadas. Los carriles que contienen proteínas de referencia se indican con "hTFF1" (hTFF1 de referencia) y "MPM" (marcadores de peso molecular, los pesos moleculares se indican por "kDa"). Todos los demás carriles contienen el equivalente de 0,5 ml de sobrenadante de cultivo de las cepas indicadas, cosechadas como se ha descrito anteriormente. El primer anticuerpo fue anti-hTFF1 monoclonal de ratón:1/1000 (Abnova: cat. n.º H00007031-M02). El segundo anticuerpo fue anti-ratón-AP de cabra:1/1000 (Southern Biotech: 4050-04) y la detección se hizo con NBT/BCIP (Roche 11 697 471 0001). MPM son Invitrogen SeeBlue plus2 teñidos previamente convencionales (cat. n.º LC5925).

La **figura 12** Resumen esquemático de la estructura de pT1 NX y de los diversos plásmidos de expresión de hPYY G9 (3-36) usados en este estudio. Los plásmidos de expresión pAGX0211, pAGX0212 y pAGX0213 se obtuvieron insertando los casetes de expresión respectivos como fragmentos EcoRI-SpeI en el pT1NX abierto de EcoRI-SpeI. Como tal, la estructura y posición de todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión, tal como el origen de replicación (*ori*) y el marcador de resistencia a la eritromicina (*EmR*), son idénticas para todos los plásmidos. Los elementos genéticos no están dibujados a escala.

35 La **figura 13** Comparación de la expresión de hPYY G9 (3-36) a partir de P1 (Waterfield y col. 1995) (plásmido pAGX0211), P_{thyA} (promotor de timidilato sintasa, plásmido pAGX0212) y PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, plásmido pAGX0213) unido a la señal de secreción de *usp45* y hPYY G9 (3-36). Todos los plásmidos estaban presentes en MG1363 de *L. lactis*. "Promotor" indica el promotor que está aguas arriba del gen hPYY G9 (3-36) o presente en el sitio equivalente en pT1NX.

45 La **figura 14** Resumen esquemático de la estructura de pT1 NX y de los diversos plásmidos de expresión de hGLP-1 G8 (7-36) usados en este estudio. Los plásmidos de expresión pAGX0233 y pAGX0234 se obtuvieron insertando los casetes de expresión respectivos como fragmentos de EcoRI-SpeI en el pT1 NX abierto con EcoRI-SpeI. Como tal, la estructura y la posición de todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión, tal como el origen de replicación (*ori*) y el marcador de resistencia a la eritromicina (*EmR*), son idénticas para todos los plásmidos. Los elementos genéticos no están dibujados a escala.

50 La **figura 15** Comparación de la expresión de hGLP-1 G8 (7-36) a partir de P1 (Waterfield y col. 1995) (plásmido pAGX0211), P_{thyA} (promotor de timidilato sintasa, plásmido pAGX0212) y PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, plásmido pAGX0213) unidos a la señal de secreción de *usp45* y hGLP-1 G8 (7-36). Todos los plásmidos estaban presentes en MG1363 de *L. lactis*. "Promotor" indica el promotor que está aguas arriba del gen hGLP-1 G8 (7-36) o presente en el sitio equivalente en pT1 NX.

55 La **figura 16** Comparación esquemática de MG1363 de *L. lactis* y de las diversas cepas de expresión de hIL-10 usadas en este estudio. Durante la construcción, los casetes de expresión de hIL-10 se integran en el cromosoma MG1363 de *L. lactis* por recombinación homóloga en secuencias idénticas, tanto aguas arriba como aguas abajo de *thyA* y los casetes de expresión de hIL-10 respectivamente. Los puntos de recombinación se representan esquemáticamente por \. Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión sean

idénticas para las cepas que se han descrito anteriormente. Aquí, el "promotor" es uno cualquiera de los promotores, como está presente en la cepa "sAGX00xx" (Tabla 11). Los elementos genéticos no están dibujados a escala

La **figura 17** Comparación de la expresión de hIL-10 a partir de PthyA (promotor de timidilato sintasa, cepa sAGX0005) con expresión de hIL-10 de una cualquiera de una serie de cepas (véase la figura 16 y la Tabla 11) en la que estos promotores lactocócicos se pusieron aguas arriba de un gen de fusión usp45-hIL-10.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por" como se usan en el presente documento son sinónimos con "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método no mencionadas, adicionales.

15

La enumeración de intervalos numéricos por criterios de valoración incluye todos los números y fracciones incluidas dentro de ese intervalo, así como los criterios de valoración enumerados.

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible, tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende incluir las variaciones de +/-20 % o menos, preferiblemente +/-10 % o menos, más preferiblemente +/-5 % o menos, incluso más preferiblemente +/-1 % o menos, y aún más preferiblemente +/-0,1 % o menos del valor especificado, en la medida en que dichas variaciones son apropiadas para realizar la invención desvelada.

A menos que se define de otro modo, todos los términos usados al desvelar la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, tienen el significado que se tiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. A modo de una guía adicional, las definiciones siguientes se incluyen para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

La expresión "ácido nucleico" como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero de cualquier longitud compuesto básicamente por nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. Los ácidos nucleicos pueden comprender bases de purina y/o pirimidina y/o otras bases nucleotídicas naturales (por ejemplo, xantina, inosina, hipoxantina), química o bioquímicamente modificadas (por ejemplo, metiladas), sintéticas o derivatizadas. La estructura principal de los ácidos nucleicos puede comprender azúcares y grupos fosfato, como puede encontrarse típicamente en ARN o ADN, y/o uno o más azúcares modificados o sustituidos y/o uno o más grupos fosfato modificados o sustituidos. La expresión "ácido nucleico" incluye preferiblemente además ADN, ARN y moléculas híbridas de ADN/ARN, incluyendo específicamente hnRNA, pre-mRNA, ARNm, ADNc, ADN genómico, productos de amplificación, oligonucleótidos, y ADN sintético (por ejemplo, químicamente sintetizado), ARN o híbridos de ADN/ARN. Un "ácido nucleico" puede ser bicatenario, parcialmente bicatenario o monocatenario. Cuando es monocatenario, el ácido nucleico puede ser la cadena homocatenario o la cadena anticatenario. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal.

En una realización preferida, el ácido nucleico que comprende un promotor de la invención es ADN o ARN, más preferiblemente ADN.

45

La expresión "ácido nucleico recombinante" se refiere generalmente a un ácido nucleico que está compuesto por segmentos unidos entre sí usando tecnología de ADN recombinante. Cuando un ácido nucleico recombinante se replica en un organismo huésped, la progenie de ácidos nucleicos se incluye también dentro de la expresión "ácido nucleico recombinante".

50

Los trabajos de referencia estándares que exponen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante incluyen Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel y col., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) ("Ausubel y col., 1992"); Innis y col., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los principios generales de microbiología se exponen, por ejemplo, en Davis, B. D. y col., Microbiology, 3ª edición, Harper & Row, publishers, Philadelphia, Pa. (1980).

55

Por "promotor" se refiere en general a una región en una molécula de ácido nucleico, preferiblemente una molécula

de ADN, a la que se une la ARN polimerasa e inicia la transcripción. Un promotor se sitúa preferiblemente, pero no necesariamente, aguas arriba, es decir, 5', de la secuencia, cuya transcripción controla. En la presente invención, los promotores específicos se indican por el término "P", seguido del nombre del gen del que se obtienen. Por ejemplo, "PthyA", que representa el promotor del gen *thyA*, y "PHIIA" que representa el promotor del gen *hIIA*.

5

La expresión "promotor nativo" se refiere a un promotor cuya secuencia nucleotídica es idéntica a la de un promotor presente en la naturaleza, por ejemplo, en una célula u organismo en la naturaleza. Por lo tanto, el modificador "promotor nativo" se refiere a la secuencia del promotor y no debe interpretarse que se requiera que el promotor se obtenga o se produzca de cualquiera manera particular. A modo de ejemplo y no de limitación, por lo tanto, el

10

término incluirá promotores en sus huéspedes naturales, aislados de los mismos, clonados y propagados usando tecnología de ADN recombinante, producidos por un método de amplificación o generados por medios sintéticos, etc., en la medida en que la secuencia de dichos promotores sea la misma que la de sus contrarios de origen natural (véase, por ejemplo, la Tabla 1).

15

Un experto en la técnica entiende que la secuencia nativa del promotor de un gen dado puede diferir entre diferentes especies de *Lactococcus* y/o entre diferentes subespecies en una única especie de *Lactococcus* y/o entre diferentes cepas dentro de una única especie o subespecies de *Lactococcus*, debido a la divergencia genética natural entre dichas especies, subespecies y/o cepas. Por lo tanto, dichas secuencias promotoras divergentes pero de origen natural, se considerarán nativas.

20

Un experto en la técnica en general es capaz de predecir e identificar promotores bacterianos naturales, tales como promotores de *Lactococcus*. No obstante, para ofrecer orientación añadida, a menudo un promotor natural puede identificarse analizando una secuencia genómica o parte de la misma, de una bacteria, preferiblemente a partir de una especie *Lactococcus*; identificando un marco de lectura abierto en la misma, es decir, una sucesión de triplete

25

nucleotídicos codificantes partiendo de un codón de inicio de la traducción (preferiblemente, ATG) y cerrando con un codón de terminación de la traducción (por ejemplo, TAA, TAG o TGA) y que no contiene ningún codón de terminación de la traducción dentro del marco interno; y analizando la secuencia aguas arriba de dicho codón de inicio de la traducción para localizar el codón de inicio de la traducción más aguas arriba, aguas arriba del cual se produce un codón de terminación de la traducción dentro del marco. Preferiblemente, la transcripción del marco de

30

lectura abierto identificado de este modo puede verificarse experimentalmente, tal como, por ejemplo, por transferencia de Northern o RT-PCR; y el sitio de inicio de la transcripción (por ejemplo, adyacente a los más aguas arriba y/o, quizás uno o más de los codones de inicio de la traducción aguas abajo) puede evaluarse usando, por ejemplo, la amplificación rápida 5' del método de extremos de ADNc (5'-RACE).

35

Típicamente, las secuencias 5' adyacentes a y próximas al codón de inicio de la traducción más aguas arriba (y/o, si la evidencia experimental así lo indica, uno o más de los codones de inicio de la traducción más aguas abajo), pueden comprender el promotor nativo responsable de la transcripción de dicho ORF. A modo de ejemplo preferido, cuando el primer nucleótido del codón de inicio de la traducción se representa +1 (por ejemplo, el nucleótido A del codón ATG es +1) y el nucleótido directamente 5' del mismo se representa -1, entonces la expresión "promotor

40

nativo" puede referirse a la secuencia de aproximadamente -500 a aproximadamente +50, por ejemplo, de aproximadamente -500 a aproximadamente +20, de aproximadamente -500 a aproximadamente +10, de aproximadamente -500 a aproximadamente +5, de aproximadamente -500 a aproximadamente +2, o de aproximadamente -500 a aproximadamente -1; preferiblemente de aproximadamente -400 a aproximadamente +50, por ejemplo, en los ejemplos preferidos, de aproximadamente -400 a aproximadamente +20, por ejemplo, de

45

aproximadamente -400 a aproximadamente +10, de aproximadamente -400 a aproximadamente +5, de aproximadamente -400 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -400 a aproximadamente -1; más preferiblemente de aproximadamente -300 a aproximadamente +50, por ejemplo, en ejemplos preferidos, de aproximadamente -300 a aproximadamente +20, por ejemplo, de aproximadamente -300 a aproximadamente +10, de aproximadamente -300 a aproximadamente +5, de aproximadamente -300 a aproximadamente +2 o de

50

aproximadamente -300 a aproximadamente -1; tal como, por ejemplo, en los ejemplos preferidos, de aproximadamente -200 a aproximadamente +50 y en los ejemplos preferidos adicionales, de aproximadamente -200 a aproximadamente +20, por ejemplo, de aproximadamente -200 a aproximadamente +10, de aproximadamente -200 a aproximadamente +5, de aproximadamente -200 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -200 a

55

aproximadamente -1; o tal como, por ejemplo, en otro ejemplo preferido, de aproximadamente -100 a aproximadamente +50 y en ejemplos preferidos adicionales, de aproximadamente -100 a aproximadamente +20, por ejemplo, de aproximadamente -100 a aproximadamente +10, de aproximadamente -100 a aproximadamente +5, de aproximadamente -100 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -100 a aproximadamente -1; en la medida en que dicha secuencia muestre la actividad promotora.

- También se contempla el uso de variantes funcionales de promotores de *Lactococcus* nativos en ácidos nucleicos recombinantes de la invención. El término "variante" se refiere a una secuencia que es sustancialmente idéntica (es decir, en gran medida pero no totalmente idéntica) a una secuencia nativa correspondiente, por ejemplo, a la secuencia de un promotor de *Lactococcus* nativo correspondiente. "Sustancialmente idéntica" se refiere a, al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 % idéntica, más preferiblemente al menos el 80 % idéntica, por ejemplo, al menos el 85 % idéntica, incluso más preferiblemente al menos el 90 % idéntica, por ejemplo, al menos el 91 % idéntica, el 92 % idéntica, aún más preferiblemente al menos el 93 % idéntica, por ejemplo, el 94 % idéntica, aún más preferiblemente al menos el 95 % idéntica, por ejemplo, al menos el 96 % idéntica, incluso más preferiblemente al menos el 97 % idéntica, por ejemplo, al menos el 98 % idéntica, y mucho más preferiblemente al menos el 99 % idéntica. Los alineamientos de secuencia y la determinación de la identidad de secuencia pueden hacerse, por ejemplo, usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*) descrito originalmente por Altschul y col. (1990), tal como el algoritmo de "secuencias Blast 2" descrito por Tatusova y Madden (1999).
- 15 También se contempla el uso de fragmentos funcionales de promotores *Lactococcus* nativos en ácidos nucleicos recombinantes de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a una secuencia que tiene una delección 5' y/o 3' de uno o más nucleótidos en comparación con una secuencia nativa, por ejemplo, un promotor nativo de *Lactococcus* o una variante del mismo, pero donde la secuencia de ácido nucleico restante del fragmento es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia del promotor de *Lactococcus* nativo o una variante del mismo. La secuencia restante de un fragmento puede representar preferiblemente al menos el 30 %, por ejemplo, al menos el 40 %, más preferiblemente al menos el 50 %, por ejemplo, al menos el 60 %, incluso más preferiblemente al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 80 % o al menos el 85 %, y aún más preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % o más de la secuencia de ácido nucleico del promotor de *Lactococcus* nativo o una variante del mismo, tal como se identifica por los métodos de la presente invención, por ejemplo, como se proporciona por las SEQ ID NO: específicas de la Tabla 1.

El término "funcional" con referencia a las variantes y fragmentos de promotores como anteriormente, se refiere al hecho de que las variantes y fragmentos particulares tendrán, al menos parcialmente, retenido la actividad promotora, es decir, la capacidad de unir ARN polimerasa e iniciar la transcripción, del promotor nativo correspondiente. Preferiblemente, dichas variantes funcionales o fragmentos funcionales pueden retener al menos el 50 % de la actividad del promotor nativo correspondiente, por ejemplo, al menos el 60 %, más preferiblemente al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 80 %, aún más preferiblemente al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 % o el 89 %, aún más preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, y mucho más preferiblemente al menos el 95 %, por ejemplo, al menos el 96 %, al menos el 97 %, y muy preferiblemente al menos el 98 % o al menos el 99 % de la actividad del promotor nativo correspondiente. Además preferiblemente, dichas variantes funcionales o fragmentos funcionales pueden incluso tener mayor actividad que el promotor nativo correspondiente.

Un experto en la técnica también puede apreciar que en la realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden incluso comprender más de un promotor (P) y/o variante funcional y/o fragmento funcional de la invención. Por ejemplo, dichos promotores, variantes funcionales o fragmentos funcionales - que pueden ser iguales o diferentes - pueden unirse operativamente a y controlar la expresión de distintas unidades de transcripción dentro de dichos ácidos nucleicos recombinantes. Como alternativa, o además, la expresión de una única unidad de transcripción puede controlarse en más de un promotor, variante funcional y/o fragmento funcional, unidos operativamente a la misma, que pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, la asociación operativa de más de uno de los elementos anteriores que tiene actividad promotora con una única unidad de transcripción puede aumentar adicionalmente el nivel de transcripción de dicha unidad. A modo de ejemplo, y no de limitación, dichos promotores, variantes funcionales y/o fragmentos funcionales pueden disponerse secuencialmente, por ejemplo, secuencialmente aguas arriba de la unidad de transcripción respectiva.

Aún como alternativa, la invención también contempla ácidos nucleicos recombinantes que comprenden promotores quiméricos que incluyen dos o más porciones obtenidas de diferentes promotores, variantes funcionales y/o fragmentos funcionales de la invención, y juntos constituyen un nuevo promotor.

Un experto en la técnica tendrá conocimiento de técnicas para evaluar la actividad de los promotores. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico cuya actividad como promotor se busca determinar puede insertarse en una construcción indicadora recombinante de tal forma que está unida operativamente con una secuencia indicadora, preferiblemente una secuencia de codificación indicadora, tal como, por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP) o cloranfenicol acetil transferasa (CAT), etc. y la expresión y/o acumulación del ARNm indicador (por ejemplo, por

transferencia de Northern, RT-PCR cuantitativa, etc.) y/o la proteína (por ejemplo, por transferencia de Western, ELISA, medición de fluorescencia o la actividad enzimática, etc.) se ensaya cuando dicha construcción indicadora se introduce en las células huésped u organismos de interés.

5 En una realización preferida ejemplar, la expresión puede medirse para una proteína heteróloga al organismo en el que se mide la expresión, por ejemplo, heteróloga a la bacteria, preferiblemente heteróloga a *Lactococcus*, incluso más preferiblemente heteróloga a *Lactococcus lactis*. Por ejemplo, en una realización preferida, la expresión en las bacteria, preferiblemente en *Lactococcus*, incluso más preferiblemente en *Lactococcus lactis*, puede evaluarse para un gen que codifica un polipéptido de origen eucariota, incluso más preferiblemente para cualquiera de los genes
10 que codifican los polipéptidos terapéuticamente relevantes diseñados para la expresión usando los ácidos nucleicos de la invención (como se describe en cualquier parte en esta memoria descriptiva), preferiblemente GLP-2, GLP-1, PYY y TFF, y aún más preferiblemente para cualquier de polipéptidos inmunomoduladores, citocinas, factores de crecimiento o interleucinas, tal como, muy preferiblemente para hIL-10. Los valores así medidos para las secuencias de ácido nucleico ensayadas indican la actividad o resistencia de los promotores potenciales comprendidos dentro
15 de dichas secuencias. Un experto en la técnica también entiende que, para asegurar, la naturaleza comparativa de tales ensayos de la actividad promotora, deben mantenerse unas condiciones distintas de las secuencias de ácido nucleico ensayadas sobre el mismo o, idealmente, los mismos entre los diferentes ensayos. Dichas condiciones pueden comprender, a modo de ejemplo, la cantidad de la construcción indicadora introducida en las células, el método de transformación usado en dicha introducción, el número y sitio de integración de dichas construcciones
20 indicadoras en el genoma de las células receptoras ensayadas, y/o el estado (por ejemplo, fase de crecimiento, por ejemplo, preferiblemente fase de crecimiento exponencial) de las células huésped receptoras en el momento de la medición, etc. Un modo ejemplar de medir la resistencia de un promotor en células receptoras de *Lactococcus lactis* usando hIL-10 como el gen expresado, se indica en el Ejemplo 2. Un modo ejemplar adicional de medir la resistencia de un promotor en células receptoras de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei* usando GLP2 como el
25 gen expresado, se indica en los Ejemplos 3 y 4. Modos incluso más preferibles de medir la fuerza de un promotor en células receptoras de *Lactococcus lactis*, usando ahora GLP1, hPYY, hIL-10 y TFF como los genes expresados, se indican en los Ejemplos 5-9. Los experimentos usando *Lactobacillus casei* como células receptoras dan lugar a resultados similares (no representados).

30 Por consiguiente, un promotor (1), que dice que es "más fuerte" que otro promotor (2), mostrará una actividad significativamente mayor según se evalúa por los ensayos adecuados, por ejemplo, los descritos en el párrafo anterior, por ejemplo, el ensayo como se ilustra en los Ejemplos 2 a 9. Una actividad significativamente mayor se refiere a un hallazgo estadísticamente significativo de mayor actividad para el promotor (1), por ejemplo, preferiblemente con $p < 0,5$ o $p < 0,05$.

35 La actividad del promotor (1) puede ser mayor que la actividad del promotor (2) en cualquier medida y, preferiblemente, la actividad del promotor (1) puede ser mayor que la actividad del promotor (2) en al menos el 1 % del valor de la actividad del promotor (2), por ejemplo, en al menos el 2 %, al menos el 3 % o al menos el 4 %, más preferiblemente en al menos el 5 %, por ejemplo, en al menos el 6 %, al menos el 7 %, al menos el 8 % o al menos
40 el 9 %, incluso más preferiblemente en al menos el 10 %, por ejemplo, en al menos el 15 %, aún más preferiblemente en al menos el 20 %, por ejemplo, en al menos el 30 % o al menos el 40 %, incluso más preferiblemente en al menos el 50 %, por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %, y en ejemplos muy preferidos adicionales en al menos el 100 %, al menos el 150 %, al menos el 200 %, al menos el 250 %, al menos el 300 %, al menos el 400 %, o al menos el 500 % del valor de la actividad del promotor
45 (2); o en ejemplos muy preferidos adicionales, la actividad del promotor (1) puede ser al menos 10 veces más alta que la actividad del promotor (2), tal como al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces más alta.

50 Por consiguiente, para realizar variantes o fragmentos funcionales de promotores, especialmente de promotores desvelados por la presente invención, el experto sabrá preparar dichas variantes (por ejemplo, por mutagénesis dirigida o aleatoria) o fragmentos (por ejemplo, por truncamiento 5' y/o 3', por ejemplo, por digestión de restricción o PCR) y ensayar dichas variantes o fragmentos para determinar su actividad promotora como anteriormente. No obstante, a modo de orientación adicional y no de limitación, se aprecia que los promotores bacterianos a menudo incluyen secuencias de consenso adyacentes a las posiciones -10 y -35. Por consiguiente, los fragmentos
55 funcionales de promotores bacterianos, por ejemplo, de *Lactococcus*, pueden comprender preferiblemente al menos secuencias correspondientes a las posiciones en los promotores nativos de aproximadamente -10 a aproximadamente -35, más preferiblemente de aproximadamente -8 a aproximadamente -40, incluso más preferiblemente de aproximadamente -5 a aproximadamente -40 o de aproximadamente -5 a aproximadamente -45, y aún más preferiblemente de aproximadamente -2 o -1 a aproximadamente -50. Además, las variantes funcionales

de promotores bacterianos, por ejemplo, *Lactococcus*, pueden comprender preferiblemente secuencias de consenso adyacentes a las posiciones -10 y -35 como están presentes en los promotores homólogos nativos o como se conoce en la técnica.

5 Una "unión operativa" es una unión en la que las secuencias de ADN reguladoras y la secuencia de ADN que se busca expresar están conectadas de tal manera para permitir la expresión.

Por ejemplo, las secuencias de ADN, tales como, por ejemplo, preferiblemente un promotor y un marco de lectura abierto heterólogo, se dice que están unidas operativamente si la naturaleza del enlace entre las secuencias no (1)
10 da como resultado la introducción de una mutación por cambio de marco de lectura, (2) interfiere con la capacidad del promotor para dirigir la transcripción del marco de lectura abierto, o (3) interfiere con la capacidad del marco de lectura abierto de transcribirse por la secuencia de la región promotora.

En una realización preferida ejemplar, dicho promotor puede situarse aguas arriba, es decir, 5', del marco o marcos
15 de lectura abiertos a los que está unido operativamente.

La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión puede variar de un organismo a otro, pero en general, incluirán una región promotora que, en los procariotas, contiene tanto el promotor (que dirige el inicio de la transcripción del ARN), así como las secuencias de ADN que, cuando se transcriben al ARN, señalarán
20 el inicio de la síntesis de proteínas. Dichas regiones normalmente incluirán las secuencias no codificantes 5' implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, tal como la caja Pribnow (véase, caja TATA), secuencia Shine-Dalgarno, y similares.

Ventajosamente, el codón de inicio de la traducción respectivo con el que un promotor dado de la invención se
25 asocia normalmente en la naturaleza, puede no incluirse en los ácidos nucleicos recombinantes de la invención, tal como para impedir el inicio de la traducción de dichos codones. Por ejemplo, el extremo 3' del promotor puede truncarse en la posición -1 o aguas arriba de la misma; como alternativa, el codón de inicio de la traducción puede mutarse (por ejemplo, de ATG a un codón diferente); etc. Aún como alternativa, dicho codón de inicio de la traducción nativo puede estar presente, y también posiblemente, varios codones posteriores (por ejemplo,
30 preferiblemente ≤ 20 , más preferiblemente ≤ 10 , aún más preferiblemente ≤ 5 , por ejemplo, como mucho 1, 2, 3 o 4) del marco de lectura abierto asociado al promotor determinado en la naturaleza, y un marco de lectura abierto heterólogo de interés puede fusionarse al mismo dentro del marco para producir un producto de fusión.

La expresión "marco de lectura abierto" u ORF, se refiere a una sucesión de tripletes nucleotídicos codificantes que
35 parten de un codón de inicio de la traducción (preferiblemente ATG) y que cierran en un codón de terminación de la traducción (por ejemplo, TAA, TAG o TGA) y que no contienen ningún codón de terminación de la traducción dentro del marco interno, y potencialmente capaces de codificar un polipéptido. Por lo tanto, la expresión puede ser sinónima con "secuencia codificante" como se usa en la técnica. En el ácido nucleico recombinante de la invención, los codones de inicio de la traducción de uno o más ORF pueden asociarse típicamente a secuencias reguladoras
40 que controlan el inicio de la traducción, por ejemplo, con la secuencia Shine-Dalgarno. También se sabe que en las bacterias, incluyendo *Lactococcus*, pueden crearse unidades multi-cistrónicas que contienen dos o más ORF secuenciales controlados por un promotor aguas arriba común, asociado los codones de inicio de la traducción aguas abajo a dichas secuencias que controlan dicho inicio de la traducción.

45 El término "heterólogo", cuando se refiere a la relación entre un ORF dado y un promotor, significa que normalmente dicho promotor no está asociado a éste, es decir, normalmente no controla la transcripción de dicho ORF en la naturaleza. En otras palabras, la asociación se crea por técnicas de ADN recombinante en los ácidos nucleicos recombinantes de la invención.

50 El término "*Lactococcus*" se refiere generalmente al género *Lactococcus* e incluye cualquier taxón (por ejemplo, especies, subespecies, cepa) clasificado como perteneciente a éste en la técnica. A modo de ejemplo, *Lactococcus* incluye las especies *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*, y cualquier subespecies y cepas de las mismas.

55 En realizaciones preferidas de la invención, *Lactococcus* es *Lactococcus lactis*. *Lactococcus lactis* incluye, sin limitación, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *bv. diacetylactis*.

En realizaciones adicionalmente preferidas de la invención, *Lactococcus lactis* es *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* o

Lactococcus lactis ssp. *lactis*, más preferiblemente *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, e incluye cualquier cepa de la misma, tal como, por ejemplo, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363.

En realizaciones preferidas, el promotor (P) se obtiene a partir de *Lactococcus* como se ha definido anteriormente, más preferiblemente a partir de los taxones preferidos de *Lactococcus* como se ha definido anteriormente, esp. en los dos párrafos anteriores.

Cuando se dice que un promotor (P) es más fuerte que el promotor *thyA* de *Lactococcus lactis* en *Lactococcus*, esto significa que es más fuerte en al menos uno, y potencialmente en más de uno o en todos los taxones de *Lactococcus* (por ejemplo, especies, subespecies o cepas). Preferiblemente, un promotor (P) puede ser así de fuerte en al menos *Lactococcus lactis*. También preferiblemente, un promotor (P) puede ser así de fuerte en al menos *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, más preferiblemente en al menos *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

La expresión "timidilato sintasa" se refiere a la enzima EC 2.1.1.45 y "gen timidilato sintasa (*thyA*) de *Lactococcus lactis*" representa un gen que codifica dicha enzima en *Lactococcus lactis*. La secuencia del gen *thyA* de varios taxones de *Lactococcus lactis* se ha descrito, tal como, por ejemplo, a partir de MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Ross y col., 1990; Steidler y col., 2003; Genbank acceso: AF462070), IL1403 de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Bolotin y col., 2001; Genbank GeneID: 1115198) y SK11 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Genbank acceso: NC_008527, locus LACR_1631, ID gen del genoma: 4434110). Un experto en la técnica es capaz de identificar y aislar homólogos del gen *thyA* a partir de taxones adicionales de *Lactococcus lactis*.

Por lo tanto, el promotor del gen *thyA* se refiere a un promotor nativo de cualquier gen *thyA* como se define en el presente documento. A modo de ejemplo, un promotor *thyA* dado puede referirse a una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente -500 a aproximadamente +50 del gen *thyA* correspondiente (representando +1 el primer nucleótido del codón de inicio de la traducción de un gen *thyA* dado); y a modo de ejemplos preferidos adicionales, de aproximadamente -500 a aproximadamente +20, de aproximadamente -500 a aproximadamente +10, de aproximadamente -500 a aproximadamente +5, de aproximadamente -500 a aproximadamente +2, o de aproximadamente -500 a aproximadamente -1; de aproximadamente -400 a aproximadamente +50, de aproximadamente -400 a aproximadamente +20, de aproximadamente -400 a aproximadamente +10, de aproximadamente -400 a aproximadamente +5, de aproximadamente -400 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -400 a aproximadamente -1; de aproximadamente -300 a aproximadamente +50, de aproximadamente -300 a aproximadamente +20, de aproximadamente -300 a aproximadamente +10, de aproximadamente -300 a aproximadamente +5, de aproximadamente -300 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -300 a aproximadamente -1; de aproximadamente -200 a aproximadamente +50, de aproximadamente -200 a aproximadamente +20, de aproximadamente -200 a aproximadamente +10, de aproximadamente -200 a aproximadamente +5, de aproximadamente -200 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -200 a aproximadamente -1; o de aproximadamente -100 a aproximadamente +50, de aproximadamente -100 a aproximadamente +20, de aproximadamente -100 a aproximadamente +10, de aproximadamente -100 a aproximadamente +5, de aproximadamente -100 a aproximadamente +2 o de aproximadamente -100 a aproximadamente -1; en la medida en que dicha secuencia muestra aproximadamente la misma, y preferiblemente la misma fuerza que el promotor *thyA* en la naturaleza.

Preferiblemente, el promotor *thyA* para su uso como referencia en la presente invención, es el promotor del gen *thyA* de MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, y un promotor de la invención es más fuerte con respecto al mismo como se ha definido anteriormente.

En un ensayo ejemplar, descrito en el Ejemplo 2 y basado en Steidler y col. 2003 (*ibid.*), el promotor *thyA* de MG1363 de *L. lactis* ssp. *lactis*, dirige la expresión de IL-10 humana al integrarse en una única copia en el locus *thyA* en la cepa MG1363 de 6,5 ng/1 x 10⁹ bacterias. Por consiguiente, un promotor de la invención que es más fuerte que el promotor *thyA* puede conseguir, en dicho ensayo, una expresión de hIL-10 mayor de 6,5 ng/1 x 10⁹ bacterias, preferiblemente ≥7 ng/1 x 10⁹ bacterias, por ejemplo, ≥8 ng/1 x 10⁹ o ≥9 ng/1 x 10⁹ bacterias, incluso más preferiblemente ≥10 ng/1 x 10⁹ bacterias, por ejemplo, ≥11 ng/1 x 10⁹ bacterias, ≥12 ng/1 x 10⁹ bacterias, ≥13 ng/1 x 10⁹ bacterias o ≥14 ng/1 x 10⁹ bacterias, aún más preferiblemente ≥15 ng/1 x 10⁹ bacterias, aún más preferiblemente ≥20 ng/1 x 10⁹ bacterias, por ejemplo, ≥25 ng/1 x 10⁹ bacterias, ≥30 ng/1 x 10⁹ bacterias, ≥35 ng/1 x 10⁹ bacterias o ≥40 ng/1 x 10⁹ bacterias, y mucho más preferiblemente ≥50 ng/1 x 10⁹ bacterias o más, por ejemplo, ≥100 ng/1 x 10⁹ bacterias; y en ejemplos muy preferidos adicionales ≥200 ng/1 x 10⁹ bacterias, tales como ≥500 ng/1 x 10⁹ bacterias, o ≥1000 ng/1 x 10⁹ bacterias, o ≥2000 ng/1 x 10⁹ bacterias, o ≥5000 ng/1 x 10⁹ bacterias.

En ensayos ejemplares adicionales, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3 y 4, la cepa MG1363 o *L. casei* comprende el vector pT1 NX, en el que el promotor *thyA* de MG1363 de *L. lactis* ssp. *lactis* dirige la expresión del gen GLP-2 humano. Por consiguiente, un promotor de la invención, por ejemplo, el promotor PhIIA, es más fuerte que el promotor *thyA* cuando equivalentes de 1 ml de cultivos se cosechan al final de la fase logarítmica, se carga en SDS-PAGE y se analizan por transferencia de Western, la cantidad de GLP-2 expresado a través del promotor de la invención es mayor que a través del promotor *thyA*. Se describen ensayos ejemplares adicionales en los Ejemplos 5 a 9.

En una realización relacionada, por lo tanto, la invención también proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor (P) unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor (P), por ejemplo, un gen GLP-2, un gen hIL-10, un gen GLP-1, un gen hPYY o un gen TTF, donde el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los promotores nativos de genes de *Lactococcus* enumerados en los puntos 1) a 53) en la sección Resumen, preferiblemente los promotores nativos de genes de *Lactococcus* enumerados en los que el promotor (P) se escoge entre el grupo que consiste en los promotores nativos de genes de 1) ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad 160 kD (*rpoC*), 3) ferritina de unión a hierro no hemo (*dpsA*), 4) piruvato cinasa (*pyk*), 5) glutamínil-ARNt sintetasa (*gltX*), 6) fosfopiruvato hidratasa (*eno*), 9) dipeptidasa PepV (*pepV*), 12) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapB*), 13) acetato cinasa (*ackA*), 18) fructosa bisfosfato aldolasa (*fbaA*), 20) superóxido dismutasa (*sodA*), 21) proteína ribosomal S12 (*rpsL*) y proteína ribosomal S7 (*rpsG*), 22) proteína ribosomal L18 (*rplR*) y proteína ribosomal S5 (*rpsE*) y proteína ribosomal L30/L7E (*rpmD*), 24) proteína ribosomal L19 (*rplS*), 26) proteína ribosomal L10 (*rplJ*), 28) proteína de unión de ADN tipo HU (*hllA*), 29) proteína ribosomal 50S L28 (*rpmB*), 30) componente IIB del sistema fosfotransferasa (*ptcB*), como se define en la Tabla 1 en el punto 1) a 53), incluso más preferiblemente, el promotor enumerado en los puntos 1), 3)-6), 9), 12), 13), 18), 20)-22), 24), 26), y 28)-30) de la Tabla 1, incluso más preferiblemente, el promotor PhIIA enumerado en el punto 28), el promotor P_{dpsA} enumerado en el punto 3), el promotor P_{pepV} enumerado en el punto 9), o el promotor P_{sodA} enumerado en el punto 20), y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos. También se prefiere que el promotor (P) se escoja entre el grupo que comprende o que consiste en los ácidos nucleicos expuestos en la SEQ ID NO: 1, 3 a 6, 9, 12, 13, 18, 20 a 22, 24, 26, 28 a 54, 160, 163 a 165, 167, 169, 171 a 180, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos.

30 Dichas designaciones son evidentes para un experto e indican genes específicos de diversos taxones de *Lactococcus* (por ejemplo, especies, subespecies y cepas), tales como los taxones preferidos de *Lactococcus* que se han descrito anteriormente. No obstante, en virtud de orientación adicional, la Tabla 1 que se indica a continuación menciona números de ID de gen únicos que identifican dichos genes como la forma aislada de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 (número de acceso al Genbank para una secuencia genómica de longitud completa de SK11: NC_008527) y ssp. *lactis* MG1363. Los números de ID de gen identifican de forma única dichos genes en la base de datos "Entrez Gene" de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene) como se describe en Maglott y col. 2005. En base a esto, un experto puede identificar y aislar homólogos de dichos genes a partir de taxones adicionales de *Lactococcus* distintos de SK11 y/o MG1363, por ejemplo, las especies, subespecies y cepas preferidas como se indica en el presente documento. "Homólogos" como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias, esp. de genes, de dos o más taxones diferentes que son similares (por ejemplo, preferiblemente, pueden ser sustancialmente idénticas como se define en el presente documento) como resultado de originarse a partir de un ancestro común. Los homólogos de los genes anteriores de SK11 y/o MG1363 cumplen preferiblemente la misma función en otros taxones de *Lactococcus*.

45 Un experto en la técnica puede identificar y aislar promotores nativos que controlan la expresión de los genes enumerados en la Tabla 1 de SK11 y/o MG1363 u homólogos de los mismos a partir de taxones de *Lactococcus* adicionales (incluyendo promotores que controlan la expresión de genes que se encuentran en unidades de transcripción multi-cistrónica y, por lo tanto, no pueden contener un promotor directamente aguas arriba de su codón de inicio de la traducción, tal como es el caso en SK11 y/o MG1363, a modo de ilustración, para *rpsL* - *rpsG*, dirigiendo el promotor aguas arriba de *rpsL* la transcripción de ambos; o para *rplR* - *rpsE* - *rpmD*, dirigiendo el promotor aguas arriba de *rpsL* la transcripción de todos; o para *rplD* - *rplW* - *rplB*, dirigiendo el promotor aguas arriba de *rplD* la transcripción de todos; o para *rpsS* - *rplU* - *rplP* - *rplN*, dirigiendo el promotor aguas arriba de *rpsS* la transcripción de todos; o para *rpsM*, dirigiendo un promotor aguas arriba de un gen aguas arriba *infA* que codifica un factor de inicio de la traducción 1 (IF-1) la transcripción de *rpsM*) siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva y usando el conocimiento común en la técnica.

En una realización preferida, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor (P) unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor (P), donde el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los promotores nativos de los genes de *Lactococcus*

enumerados en los puntos 1) a 30) en la sección Resumen (es decir, los primeros 30 genes en la Tabla 1), incluso más preferiblemente el promotor enumerado en los puntos 1), 3)-6), 9), 12), 13), 18), 20)-22), 24), 26), y 28)-30) de la Tabla 1, incluso más preferiblemente el promotor PhIIA enumerado en el punto 28), el promotor de la proteína tipo ferritina de unión a ADN (protector del daño oxidativo) (*dps*) enumerado en el punto 3), el promotor de Xaa-His dipeptidasa (*argE* o *pep V*) enumerado en el punto 9), o el promotor superóxido dismutasa (*sodA*) enumerado en el punto 20), y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos.

En una realización preferida, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor (P) unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos al promotor (P), donde el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los ácidos nucleicos expuestos en la SEQ ID NO: 1 a 54 y 157 a 180, y homólogos de los mismos, incluso más preferiblemente, SEQ ID NO: 1, 3 a 6, 9, 12, 13, 18, 20 a 22, 24, 26, 28 a 54, 160, 163 a 165, 167, 169, 171 a 180, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos, incluso más preferiblemente, SEQ ID NO: 1, 3 a 6, 9, 12, 13, 18, 20 a 22, 24, 26, 28 a 30, 160, 163 a 165, 167, 169 y 171, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos promotores nativos, preferiblemente las SEQ ID NO: 28, 3, 9, 158 y/o 20, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de los mismos.

Dichas secuencias SEQ ID NO: 1 a 54 y 157 a 180, representan promotores nativos ejemplares, pero no limitantes, asociados a la expresión de los genes enumerados en los puntos 1) a 53) anteriores (como se indica en más detalle en la Tabla 1) en MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y/o SK11 de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Por consiguiente, estos promotores y homólogos de los mismos (esp. de taxones de *Lactococcus* distintos de MG1363 y/o SK11) y variantes funcionales y derivados funcionales de los mismos, pueden ser útiles en los ácidos nucleicos recombinantes de la invención para realizar la expresión de marcos de lectura abiertos útiles en células huésped, preferiblemente en células huésped bacterianas, incluso más preferiblemente en *Lactococcus*, aún más preferiblemente en *Lactococcus lactis*, todavía más preferiblemente en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, tal como en una cepa ejemplar preferida MG1363.

En una realización preferida adicional, el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los ácidos nucleicos expuestos en las SEQ ID NO: 1 a 54, y 157 a 180, más preferiblemente las SEQ ID NO: 1, 3 a 6, 9, 12, 13, 18, 20 a 22, 24, 26, 28 a 54, 160, 163 a 165, 167, 169, 171 a 180, incluso más preferiblemente, las SEQ ID NO: 1, 3 a 6, 9, 12, 13, 18, 20 a 22, 24, 26, 28 a 30, 160, 163 a 165, 167, 169 y 171, mucho más preferiblemente las SEQ ID NO: 28, 3, 9, 158 y/o 20, y homólogos de los mismos, variantes funcionales y/o fragmentos funcionales de los mismos.

Aún en una realización preferida adicional, el promotor (P) se escoge entre el grupo que comprende o que consiste en los ácidos nucleicos expuestos en las SEQ ID NO: 1 a 30, y 157 a 171, más preferiblemente las SEQ ID NO: 28, 3, 9, 158 y/o 20, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de los mismos.

En otra realización preferida, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención comprenden adicionalmente una secuencia terminadora de la transcripción 3' con respecto a dichos uno o más marcos de lectura abiertos. Por ejemplo, si únicamente está presente un marco de lectura abierto, la secuencia terminadora puede situarse ventajosamente aguas abajo, es decir, 3', del mismo. Si el ácido nucleico recombinante contiene dos o más ORF, por ejemplo, ordenados sucesivamente y que forman juntos una unidad de transcripción multicistónica, el terminador de la transcripción puede situarse ventajosamente 3' con respecto al ORF más aguas abajo.

La expresión "terminador de la transcripción" se refiere a un elemento de secuencia al final de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Preferiblemente, un terminador de la transcripción para su uso en la presente invención, señalará la terminación de la transcripción en células huésped destinadas para su uso con los ácidos nucleicos recombinantes de la invención, tales como, por ejemplo, en células huésped bacterianas, incluso más preferiblemente en *Lactococcus*, aún más preferiblemente en *Lactococcus lactis*. Las técnicas para la identificación y el aislamiento de los terminadores adecuados, por ejemplo, terminadores de *Lactococci*, se conocen en la técnica (por ejemplo, véase van der Vossen y col., 1985), ya que son terminadores ejemplares, por ejemplo, véase van der Vossen y col., (1992), etc.

En una realización preferida adicional, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención comprenden adicionalmente un operador configurado para controlar la transcripción del promotor (P). Como se usa en el presente documento, el término "operador" se refiere a una secuencia nucleotídica, preferiblemente una secuencia de ADN, que controla el inicio y/o el mantenimiento de la transcripción de una secuencia de un promotor.

Típicamente, un operador puede colocarse en general entre un promotor y una secuencia aguas abajo, cuya transcripción controlan los promotores. Normalmente, un operador es capaz de unir un polipéptido represor, por lo que reduce la transcripción de dicho promotor. Un represor útil puede alternar entre un estado en el que se une al operador, y un estado en el que no, y dicha alternancia puede controlarse ventajosamente por una condición
 5 externa, por ejemplo, una sustancia externa o un metabolito en particular. Por consiguiente, en las células huésped que comprenden un represor compatible, la inclusión de un operador en el ácido nucleico de la invención puede permitir controlar la actividad del promotor y la expresión del mismo. Los operadores-sistemas de represor ejemplares incluyen, por ejemplo, el sistema *lac* y también véase, por ejemplo, Nauta y col. (1996), o el sistema de biosíntesis de histidina (véase, por ejemplo, Delorme y col., 1999). Las secuencias de operador pueden obtenerse
 10 generalmente a partir de cromosomas bacterianos.

En una realización preferida adicional, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención comprenden adicionalmente secuencias configuradas para realizar la inserción de dichos ácidos nucleicos recombinantes en el genoma, por ejemplo, un cromosoma, de una célula huésped.

15 En un ejemplo particularmente preferido, la inserción de los ácidos nucleicos de la invención en sitios particulares dentro de un genoma, por ejemplo, un cromosoma, de una célula huésped puede facilitarse por recombinación homóloga. Por ejemplo, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden comprender una o más regiones de homología para dicho sitio de integración dentro del genoma, por ejemplo, un cromosoma, de la célula huésped.
 20 La secuencia en dicho sitio del genoma, por ejemplo, un cromosoma, puede ser natural, es decir, como aparece en la naturaleza, o puede ser una secuencia exógena introducida por ingeniería genética anterior.

Por ejemplo, dicha región o regiones de homología pueden ser de al menos 50 pb, preferiblemente al menos 100 pb, por ejemplo, al menos 200 pb, más preferiblemente al menos 300 pb, por ejemplo, al menos 400 pb, incluso más
 25 preferiblemente al menos 500 pb, por ejemplo, al menos 600 pb o al menos 700 pb, aún más preferiblemente al menos 800 pb, por ejemplo, al menos 900 pb, o al menos 1000 pb o más.

En un ejemplo preferido, pueden incluirse dos regiones de homología, una flanqueando cada lado de la unidad o unidades de expresión presentes en los ácidos nucleicos de la invención. Dicha configuración puede insertar
 30 ventajosamente las secuencias relevantes, es decir, las que realizan la expresión de los marcos de lectura abiertos de interés a partir de los promotores de la invención, en las células huésped. En general, se conocen en la técnica maneras de realizar la recombinación homóloga, especialmente en huéspedes bacterianos, y seleccionar los recombinantes. Un método ejemplar y preferido es, por ejemplo, el de Steidler y col. (2003) para introducir secuencias exógenas en el locus *thyA* de *Lactococcus*.

35 Por lo tanto, en una realización preferida, la invención también proporciona el ácido nucleico recombinante al integrarse en el genoma, por ejemplo, un cromosoma, preferiblemente un cromosoma bacteriano, más preferiblemente un cromosoma *Lactococcus*. Dicha integración puede obtenerse en una célula huésped transformada con dicho ácido nucleico recombinante o un vector que comprende la misma, como se describe en otra
 40 parte en esta memoria descriptiva.

En una realización preferida, el uno o más marcos de lectura abiertos unidos a un promotor de la invención en los ácidos nucleicos de la invención codifican un polipéptido.

45 Como puede apreciarse, la esencia de la invención se refiere principalmente a promotores novedosos y sus usos, y la naturaleza de dichos productos de expresión, preferiblemente polipéptidos, no se limita de ningún modo.

No obstante, las células huésped que comprenden marcos de lectura abiertos controlados por el promotor de *Lactococcus* se han indicado como medios para la producción *in vitro* (véanse, por ejemplo, el documento US
 50 5.559.007; Steidler y col., 1995; Wells y col., 1993B) y la administración *in vivo* (véase, por ejemplo, los documentos WO 97/14806; WO 01/02570; Steidler y col., 2003; Steidler y col., 2000) de polipéptidos relevantes de origen vírico, procarionta o eucariota, incluyendo polipéptidos útiles en la prevención o terapia de una enfermedad en el hombre y animales.

55 Por consiguiente, en una realización, dichos uno o más marcos de lectura abiertos de los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden codificar un producto de expresión, preferiblemente, un polipéptido, capaz de provocar una respuesta terapéutica en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano o animal.

En una realización particularmente útil, ejemplar y no limitante, dichos uno o más marcos de lectura abiertos de los

ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden codificar un antígeno y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere generalmente a una sustancia que provoca una respuesta inmunitaria, que incluye respuesta inmunitaria humoral y/o inmunitaria celular, y que es capaz de unirse con un producto, por ejemplo, un anticuerpo o un linfocito T, de la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, en un ejemplo preferido, un antígeno requiere que el sujeto al que se le administra posea un sistema inmunológico funcional para provocar una respuesta fisiológica de dicho sujeto. El "antígeno" de la presente invención también incluye "auto-antígenos" que no provocan una respuesta inmunitaria en un individuo sano, pero lo harán en una persona que padece una enfermedad autoinmune, es decir, el fracaso de un organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (abajo con respecto al nivel sub-molecular) como "propias", que da como resultado una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que sea resultado de tal respuesta inmunitaria aberrante se denomina una enfermedad autoinmune. Por consiguiente, el "antígeno" de la presente invención también incluye una proteína (fisiológicamente activa) que no provocará una respuesta inmunitaria en un individuo sano, pero que lo hará en una persona genéticamente deficiente en dicha proteína. Además, el "antígeno" de la presente invención también incluye un alérgeno que no provocará una respuesta inmunitaria en un individuo sano, pero que lo hará en una persona que padece una enfermedad alérgica.

Un antígeno de acuerdo con la invención puede obtenerse a partir de cualquier polipéptido para el que una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal será terapéuticamente útil, por ejemplo, de un patógeno, por ejemplo, de un patógeno vírico, procariota (por ejemplo, bacteriano) o eucariota, de una proteína no fisiológica (por ejemplo, una proteína derivada de tejido canceroso), de un alérgeno (por ejemplo, para provocar una tolerancia inmunitaria), etc. Un antígeno también puede ser un metabolito de una proteína. Como un ejemplo, el antígeno puede ser un polisacárido, un lípido u otro. Los promotores fuertes que se describen aquí, pueden conducir la expresión de las enzimas necesarias para sintetizar o ensamblar dicho polisacárido, lípido u otro.

La expresión "un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo" se refiere generalmente a un polipéptido que, en un sujeto humano o animal al que se administra, no provoca una respuesta inmunitaria contra sí mismo, y es capaz de conseguir un efecto terapéutico. Por lo tanto, el efecto terapéutico de tal polipéptido se esperará que esté directamente unido a su propia función biológica natural, de manera que puede conseguir efectos particulares en un cuerpo de un sujeto; en lugar de producir un efecto terapéutico actuando como un antígeno inmunógeno y/o inmunoprotector en el sujeto. Por lo tanto, el polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo debe ser biológicamente activo en su forma expresada o, al menos, debe convertirse en la forma biológicamente activa una vez liberado de la célula huésped que lo expresa. Preferiblemente, dicha forma biológicamente activa de dicho polipéptido puede mostrar una conformación secundaria y, preferiblemente, también terciaria que sea la misma o estrechamente análoga a su configuración nativa.

Preferiblemente, el polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo también es no tóxico y no patógeno.

En una realización preferida, el polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo puede obtenerse a partir de un ser humano o animal, y puede corresponder preferiblemente al mismo taxón que el sujeto humano o animal al que se va a administrar.

Los ejemplos no limitantes de polipéptidos no vacinógenos terapéuticamente activos adecuados incluyen los que son capaces de funcionar localmente o sistémicamente, por ejemplo, es un polipéptido capaz de ejercer actividades endocrinas que afectan el metabolismo local o de todo el cuerpo y/o el polipéptido o polipéptidos biológicamente activos son aquellos capaces de regular las actividades de las células pertenecientes al sistema inmunohematopoyético y/o uno o más polipéptidos biológicamente activos son aquellos capaces de afectar la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de una variedad de células normales o neoplásicas en el cuerpo o de afectar la regulación inmunológica o la inducción de respuestas inflamatorias de fase aguda a lesiones e infecciones y/o uno o más polipéptidos biológicamente activos son aquellos capaces de mejorar o inducir resistencia a la infección de las células y los tejidos mediante quimiocinas que actúan sobre sus receptores en la célula diana, o la proliferación de células epiteliales o la promoción de la cicatrización de heridas y/o uno o más polipéptidos biológicamente activos modulan la expresión o la producción de sustancias por las células en el cuerpo.

Los ejemplos específicos de dichos polipéptidos incluyen, sin limitación, insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, somatostatina, hormona estimulante de las tiroides, polipéptido intestinal vasoactivo, citocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, cualquiera de IL-14 a IL-32, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFNs, EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL, la familia

TNF de las citocinas, por ejemplo, TNFa, TNFb, CD40, CD27 o ligandos FAS, la familia IL-1 de las citocinas, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento transformantes y factores de crecimiento de nervios, la familia del factor de crecimiento epidérmico de citocinas, la insulina relacionada con citocinas, etc. Como alternativa, el polipéptido terapéuticamente activo puede ser un receptor o antagonista para los polipéptidos terapéuticamente activos como se definen anteriormente. Los ejemplos específicos adicionales de tales polipéptidos adecuados se enumeran, en el documento WO 96/11277, página 14, líneas 1-30; en el documento WO 97/14806, página 12, línea 1 a página 13, línea 27; o el documento US 5.559.007, col. 8, línea 31 a col. 9, línea 9. Preferiblemente, el polipéptido adecuado es el péptido IL-10, por ejemplo, la IL-10 humana (hIL-10), por ejemplo, como se ilustra en el Ejemplo 2, 5 o 9.

En una realización preferida, el polipéptido adecuado es un péptido Trefoil, tal como TFF1, TFF2 y/o TFF3. Se han identificado tres miembros de esta familia de péptidos trefoil en seres humanos y se designan originalmente: pS2 (gen inducible de estrógenos de cáncer de mama, Lefebvre, 1993), SP (péptido espasmolítico) e ITF (factor trefoil intestinal). En la presente nomenclatura, pS2 se renombra como TFF1, SP como TFF2 y ITF como TFF3 (véase, por ejemplo, Wong y col., 1999). Esta nueva nomenclatura se usa a lo largo del presente texto. En seres humanos, ratones y ratas, TFF1 y TFF2 se encuentran predominantemente en el estómago, mientras que TFF3 se encuentra predominantemente en el duodeno y el colon. Se cree que TFF1 actúa a través del receptor de superficie celular (Tan y col., 1997). Wong y col. (1999) proporcionan una revisión reciente de los péptidos trefoil. Los péptidos trefoil se secretan por las células epiteliales del moco y son estables en un entorno ácido. Estos péptidos contribuyen a la protección de la mucosa (formación de un gel sobre el epitelio) y están implicados probablemente en la reparación de la mucosa dañada por la estimulación de migración epitelial (Playford y col., 1996). La producción de péptidos trefoil aumenta localmente en regiones en las que se produce un daño, tal como úlceras gástricas y colitis (Wright y col., 1990). Babyatsky y col. (1996) han mostrado que la administración de péptidos trefoil recombinantes reduce el daño en estos lugares. En contradicción con la mayoría de las proteínas que son importantes para la protección de la mucosa (tal como el factor del crecimiento epidérmico), la mayoría de los estudios han demostrado que los péptidos trefoil causan poca o ninguna proliferación (Playford y col., 1996).

En otra realización preferida, el polipéptido adecuado es el péptido PYY, por ejemplo, el PYY humano (hPYY), e incluso más preferiblemente la variante hPYY Gly9 (3-36) como se ilustra en el Ejemplo 7.

En una realización preferida adicional, el polipéptido adecuado es el péptido tipo glucagón 1 (GLP-1 o GLP1), por ejemplo, el GLP-1 humano (hGLP-1), e incluso más preferiblemente la variante hGLP-1 Glicina 8 (7-36) como se ilustra en el Ejemplo 8. En una realización preferida, el polipéptido adecuado es el péptido tipo glucagón 2 (GLP-2 o GLP2). El gen proglucagón humano (GenBank acc. n.º NM_002054) codifica una prepro-proteína que se escinde en cuatro péptidos maduros distintos, incluyendo péptido tipo glucagón 2 (GLP-2). GLP-2 administrado externamente produce varios efectos en los individuos, por ejemplo, en seres humanos, incluyendo crecimiento intestinal, mejora de la función intestinal, reducción de la ruptura ósea y neuroprotección. GLP-2 puede actuar de forma endocrina para unir el crecimiento intestinal y el metabolismo con la ingesta de nutrientes. GLP-2, y análogos relacionados, pueden ser tratamientos para el síndrome del intestino corto, enfermedad de Crohn, osteoporosis y como terapia adyuvante durante quimioterapia por cáncer. Preferiblemente, el gen GLP-2 se adapta al uso del codón preferido en *Lactococcus*, por ejemplo, *L. lactis*. Preferiblemente, el gen codifica la secuencia aminoacídica

HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD.

En otra realización preferida, el gen codifica un análogo de GLP-2 humano maduro con una sustitución de alanina a glicina en la posición 2, que se muestra que reduce la susceptibilidad a la degradación por dipeptidil peptidasa-IV (Booth y col., 2004), por ejemplo, el gen codifica la secuencia aminoacídica HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD.

En una realización incluso más preferida, el gen GLP-2 está adaptado al uso del codón preferido en *Lactococcus* y comprende una sustitución de alanina a glicina en la posición 2, por ejemplo, la secuencia nucleotídica de h[Gly2]GLP-2:

CACGGTGATGGTTCATTTTCAGATGAAATGAACACTATCCTTGATAACCTTGCTGCTCGTGATTTTAT

CAACTGGCTTATCCAAACTAAAATCACTGATTAA.

Por consiguiente, en una realización, el ácido nucleico recombinante de la invención codifica un antígeno y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo, en el que dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora, en un sujeto humano o animal, y/o dicho

polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es capaz de producir un efecto terapéutico en un sujeto humano o animal.

El documento WO 97/14806 desvela específicamente adicionalmente la co-expresión de antígenos con moléculas 5 estimuladoras de la respuesta inmune, tales como, por ejemplo, interleucinas, por ejemplo, IL-2 o IL-6, mediante bacterias. Por consiguiente, también se contempla tal co-expresión usando los promotores de la invención.

En una realización preferida adicional, el marco de lectura abierto de acuerdo con la invención comprende 10 adicionalmente una secuencia que codifica una señal de secreción en fase con un polipéptido codificado por el ORF. Esto permite ventajosamente la secreción del polipéptido expresado a partir de la célula huésped y puede facilitar de esta manera, por ejemplo, el aislamiento o la administración.

Típicamente, una secuencia señal de secreción representa un segmento de aproximadamente 16 a 15 aproximadamente 35 aminoácidos, que contiene normalmente aminoácidos hidrófobos que se embeben en la membrana bicapa lipídica, y permiten de este modo la secreción de una secuencia proteica o peptídica adjunta de la célula huésped, y que normalmente se escinde de esta proteína o péptido. Preferiblemente, la secuencia señal de secreción puede estar activa de este modo en una célula huésped destinada para su uso con el ácido nucleico que comprende dicha secuencia señal, por ejemplo, una célula huésped bacteriana, preferiblemente una bacteria de ácido láctico, más preferiblemente *Lactococcus*, incluso más preferiblemente *Lactococcus lactis*. Las secuencias 20 señal de secreción en células huésped adecuadas se conocen en la técnica; las secuencias señal de *Lactococcus* ejemplares incluyen las de usp45 (véase, el documento US 5.559.007) y otros, véase, por ejemplo, Perez-Martinez y col. (1992); Sibakov y col. (1991). Preferiblemente, la secuencia señal se sitúa entre la secuencia promotora y el ORF, es decir, la secuencia señal se sitúa 3' de la secuencia promotora y precede al ORF del polipéptido de interés. En una realización preferida, la secuencia señal codifica la secuencia aminoacídica MKKKIISAIL MSTVLSAAA 25 PLSGVYA (usp45).

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que la combinación del promotor PhIIA con una secuencia señal de usp45 mutada da como resultado una producción y secreción controlable adicional del polipéptido de interés. En particular, el mutante comprende una asparagina (N) en la posición 4 en lugar de una 30 lisina (K). En una realización preferida, la secuencia señal codifica la secuencia aminoacídica MKKNIISAIL MSTVLSAAA PLSGVYADTN.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a ácido nucleico recombinante como se define en el presente documento, en la que dicho ácido nucleico recombinante comprende:

- 35
- (a) PdpsA, usp45 y hIL-10 (sAGX0012); PdpsA, usp45N4 y hIL-10; PpepV, usp45 y hIL-10 (sAGX0018); PpepV, usp45N4 y hIL-10; PsodA, usp45 y hIL-10 (sAGX0029); PsodA, usp45N4 y hIL-10; PhIIA, usp45 y hIL-10 (sAGX0037); PhIIA, usp45N4 y hIL-10;
 - 40 (b) PdpsA, usp45N4 y hTFF1; PdpsA, usp45 y hTFF1; PpepV, usp45N4 y hTFF1; PpepV, usp45 y hTFF1; PsodA, usp45N4 y hTFF1; PsodA, usp45 y hTFF1; PhIIA, usp45N4 y hTFF1 (sAGX0048); PhIIA, usp45 y hTFF1 (sAGX0049);
 - (c) PdpsA, usp45N4 y hTFF3; PdpsA, usp45 y hTFF3 (sAGX0048); PpepV, usp45N4 y hTFF3; PpepV, usp45 y hTFF3; PsodA, usp45N4 y hTFF3; PsodA, usp45 y hTFF3; PhIIA, usp45N4 y hTFF3 (sAGX0057); PhIIA, usp45 y hTFF3;
 - 45 (d) PdpsA, usp45N4 y hPYY; PdpsA, usp45 y hPYY (sAGX0048); PpepV, usp45N4 y hPYY; PpepV, usp45 y hPYY; PsodA, usp45N4 y hPYY; PsodA, usp45 y hPYY; PhIIA, usp45N4 y hPYY (sAGX0057); PhIIA, usp45 y hPYY; PhIIA, usp45 y hPYY G9 (3-36) (sAGX0213);
 - (e) PdpsA, usp45N4 y GLP-1; PdpsA, usp45 y GLP-1; PpepV, usp45N4 y GLP-1; PpepV, usp45 y GLP-1; PsodA, usp45N4 y GLP-1; PsodA, usp45 y GLP-1; PhIIA, usp45N4 y GLP-1; PhIIA, usp45 y GLP-1;
 - 50 (f) PdpsA, usp45N4 y GLP-2; PdpsA, usp45 y GLP-2; PpepV, usp45N4 y GLP-2; PpepV, usp45 y GLP-2; PsodA, usp45N4 y GLP-2; PsodA, usp45 y GLP-2; PhIIA, usp45N4 y GLP-2; o PhIIA, usp45 y GLP-2.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de la invención.

55 Como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, típicamente ADN, en la que se pueden insertar y clonar, es decir, propagar, fragmentos de ácidos nucleicos. Por lo tanto, un vector contendrá típicamente uno o más sitios de restricción únicos, y puede tener capacidad de replicación autónoma en un organismo huésped o vehículo definido de tal manera que la secuencia clonada es reproducible. Los vectores

pueden incluir, sin limitación, plásmidos, fagémidos, bacteriófagos, vectores derivados de bacteriófagos, PAC, BAC, ácidos nucleicos lineales, por ejemplo, ADN lineal, etc., según sea adecuado (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989; Ausubel 1992).

5 Los factores de importancia en la selección de un vector particular, por ejemplo, un plásmido, incluyen, entre otros: la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse entre las células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un huésped particular; y si es deseable poder "intercambiar" el vector entre las células huésped de diferentes especies. Los vectores procariotas preferidos incluyen plásmidos tales como los que tienen capacidad de replicación en *E. coli* (tales como, por ejemplo, pBR322, ColE1, pSC101, pUC19, etc.). Dichos plásmidos se describen en, por ejemplo, Sambrook y col., 1989; Ausubel 1992. Los vectores particularmente preferidos pueden ser los que son capaces de replicar en *E. coli* (u otras bacterias Gram negativas), así como en otra célula huésped de interés, tal como en una bacteria Gram positiva, una bacteria de ácido láctico, preferiblemente *Lactococcus*, más preferiblemente *Lactococcus lactis* (véase, por ejemplo, Kok y col. (1984). Otros vectores preferidos pueden ser aquellos capaces de replicarse y/o intercambiarse entre una o más bacterias Gram positivas, pero no en bacterias Gram negativas. En una realización preferida, el vector es pT1NX como se describe por Steidler y col., (1998), que se incorpora específicamente por referencia en el presente documento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula huésped transformada con el ácido nucleico recombinante y/o con el vector de la invención. Por ejemplo, dicha transformación puede ser útil para la propagación y mantenimiento de dicho ácido nucleico o vectores.

Como alternativa, o además, y ventajosamente, una célula huésped transformada será capaz de transcribir el marco o marcos de lectura abiertos del ácido nucleico de la invención usando los promotores de la invención y, preferiblemente, expresar los productos de expresión, preferiblemente uno o más polipéptidos, codificados por dichos marcos de lectura abiertos.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso del ácido nucleico recombinante o vector de la invención para conseguir la expresión de productos de expresión, preferiblemente uno o más polipéptidos, codificados por dichos marcos de lectura abiertos, en una célula huésped. Preferiblemente, los productos de expresión, por ejemplo, polipéptidos, pueden ser heterólogos, es decir, exógenos, a dicha célula huésped.

Preferiblemente, una célula huésped será una célula procariota, por ejemplo, una célula bacteriana, más preferiblemente una bacteria no patógena y/o no invasiva, aún más preferiblemente una bacteria Gram-positiva, todavía más preferiblemente una bacteria de ácido láctico (por ejemplo, *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp. o *Bifidobacterium* spp.), muy preferiblemente una bacteria de *Lactococcus*, y mucho más preferiblemente una bacteria de *Lactococcus lactis*, por ejemplo, como se ha definido anteriormente; en la medida en que los promotores de la invención están activos adecuadamente en dichas células huésped.

El ácido nucleico recombinante o el vector de la invención pueden estar presentes en la célula huésped de manera extra-cromosómica, preferentemente con replicación autónoma usando un propio origen de replicación, o puede estar integrado en el ADN genómico bacteriano, por ejemplo, un cromosoma bacteriano, por ejemplo, en el cromosoma de *Lactococcus*. En este último caso, una o varias copias de dicho ácido nucleico pueden integrarse, preferiblemente una única copia; la integración puede tener lugar en un sitio al azar del cromosoma o, como se ha descrito anteriormente, en un sitio predeterminado del mismo, preferiblemente en un sitio predeterminado, tal como, en un ejemplo preferido no limitante, en el locus *thyA* de *Lactococcus*, por ejemplo, de *Lactococcus lactis*, por ejemplo, como se describe por Steidler y col., (2003), que se incorpora específicamente por referencia en el presente documento.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante, como se define en el presente documento, en el que dicho promotor (P) está presente en el cromosoma de dicha célula huésped, y en el que dicho promotor (P) está unido operativamente a uno o más marcos de lectura abiertos heterólogos a dicho promotor (P), más preferiblemente, dicho promotor (P) comprende adicionalmente una secuencia señal, preferiblemente *usp45* o *usp45N4*, más preferiblemente dicho promotor (P) comprende adicionalmente un operador configurado para controlar la transcripción de dicho promotor (P), e incluso más preferiblemente, el promotor (P) se escoge entre el grupo que consiste en los ácidos nucleicos expuestos en las SEQ ID NO: 1, 3 a 6, 9, 12, 13, 18, 20 a 22, 24, 26, 28 a 54, 160, 163 a 165, 167, 169, 171 a 180, y homólogos de los mismos, y variantes funcionales y fragmentos funcionales de los mismos.

- En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula huésped como se define en el presente documento, en la que dicho uno o más marcos de lectura abiertos codifican un polipéptido capaz de provocar una respuesta terapéutica o respuesta inmunógena en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano o animal, preferiblemente dichos uno o más marcos de lectura abiertos codifican un antígeno y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo, incluso más preferiblemente dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta de tolerancia inmunitaria, en un sujeto humano o animal, y/o dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es capaz de producir un efecto terapéutico en un sujeto humano o animal. En un aspecto preferido adicional, la invención proporciona una célula huésped como se define en el presente documento, en la que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es hIL-10, GLP-2, GLP-1, TFF o hPYY. En otro aspecto preferido más, la invención proporciona una célula huésped como se define en el presente documento, en la que dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria y se usa como una vacuna en un sujeto humano o animal, y/o.
- 15 En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a una célula huésped como se define en el presente documento, en la que dicha célula huésped comprende:
- (a) PdpsA, usp45 y hIL-10 (sAGX0012); PdpsA, usp45N4 y hIL-10; PpepV, usp45 y hIL-10 (sAGX0018); PpepV, usp45N4 y hIL-10; PsodA, usp45 y hIL-10 (sAGX0029); PsodA, usp45N4 y hIL-10; PhIIA, usp45 y hIL-10 (sAGX0037); PhIIA, usp45N4 y hIL-10;
- (b) PdpsA, usp45N4 y hTFF1; PdpsA, usp45 y hTFF1; PpepV, usp45N4 y hTFF1; PpepV, usp45 y hTFF1; PsodA, usp45N4 y hTFF1; PsodA, usp45 y hTFF1; PhIIA, usp45N4 y hTFF1 (sAGX0048); PhIIA, usp45 y hTFF1 (sAGX0049);
- (c) PdpsA, usp45N4 y hTFF3; PdpsA, usp45 y hTFF3 (sAGX0048); PpepV, usp45N4 y hTFF3; PpepV, usp45 y hTFF3; PsodA, usp45N4 y hTFF3; PsodA, usp45 y hTFF3; PhIIA, usp45N4 y hTFF3 (sAGX0057); PhIIA, usp45 y hTFF3;
- (d) PdpsA, usp45N4 y hPYY; PdpsA, usp45 y hPYY (sAGX0048); PpepV, usp45N4 y hPYY; PpepV, usp45 y hPYY; PsodA, usp45N4 y hPYY; PsodA, usp45 y hPYY; PhIIA, usp45N4 y hPYY (sAGX0057); PhIIA, usp45 y hPYY; PhIIA, usp45 y hPYY G9 (3-36) (sAGX0213);
- (e) PdpsA, usp45N4 y GLP-1; PdpsA, usp45 y GLP-1; PpepV, usp45N4 y GLP-1; PpepV, usp45 y GLP-1; PsodA, usp45N4 y GLP-1; PsodA, usp45 y GLP-1; PhIIA, usp45N4 y GLP-1; PhIIA, usp45 y GLP-1;
- (f) PdpsA, usp45N4 y GLP-2; PdpsA, usp45 y GLP-2; PpepV, usp45N4 y GLP-2; PpepV, usp45 y GLP-2; PsodA, usp45N4 y GLP-2; PsodA, usp45 y GLP-2; PhIIA, usp45N4 y GLP-2; o PhIIA, usp45 y GLP-2.
- 35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la expresión recombinante de un producto de expresión, preferiblemente un polipéptido, de interés que comprende:
- a) cultivar la célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante o vector de la invención, donde dicho uno o más marcos de lectura abiertos codifican el producto de expresión, preferiblemente un polipéptido, de interés, y
- b) aislar el producto de expresión, preferiblemente un polipéptido, de interés producido por la célula huésped en dicho cultivo.
- Un experto en la técnica conoce generalmente y puede optimizar adicionalmente las condiciones de cultivo, por ejemplo, temperatura, presencia y concentración los nutrientes necesarios, oxigenación, agitación, inoculación, etc. que permiten la expresión de los polipéptidos en las células huésped, preferiblemente las células huésped de la invención.
- Un experto en la técnica también conoce y puede optimizar adicionalmente las técnicas de purificación para el aislamiento de los productos de expresión, tales como, preferiblemente polipéptidos, expresados por dichas células huésped. Por ejemplo, las técnicas adecuadas de aislamiento de proteínas pueden implicar la lisis del organismo huésped (por ejemplo, cuando el polipéptido se acumula intracelularmente), por ejemplo, por alteración mecánica o enzimática de la pared celular, y la eliminación de los residuos celulares, o la recogida del sobrenadante (por ejemplo, cuando los polipéptidos se secretan), la eliminación de los componentes distintos de proteínas, tal como el ADN y los lipopolisacáridos, precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de exclusión de tamaño, por ejemplo, para enriquecer la proteína deseada, cromatografía de afinidad, etc.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de la célula huésped transformada con el ácido nucleico recombinante y/o el vector de la invención para la fabricación de un medicamento para la administración del

producto o productos de expresión, preferiblemente uno o más polipéptidos, codificados por el uno o más marcos de lectura abiertos comprendidos dentro de dicho ácido nucleico recombinante para un ser humano o animal.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para la administración de un polipéptido codificado por el uno o más marcos de lectura abiertos comprendidos dentro del ácido nucleico recombinante de la invención para un ser humano o animal que necesita el mismo, que comprende administrar a dicho ser humano o animal una cantidad terapéuticamente eficaz de células huésped transformadas con dicho ácido nucleico y/o vector de la invención. El animal puede ser preferiblemente un mamífero, tal como, por ejemplo, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico, animales deportivos, mascotas y animales experimentales, tales como perros, 10 gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos, tales como perros y lobos; felinos, tales como gatos, leones y tigres; equinos, tales como caballos, burros y cebras; animales destinados a la alimentación, tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados, tales como ciervos y jirafas; roedores, tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; etc.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Un "ser humano o animal que necesita tratamiento" incluye uno que pudiera beneficiarse del tratamiento de una afección dada.

20 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia o composición terapéutica eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal, es decir, para obtener un efecto local o sistémico y un rendimiento deseado. A modo de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de bacterias puede comprender al menos 1 bacteria, o al menos 10 bacterias, o al menos 10² bacterias, o al menos 10³ bacterias, o al menos 10⁴ bacterias, o al menos 10⁵ bacterias, o al menos 25 10⁶ bacterias, o al menos 10⁷ bacterias, o al menos 10⁸ bacterias, o al menos 10⁹, o al menos 10¹⁰, o al menos 10¹¹, o al menos 10¹², o al menos 10¹³, o al menos 10¹⁴, o al menos 10¹⁵, o más células huésped, por ejemplo, bacterias, por ejemplo, en una dosis individual o repetida.

Las células huésped de la presente invención pueden administrarse en solitario o en combinación con uno o más 30 compuestos activos. Estos últimos pueden administrarse antes, después o simultáneamente con la administración de dichas células huésped.

Existen varias divulgaciones de la técnica anterior sobre la administración de antígenos y/o polipéptidos terapéuticamente activos, y debe apreciarse que tales divulgaciones pueden modificarse de manera más ventajosa 35 con los promotores fuertes de la presente invención. A modo de ejemplo y no de limitación, la administración bacteriana de interleucinas, particularmente IL-10, para el tratamiento de la colitis (por ejemplo, véase el documento WO 00/23471), la administración de antígenos como vacunas (por ejemplo, documento WO 97/14806), la administración de GLP-2 y análogos relacionados, pueden usarse para tratar una enfermedad del intestino delgado, enfermedad de Crohn, osteoporosis y como terapia adyuvante durante la quimioterapia de cáncer, etc. Además, 40 puede usarse la administración bacteriana de péptidos trébol para tratar enfermedades del tubo digestivo (véase, por ejemplo, el documento WO 01/02570). En particular, el uso de proteínas o péptidos trébol para el tratamiento de trastornos de y daños al tubo digestivo, incluyendo la boca, el esófago, el estómago y el intestino grueso y delgado, así como para la protección y tratamiento de tejidos que se encuentran fuera del tubo digestivo, se describen en los documentos WO 97/38712 y WO 92/14837. Estas proteínas pueden usarse para tratar lesiones en estas áreas o 45 para inhibir la formación de lesiones. Estas lesiones pueden causarse por: terapia de radiación o quimioterapia para el tratamiento de cáncer, cualquier otro fármaco que incluya alcohol que dañe el tubo digestivo, una exposición accidental a radiación o a una sustancia cáustica, infección, un trastorno digestivo, incluyendo, pero sin limitación, dispepsia no ulcerosa, gastritis, úlcera péptica o duodenal, cáncer gástrico, linfoma MALT, síndrome de Menetier, enfermedad por reflujo gastroesofágico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y colitis aguda de origen químico, 50 bacteriano o desconocido. Los péptidos trefoil son particularmente útiles para tratar la colitis aguda. Se prevén aplicaciones terapéuticas adicionales que usan los promotores y células huésped de la invención.

Los ejemplos no limitantes adicionales de los tipos de enfermedades tratables en seres humanos o animales por administración de polipéptidos terapéuticos de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, 55 enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (tratables con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10 o péptidos trefoil); enfermedades autoinmunes, incluyendo, pero sin limitación, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso (tratables con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10 o el auto-antígeno relevante); enfermedades alérgicas, incluyendo, pero sin limitación, asma, alergias alimentarias, (tratables con el alérgeno relevante); enfermedad celíaca (tratable con alérgenos del gluten); trastornos neurológicos incluyendo, pero sin

limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (tratables con, por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro y factor neurotrófico ciliar); cáncer (tratable con, por ejemplo, IL-1, factores estimuladores de colonias o interferón-W); osteoporosis (tratable con, por ejemplo, factor del crecimiento transformante f3); diabetes (tratable con, por ejemplo, insulina); enfermedad cardiovascular (tratable con, por ejemplo, activador del plasminógeno tisular); aterosclerosis (tratable con, por ejemplo, citocinas y antagonistas de citocinas); hemofilia (tratable con, por ejemplo, factores de coagulación); enfermedad hepática degenerativa (tratable con, por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos o interferón a); enfermedades pulmonares, tal como fibrosis quística (tratables con, por ejemplo, alfa antitripsina); obesidad; infecciones por patógenos, por ejemplo, infecciones víricas o bacterianas (tratables con varias de las composiciones o antígenos que se han mencionado anteriormente);
10 etc.

El lector experto apreciará que las enfermedades que se mencionan específicamente en el presente documento son únicamente ejemplares y su mención no se limita en ningún modo para limitar el uso de los reactivos proporcionados por la invención, por ejemplo, los promotores, ácidos nucleicos, vectores y células huésped de la invención, a estas
15 enfermedades particulares. En su lugar, un lector experto entiende que los reactivos de la invención pueden usarse para expresar en principio, cualquier producto de expresión, preferiblemente polipéptidos, de interés, que pueden tener relevancia terapéutica no sólo en las mencionadas, sino también en diversas enfermedades o afecciones adicionales en seres humanos y animales. En consecuencia, una vez se ha escogido o determinado para una dolencia determinada un producto de expresión adecuado, preferiblemente un polipéptido, por ejemplo, un antígeno
20 y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo, un experto será capaz de conseguir su expresión, aislamiento y/o administración usando los reactivos de la invención.

La invención también contempla el tratamiento de enfermedades en otros animales, incluyendo perros, caballos, gatos y aves. Las enfermedades en perros incluyen, pero sin limitación, moquillo canino (paramyxovirus), hepatitis
25 canina (tos de las perreras por adenovirus Cav-1 o laringotraqueitis (adenovirus Cav-2), enteritis canina infecciosa (coronavirus) y enteritis hemorrágica (parvovirus).

Las enfermedades en gatos incluyen, pero sin limitación, rinotraqueitis vírica (herpesvirus), enfermedad calicivirus felino (calicivirus), peritonitis infecciosa felina (parvovirus) y leucemia felina (virus de la leucemia felina). También se
30 contemplan otras enfermedades víricas en caballos y aves como tratables usando los métodos y composiciones de la invención. Para este fin, se preferirá particularmente el uso de microorganismos que expresan interferones recombinantes.

En un aspecto adicional, por lo tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la
35 célula huésped transformada con el ácido nucleico y/o el vector de la invención.

Preferiblemente, dicha formulación comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las células huésped de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias de vehículo farmacéuticamente aceptables y/o aditivos, por ejemplo, tampones, vehículos, excipientes, estabilizantes, etc.
40

La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, es coherente con la técnica y significa compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no perjudiciales para el receptor de la misma.

45 Las células huésped recombinantes de la invención pueden suspenderse en una formulación farmacéutica para su administración al ser humano o animal que tiene la enfermedad a tratar. Dichas formulaciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, células huésped vivas y un medio adecuado para su administración. Las células huésped recombinantes pueden liofilizarse en presencia de excipientes comunes, tales como lactosa, otros azúcares, estearato alcalino y/o alcalinotérreo, carbonato y/o sulfato (por ejemplo, estearato de magnesio, carbonato
50 sódico y sulfato sódico), caolín, sílice, saporíferos y aromas.

Las células huésped liofilizadas de esta manera pueden prepararse en forma de cápsulas, comprimidos, gránulos y polvos, cada uno de los cuales puede administrarse por la vía oral.

55 Como alternativa, algunas bacterias recombinantes pueden prepararse como suspensiones acuosas en medios adecuados, o las bacterias liofilizadas pueden suspenderse en un medio adecuado justo antes de su uso, incluyendo dicho medio los excipientes a los que se hace referencia en el presente documento y otros excipientes, tales como glucosa, glicina y sacarinato sódico.

Para la administración por vía oral, pueden formularse formas de dosificación por vía oral gastro-resistentes, cuyas formas de dosificación pueden incluir además compuestos que proporcionan la liberación controlada de las células huésped y de ese modo proporcionan la liberación controlada de la proteína deseada codificada en las mismas. Por ejemplo, la forma de dosificación por vía oral (incluyendo comprimidos, perlas, granulados, polvos) puede estar recubierta con una fina capa de excipiente (normalmente polímeros, derivados celulósicos y/o materiales lipófilos) que resiste la disolución o la ruptura en el estómago, pero no en el intestino, permitiendo de ese modo el tránsito a través del estómago a favor de la desintegración, la disolución y la absorción en el intestino.

La forma de dosificación por vía oral puede diseñarse para permitir la liberación lenta de las células huésped y de la proteína recombinante de las mismas, por ejemplo como de liberación controlada, de liberación sostenida, de liberación prolongada, comprimidos o cápsulas de acción sostenida. Estas formas de dosificación normalmente contienen excipientes convencionales y bien conocidos, tales como excipientes lipófilos, poliméricos, celulósicos, insolubles, hinchables. Las formulaciones de liberación controlada además pueden usarse para cualquier otro sitio de administración, que incluye administración intestinal, colon, bioadhesión o sublingual (es decir, administración por la mucosa dental) y administración bronquial. Cuando las composiciones de la invención son para administrarse por vía rectal o vaginal, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir supositorios y cremas. En este caso, las células huésped se suspenden en una mezcla de excipientes comunes que incluyen además lípidos. Cada una de las formulaciones mencionadas anteriormente se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Hansel y col. (1990), Chien (1992), Prescott y col. (1989), y Cazzaniga y col. (1994).

Preferiblemente, una formulación de enema puede usarse para la administración rectal. El término "enema" se usa para incluir las preparaciones líquidas destinadas para uso rectal. El enema normalmente puede suministrarse en envases de dosis única y contiene uno o más principios activos disueltos o dispersados en agua, glicerol o macrogoles u otros disolventes adecuados.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, en una realización preferida, las células huésped recombinantes que codifican un gen deseado pueden administrarse al animal o humano a través de la mucosa, por ejemplo, una ruta oral, nasal, rectal, vaginal o bronquial puede ser una cualquiera de las formulaciones del estado de la técnica aplicable a la ruta específica. La dosificación de las células huésped para la administración variará dependiendo de cualquier número de factores que incluyen el tipo de bacteria y el gen codificado de este modo, el tipo y gravedad de la enfermedad a tratar y la ruta de administración a usar.

Por lo tanto, no se pueden definir dosis precisas para cada realización de la invención, pero serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica una vez armados con la presente invención. La dosificación puede determinarse de cualquier manera caso a caso mediante la medición de las concentraciones a nivel del suero de la proteína recombinante después de la administración de un número predeterminado de células, usando métodos bien conocidos, tales como los conocidos como ELISA o Biacore (véanse los ejemplos). El análisis del perfil cinético y la semivida de la proteína recombinante suministrada proporciona información suficiente para permitir la determinación de un intervalo de dosificación eficaz para las células huésped transformadas.

En una realización, cuando las células huésped expresan un antígeno, la invención puede proporcionar además una vacuna.

El término "vacuna" identifica una composición farmacéuticamente aceptable que, cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano o animal, es capaz de inducir anticuerpos frente a un inmunógeno comprendido en la vacuna y/o provoca inmunidad protectora en el sujeto.

La vacuna de la invención comprenderá las células huésped transformadas con los ácidos nucleicos o vectores de la invención y opcionalmente, además, un excipiente. Dichas vacunas también pueden comprender un adyuvante, es decir, un compuesto o composición que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, genes minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa, tal como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, y adyuvantes humanos farmacéuticamente aceptables potencialmente útiles, tal como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

En realizaciones preferidas adicionales, la presente invención se refiere al uso de una célula huésped como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la administración de un polipéptido codificado por uno o más de dichos marcos de lectura abiertos del ácido nucleico recombinante para un ser humano o animal, preferiblemente dicho polipéptido es un antígeno y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente

activo, preferiblemente hIL-10, GLP-2, GLP-1, TFF o hPYY como se ha definido anteriormente. La presente invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende la célula huésped como se define en el presente documento. Además, la presente invención se refiere adicionalmente a una célula huésped como se define en el presente documento, para su uso como un medicamento.

5

10 Ejemplos

Materiales usados en los ejemplos

GM17

15

- Caldo M17 (Oxoid CM0817) preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero sin añadir azúcares.
- glucosa al 20 % (Merck 1.08337) esterilizada por filtración (Stericup-GV 0,22 µm PVDF Millipore CGVU05RE).

20

- Caldo GM17: M17 complementado con glucosa al 0,5 %.

GM17T es GM17 complementado con timidina 200 µM (Sigma #T9250)

GM17E es GM17, complementado con 5 µg/ml de eritromicina (Sigma #E6376) por dilución de 25 mg/ml de eritromicina en solución madre de etanol al 96 %.

25

BM9

- Casitona al 10 % (Difco 225930) autoclave durante 15 min a 121 °C.
- NaHCO₃ 0,5 M (Merck 1.06329) esterilizado por filtración (Stericup-GV 0,22 µm PVDF Millipore CGVU05RE).
- 30 - Na₂CO₃ 0,5 M (Merck 1.06392) esterilizado por filtración (Stericup-GV 0,22 µm PVDF Millipore CGVU05RE).
- MgSO₄ 1 M (Merck 1.05886) autoclave durante 15 min a 121 °C.
- CaCl₂ 100 mM (Merck 1.02382) autoclave durante 15 min a 121 °C.
- Sales 10xM9 (Difco 248510) autoclave durante 15 min a 121 °C. Diluir 10 x en agua estéril para
- 35 obtener sales M9.
- 10 ml de BM9: Añadir los diferentes componentes en el mismo orden que se describe a continuación.

- * 1 ml de sales 10x M9
- * 500 µl de casitona al 10 %
- 40 * 250 µl de glucosa al 20 %
- * 7,75 ml de agua
- * 500 µl de NaHCO₃ 0,5 M
- * 500 µl de Na₂CO₃ 0,5 M

45

Mezclar apropiadamente y añadir los siguientes componentes:

- * 20 µl de MgSO₄ 1 M
- * 10 µl de CaCl₂ 100 mM

50

BM9T es BM9 complementado con timidina 200 µM (Sigma #T9250)

BM9E es BM9, complementado con 5 µg/ml de eritromicina (Sigma #E6376) por dilución de 25 mg/ml de eritromicina en solución madre de etanol al 96 %.

ELISA

55

IL10 - Kit BD OptEIA Human IL-10 ELISA II; Cat. n.º: 550613; BD Biosciences; www.bdbiosciences.com

TFF-1 - ELISA Sandwich

- **anticuerpo de revestimiento:** anticuerpo monoclonal de ratón TFF1 (M02), clon 3H5 (Abnova Cat.

n.º: H00007031-M02)

- **anticuerpo de detección:** anti-hTFF1 policlonal de ratón (Alpha Diagnostics Cat. n.º: TFF12-A; www.4adi.com)
- **conjugado:** anti conejo-HRP (Southern Biotech Cat. n.º: 4050-05; www.southernbiotech.com)
- **sustrato:** TMB

TFF-3 ELISA Sandwich

- **anticuerpo de revestimiento:** anticuerpo monoclonal de ratón 4408 contra TFF-3 (R&D Systems Cat. n.º: MAB4408; www.rndsystems.co)
- **anticuerpo de detección:** monoclonal de ratón biotilado en laboratorio 15C6 contra TFF-3 (Calbiochem Cat. n.º: 585350; www.calbiochem.com)
- **conjugado:** Estreptavidina-HRP (Cat. n.º: 554066; BD Biosciences; www.bdbiosciences.com)
- **sustrato:** TMB

PYY Kit comercial: Péptido YY Total (PYY) ELISA; Cat. n.º: DSL-10-33600; Diagnostic System Laboratories, Inc.; www.dslabs.com

GLP-1 Kit comercial: Péptido tipo glucagón 1 (Activo) kit ELISA; Cat. N.º: EGLP-35K; Linco Research; www.millipore.com

20 Ejemplo 1 Aislamiento de promotores fuertes de *Lactococcus lactis*

Se identificaron proteínas fuertemente expresadas en MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* usando el método de Antelmann y col. (2000).

- 25 En resumen, se identificaron proteínas altamente expresadas por abundantes puntos de proteína en un gen 1 D (figura 2). Las bandas de proteína indicadas se digirieron con tripsina y las mezclas peptídicas se analizaron en modo LC-MS/MS en el espectrómetro de masas de trampa de iones (Esquire HCT, Bruker). Los espectros (únicamente se mantuvieron 250 espectros MS/MS por realización para el análisis de datos) se analizaron por MASCOT con el bando de datos de proteínas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sk11 (Genbank NC_008527).
- 30 Los péptidos con una puntuación Mascot por encima de la puntuación umbral de identidad se identifican con una probabilidad del 95 %. Cuantos más péptidos se obtienen de la misma proteína, más fiable es la identificación.

Este análisis produjo una lista de proteínas altamente abundantes y los genes correspondientes (Tabla 1 anterior, y figura 1). En base a lo presente, se identifican y se aíslan secuencias aguas arriba de los genes indicados (SEQ ID NO: 1 a 54 y 157 a 180) con sus propias secuencias Shine Dalgarno (SD). Para la mayor parte de los promotores, esto se hace por PCR en ADN cromosómico de MG1363 de *Lactococcus lactis*. A modo de ejemplo, los cebadores usados para amplificar secuencias promotoras correspondientes a los genes enumerados en los puntos 1) a 30) anteriormente, se muestran en la Tabla 2. Asimismo, los cebadores adecuados pueden seleccionarse en base a la información genómica disponible para los promotores correspondientes a los genes enumerados en los puntos 31) a 40) anteriormente. Los promotores para *eno*, *tbp* y *lacE* también se sintetizaron, usando oligonucleótidos (oligos en la Tabla 3).

Ejemplo 2 Actividad promotora

- 45 Se concibió una estrategia que permitió la subclonación de los diversos promotores frente al gen hIL-10 secretable (figura 3). La subclonación se realizó de manera que los casetes de expresión de hIL-10 se flanqueasen por secuencias diana. Esta estructura permite una doble recombinación homóloga alrededor del gen *thyA* y, por lo tanto, la integración cromosoma, básicamente como se describe en Steidler y col. 2003 anteriormente y el documento WO 02/090551.

50

Esquemáticamente, la estrategia se describe con referencia a la figura 3:

A) Usando los cebadores apropiados, los promotores se aíslan por PCR de ADN cromosómico de MG1363 de *L. lactis*; **B)** los promotores se unen a regiones flanqueantes relevantes (región diana aguas arriba parcial, hIL-10 parcial) por PCR de hibridación; **C y D)** Los productos unidos se subclonan en un plásmido condicionalmente no replicante usando los sitios de endonucleasa de restricción posicionados apropiadamente (*NcoI* + *AflIII* o, como alternativa, *NcoI* + *BstEII*). Esto completo tanto la región diana aguas arriba como hIL-10. **E)** Se introducen construcciones de promotor en MG1363 de *L. lactis* por recombinación aguas arriba y aguas abajo consecutiva. La integración cromosómica se realiza a través de

55

un procedimiento de dos etapas. Tras la introducción del plásmido no replicante en la cepa de origen de MG1363 de *L. lactis*, una primera recombinación homóloga en la secuencia diana aguas arriba o aguas abajo puede seleccionarse en medios selectivos que contienen eritromicina. La segunda recombinación homóloga en la diana alternativa se selecciona por la ausencia de *thyA*. F) Estructura cromosómica final donde *thyA* se reemplaza por hIL-10.

5

Los transgenes integrados cromosómicamente se evalúan para determinar los niveles de expresión de hIL-10 secretable (es decir, hIL-10 proporcionado dentro del marco con una secuencia señal de secreción de *Lactococcus*, por ejemplo, *usp45* o similar) en referencia a otras cepas de *Lactococcus* básicamente como en Steidler y col. (2003); Self-containing Lactococcus strain, documento WO 02/090551 y descrito en resumen en el presente documento: las diversas cepas de *Lactococcus lactis* se estrían en una única colonia y se prepara un precultivo inoculando 1 colonia en GM17 (M17, Oxoid, Hampshire, Reino Unido, complementado con glucosa al 0,5 %) e incubación durante 16 h a 30 °C. Estos precultivos se inoculan 1/25 en 5 ml de GM y se incuban durante 4 h a 30 °C. Las células se recogen por centrifugación y se suspenden de nuevo en 5 ml de BM9 recién preparado (composición en Tabla 4). Estas suspensiones celulares e incuban durante 3 h a 30 °C. Las células bacterianas se eliminan por centrifugación y los sobrenadantes se transfieren a tubos frescos. El contenido de hIL-10 de los sobrenadantes se determina por ELISA y las proteínas de hIL-10 se visualizan analizando el equivalente de 1 ml de cultivo por transferencia de western (*western blot*).

Incluso después de repetidos intentos y diferentes estrategias de clonación, no fue posible subclonar diversas secuencias promotoras. Las secuencias promotoras subclonadas con éxito se resumen en la Tabla 12.

Ejemplo 3 Resistencia del promotor

Después de identificar varios promotores, se ensayaron varias construcciones de promotor en una serie adicional de experimentos. Además, para establecer si la actividad promotoras es independiente del gen indicador, se diseñaron construcciones indicadoras que comprendían el gen GLP-2.

El gen proglucagón humano (GenBank acc. n.º NM_002054) codifica una preproteína que se escinde en cuatro péptidos maduros distintos, incluyendo el péptido tipo glucagón 2 (GLP-2). Se diseñó un gen para h[Gly2]GLP-2 codificado en el uso de codón preferencial de *L. lactis*. Este gen codifica un análogo de GLP-2 humano maduro con una alanina con respecto a una sustitución glicina en la posición 2, que se demostró que reducía la susceptibilidad a la degradación por dipeptidil peptidasa-IV (Booth y col., 2004). El gen sintético se ensambló usando la metodología del estado de la técnica básicamente como se describe por Stemmer y col. (1995), que se incorpora en el presente documento por referencia.

El fragmento resultante se fusionó a la señal de secreción de *usp45* (van Asseldonk, y col., 1990). La construcción de fusión se puso aguas abajo de una serie de promotores lactocócicos: P1 (Waterfield, y col., 1995), PthyA (promotor de timidilato sintasa) y PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28).

Esta estrategia produjo fragmentos que pudieron subclonarse como EcoRI-XbaI para P1 (pT1 GLP2) o fragmentos EcoRI-SpeI (todas las demás construcciones) en el plásmido abierto por EcoRI-SpeI pT1NX (Steidler y col., 1998; figura 4).

45

Se proporciona un resumen de los diversos plásmidos en la Tabla 5. Se verificó la secuencia de todos los plásmidos, después se lo cual se transformaron en MG1363 de *L. lactis* usando el método de Gasson (1983).

La expresión y secreción de GLP-2 se documentó en extractos proteicos de las diversas cepas obtenidas en paralelo. En resumen, los cultivos saturados se diluyeron 25 veces, se cultivaron en un medio de crecimiento tamponado adecuadamente y se cosecharon al final de la fase logarítmica. Se cargaron equivalentes de 1 ml de cultivo en SDS-PAGE y se analizaron por transferencia de Western. El GLP-2 se detectó por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-GLP-2 de conejo policlonal (Abcam, Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo secundario era una IgG anti-conejo de cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) acoplada a fosfatasa alcalina. La actividad enzimática se reveló con sustrato NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

A partir de estos datos puede concluirse que el promotor PhIIA es extremadamente fuerte.

Ejemplo 4 Influencia de la secuencia señal

Para controlar los niveles de expresión, incluyendo la producción y la secreción, se construyó una serie de mutantes de *usp45*, que se ensayaron en primer lugar junto con el promotor PhIIA de 28).

- 5 Sorprendentemente, un mutante de *usp45* por el que se intercambio lisina en la posición 4 por asparagina (*usp45* N4), dio como resultado un aumento drástico de la producción y secreción de h[Gly2]GLP-2 (PhIIAN₄GLP2) con respecto a la expresión dirigida al promotor *thyA* y el promotor *P1* (figura 5A). Además, estos transformantes eran extremadamente estables. La construcción integrada en el genoma de *L. lactis* proporciona también una producción y secreción sustancialmente aumentada. La expresión de la construcción indicadora en *Lactobacillus casei*
10 proporciona básicamente los mismos resultados que en *L. lactis*.

A continuación, se introdujo esta mutación en *usp45* aguas abajo del promotor *P1* y el promotor *thyA*, generando los plásmidos pT1N₄GLP2 y pThyAN₄GLP2, respectivamente. Sorprendentemente, la mutación tuvo poco efecto en la producción de h[Gly2]GLP-2 regulada por el promotor *P1*, pero se suprimió por completo la producción de
15 h[Gly2]GLP-2 en el control de transcripción del promotor *thyA* (figura 5B).

A partir de estos datos es obvio que el promotor PhIIA junto con la secuencia señal *uspN4* es sumamente adecuado para controlar la expresión de genes.

20 Ejemplo 5 Resistencia del promotor ensayada por la expresión de interleucina-10 humana (hIL-10)

Se ensayaron varias construcciones de promotores en una serie de experimentos. Además, para establecer si la actividad promotora es independiente del gen indicador, se diseñaron construcciones indicadoras en las que se generaron casetes de expresión que contenían los promotores bajo investigación, frente a la señal de secreción de
25 *usp45* (van Asseldonk y col., 1990) fusionadas a un gen hIL-10 sintético (véase también el Ejemplo 2). En este caso, la construcción de fusión se puso aguas debajo de una serie de promotores lactocócicos: *PthyA* (promotor de timidilato sintasa, cepas sAGX0005 y Thy12), promotor *PdpsA* (proteína tipo ferritina de unión a ADN, SEQ ID NO: 3, sAGX0012), *PpepV* (promotor de Xaa-His dipeptidasa SEQ ID NO: 158, cepa sAGX0018), *PsodA* (promotor de superóxido dismutasa, SEQ ID NO: 20 sAGX0029) y PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleoide
30 bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, cepa sAGX0037).

Todos los casetes de expresión se integraron en el locus *thyA* del cromosoma MG1363 de *L. lactis* por recombinación homóloga dual, por lo que el gen *thyA* se eliminó (una estrategia similar a la aplicada para la construcción de Thy12 (Steidler y col., 2003) pero sin hacer uso del plásmido auxiliar pVE6007, como se muestra en
35 la figura 3. Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión de hIL-10 sean idénticas. Se proporciona un resumen de la estructura y la posición de los casetes de expresión de hIL-10 en las diversas cepas en la figura 6. Los casetes de expresión de hIL-10 (promotor, señal de secreción de *usp45*, hIL-10) de las cepas descritas aquí se verificaron por secuencia.

40 Las diversas cepas ensayadas se estiraron en una única colonia en placas de GM17T de agar sólido. Las colonias individuales se inocularon en GM17T y se cultivaron durante una noche hasta saturación. Las diluciones apropiadas de estos cultivos se cultivaron previamente durante 4 horas en GM17T. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se incubaron adicionalmente durante 3 horas en un medio de cultivo tamponado (BM9T). Las bacterias se eliminaron por centrifugación y a partir de este sobrenadante limpio, las muestras se recogieron para su
45 análisis. Las muestras se analizaron por análisis ELISA específico para hIL-10. Los niveles de expresión se dan en la figura 7. Todos los datos se dan como las medias de las mediciones individuales. La resistencia del promotor relativa se da en la Tabla 6.

Para excluir el impacto de las diferentes características de crecimiento entre cepas, se determinaron unidades formadoras de colonias (UFC) al final de un experimento de expresión como se ha descrito anteriormente, y se calculó la producción de hIL-10 por 10⁹ UFC para las diversas cepas. Este experimento muestra que no se observó ninguna tasa de crecimiento sustancialmente diferente y que, según se determinó a partir de la expresión de hIL-10, PhIIA es aproximadamente 4 veces más fuerte que *PthyA* (figura 8 y Tabla 7).

55 A partir de estos datos, puede concluirse que *PdpsA*, *PpepV*, *PsodA* y PhIIA son extremadamente fuertes y muy competentes para dirigir la expresión de los genes heterólogos.

Ejemplo 6 Resistencia del promotor ensayada por la expresión del factor trefoil humano (TFF)

Después de identificar promotores potencialmente fuertes, se ensayaron varias construcciones de promotor en una serie adicional de experimentos. Además, para establecer si la actividad promotora es independiente del gen indicador, se diseñaron construcciones indicadoras en las que se generaron casetes de expresión que contenían los promotores bajo investigación, frente a la señal de secreción de *usp45* de tipo silvestre (*ts*) (van Asseldonk y col., 5 1990) o mutante del mismo (*mut*; incluyendo *Usp45 N4* en el que la lisina en la posición 4 se sustituyó por asparagina) fusionadas a un gen *hTFF1* o *hTFF3* sintético. Las construcciones de fusión se pusieron aguas debajo de una serie de promotores lactocócicos: *PthyA* (promotor de timidilato sintasa, cepas *sAGX0041* y *sAGX0043*), promotor *PdpsA* (proteína tipo ferritina de unión a ADN, SEQ ID NO: 3, cepa *sAGX0059*), y *PhIIA* (promotor de proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, cepas *sAGX0048*, 10 *sAGX0049* y *sAGX0057*). Todos los casetes de expresión se integraron en el locus *thyA* del cromosoma MG1363 de *L. lactis* por recombinación homóloga dual, por lo que el gen *thyA* se eliminó (una estrategia similar a la aplicada para la construcción de *Thy12* (Steidler y col., 2003) pero sin hacer uso del plásmido auxiliar *pVE6007*, como se muestra en la figura 3. Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión de TFF sean idénticas. Se proporciona un resumen de la estructura y posición de los casetes de expresión de TFF en las diversas 15 cepas en la figura 9 y la Tabla 8. Los casetes de expresión de TFF (promotor, señal de secreción, TFF) de las cepas descritas aquí se verificaron por secuencia.

Las diversas cepas ensayadas se estiraron en una única colonia en placas de GM17T de agar sólido. Las colonias individuales se inocularon en GM17T y se cultivaron durante una noche hasta saturación. Las diluciones apropiadas de estos cultivos se cultivaron previamente durante 4 horas en GM17T. Las bacterias se cosecharon por 20 centrifugación y se incubaron adicionalmente durante 3 horas en un medio de cultivo tamponado (BM9T). Las bacterias se eliminaron por centrifugación y a partir de este sobrenadante limpio, las muestras se recogieron para su análisis. Las muestras se analizaron por ELISA específico para *hTFF*. Los niveles de expresión se proporcionan en la figura 10. Las muestras de las cepas de expresión de *hTFF1* también se analizaron por transferencia de Western 25 específica para *hTFF1* (figura 11). Todos los datos se proporcionan como la media de tres mediciones individuales. La resistencia del promotor relativa se da en la Tabla 8.

Acorde con el Ejemplo 4, los datos en la figura 10 muestran que el mutante *Usp45 N4* no es responsable de una expresión mejorada de *hTFF3* por *sAGX0057*, pero proporciona un nivel adicional de expresión de control. 30

Los *PdpsA*, *PpepV* y *PsodA* puestos frente a las construcciones de expresión de *hTFF1* y *hTFF3* también muestran una mejor expresión con respecto a *PthyA*.

A partir de estos datos, puede concluirse que *PdpsA*, *PpepV*, *PsodA* y *PhIIA* son extremadamente fuertes y muy 35 competentes para dirigir la expresión de genes heterólogos.

Ejemplo 7 Resistencia del promotor ensayada por la expresión de los aminoácidos 3-36 de la variante Gly9 de péptido YY humano (hPYY G9 (3-36))

Después de identificar promotores potencialmente fuertes, se ensayaron varias construcciones de promotor en una serie adicional de experimentos. Además, para establecer si la actividad promotora es independiente del gen indicador, se diseñaron construcciones indicadoras en las que se generaron casetes de expresión que contenían los promotores bajo investigación, frente a la señal de secreción de *usp45* (van Asseldonk y col., 1990) fusionadas a un gen *hPYY G9 (3-36)* sintético. La construcción de fusión se puso aguas abajo de una serie de promotores 40 lactocócicos: *P1* (Waterfield y col., 1995) (plásmido *pAGX0211*); *PthyA* (promotor de timidilato sintasa, plásmido *pAGX0212*), y *PhIIA* (promotor de proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, plásmido *pAGX0213*). Todos los casetes de expresión se insertaron como fragmentos *EcoRI-SpeI* en el plásmido *pT1 NX* (Schotte y col., 2000). Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión, incluyendo el origen de replicación y la resistencia a eritromicina, sean idénticas par los plásmidos 45 anteriores. Se proporciona un resumen de la estructura de los diversos plásmidos de expresión en la figura 12 y la Tabla 9. Los casetes de expresión de *hPYY* (promotor, señal de secreción de *usp45*, *PYY*) de las cepas descritas aquí se verificaron por secuencia. 50

El vector de expresión vacío *pT1 NX*, así como todos los plásmidos de expresión de *hPYY G9 (3-36)* se transformaron en MG1363 de *L. lactis*. Las cepas resultantes se estiraron en una única colonia en placas de GM17E 55 de agar sólido. Las colonias individuales se inocularon en GM17E y se cultivaron durante una noche hasta saturación. Las diluciones apropiadas de estos cultivos se cultivaron previamente durante 4 horas en GM17E. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se incubaron adicionalmente durante 3 horas en un medio de cultivo tamponado (BM9E). Las bacterias se eliminaron por centrifugación y a partir de este sobrenadante limpio, las

muestras se recogieron para su análisis. Las muestras se analizaron por ELISA específico para hPYY. Los niveles de expresión se proporcionan en la figura 13. La resistencia del promotor relativa se da en la Tabla 9.

Los PdpsA, PpepV y PsodA situados frente a la señal de secreción de *usp45* (van Asseldonk y col., 1990) fusionada a un gen hPYY G9 (3-36) sintético, también muestran una mejor expresión con respecto a la expresión dirigida de PthyA.

A partir de estos datos, puede concluirse que PdpsA, PpepV, PsodA y PhIIA son extremadamente fuertes y muy competentes para dirigir la expresión de genes heterólogos.

10

Ejemplo 8 Resistencia del promotor ensayada por la expresión de los aminoácidos 7-36 de la variante Gly8 de péptido tipo glucagón 1 humano (hGLP-1 G8 (7-36))

Después de identificar promotores potencialmente fuertes, se ensayaron varias construcciones de promotor en una serie adicional de experimentos. Además, para establecer si la actividad promotora es independiente del gen indicador, se diseñaron construcciones indicadoras en las que se generaron casetes de expresión que contenían los promotores bajo investigación, frente a la señal de secreción de *usp45* (van Asseldonk y col. 1990) fusionadas a un gen hGLP-1 G8 (7-36) sintético. La variante Gly8 de GLP-1 muestra una susceptibilidad reducida hacia la escisión proteolítica por dipeptidil peptidasa VI (Deacon y col., 1998). La construcción de fusión se puso aguas debajo de dos promotores lactocócicos: PthyA (promotor de timidilato sintasa, plásmido pAGX0233), y PhIIA (promotor de proteína de unión a ADN nucleoide bacteriano/proteína de unión a ADN HU; SEQ ID NO: 28, plásmido pAGX0234). Todos los casetes de expresión se insertaron como fragmentos EcoRI-SpeI en el plásmido pT1 NX (Schotte y col., 2000). Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión, incluyendo el origen de replicación y la resistencia a eritromicina, sean idénticas por los plásmidos anteriores. Se proporciona un resumen de la estructura de los diversos plásmidos de expresión en la figura 14 y la Tabla 10. Los casetes de expresión de Gly8 de GLP-1 (promotor, señal de secreción de *usp45*, GLP-1 Gly8) de las cepas descritas aquí se verificaron por secuencia. El vector de expresión vacío pT1 NX, así como todos los plásmidos de expresión de hGLP-1 G8 (7-36) se transformaron en MG1363 de *L. lactis*. Las cepas resultantes se estriaron en una única colonia en placas de GM17E de agar sólido. Las colonias individuales se inocularon en GM17E y se cultivaron durante una noche hasta saturación. Las diluciones apropiadas de estos cultivos se cultivaron previamente durante 4 horas en GM17E. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se incubaron adicionalmente durante 3 horas en un medio de cultivo tamponado (BM9E). Las bacterias se eliminaron por centrifugación y a partir de este sobrenadante limpio, las muestras se recogieron para su análisis. Las muestras se analizaron por ELISA específico para hGLP-1. Los niveles de expresión se proporcionan en la figura 15. La resistencia del promotor relativa se da en la Tabla 10.

35

Ejemplo 9 Resistencia del promotor ensayada por la expresión de interleucina-10 humana (hIL-10)

Se ensayaron varias construcciones de promotor en una serie adicional de experimentos. Además, para establecer si la actividad promotora es independiente del gen indicador, se diseñaron construcciones indicadoras en las que se generaron casetes de expresión que contenían los promotores bajo investigación, frente a la señal de secreción de *usp45* (van Asseldonk y col. 1990) fusionadas a un gen hIL-10 sintético. La construcción de fusión se puso aguas abajo de una serie de promotores lactocócicos (figura 16 y Tabla 11).

Todos los casetes de expresión se integraron en el locus *thyA* del cromosoma MG1363 de *L. lactis* por recombinación homóloga dual, por lo que el gen *thyA* se eliminó (una estrategia similar a la aplicada para la construcción de Thy12 (Steidler y col., 2003) pero sin hacer uso del plásmido auxiliar pVE6007). Esto hace que todas las secuencias de ADN fuera de los casetes de expresión de hIL-10 sean idénticas. Se representa en la figura 16 un resumen generalizado de la estructura y posición de los casetes de expresión de hIL-10 presentes en las diversas cepas (comúnmente designadas "sAGX00xx"). Los casetes de expresión de hIL-10 (promotor, señal de secreción de *usp45*, hIL-10) de las cepas descritas aquí se verificaron por secuencia.

50

Las diversas cepas ensayadas se estriaron en una única colonia en placas de GM17T de agar sólido. Las colonias individuales se inocularon en GM17T y se cultivaron durante una noche hasta saturación. Las diluciones apropiadas de estos cultivos se cultivaron previamente durante 4 horas en GM17T. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se incubaron adicionalmente durante 3 horas en un medio de cultivo tamponado (BM9T). Las bacterias se eliminaron por centrifugación y a partir de este sobrenadante limpio, las muestras se recogieron para su análisis. Las muestras se analizaron por ELISA específico para hIL-10. Los niveles de expresión se proporcionan en la figura 17. Todos los datos se proporcionan como la media de tres mediciones individuales. La resistencia del promotor relativa se da en la Tabla 11.

55

A diferencia del análisis proteómico y transcriptómico proyectado, la resistencia y la competencia de un promotor particular que dirige la expresión de los genes heterólogos siguen siendo inesperadas.

5

Tabla 1.

Gen Número	ID de gen MG1363	ID de gen SK11	Proteína correspondiente como se comentó en MG1363	Nombre del gen MG1363	Nombre del gen SK11	Secuencia promotora ejemplar (SEQ ID NO)
1)	<u>4798573</u>	<u>4432638</u>	ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad 160 kD	<i>rpoC</i>	LACR_1980	1
2)	<u>4798827</u>	<u>4432639</u>	ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad 140 kD	<i>rpoB</i>	rpoB	2, 157
3)	<u>4798207</u>	<u>4434445</u>	ferritina de unión a hierro no hemo	<i>dpsA</i>	LACR_2311	3
4)	<u>4797791</u>	<u>4433214</u>	piruvato cinasa	<i>pyk</i>	LACR_1456	4
5)	<u>4798062</u>	<u>4433965</u>	glutamil-ARNt sintetasa	<i>gltX</i>	<i>gltX</i>	5
6)	<u>4797432</u>	<u>4433058</u>	fosfopiruvato hidratasa	<i>eno</i>	<i>eno</i>	6
7)	<u>4797464</u>	<u>4433379</u>	glutamina sintetasa	<i>glnA</i>	LACR_2512	7
8)	<u>4797312</u>	<u>4433380</u>	represor de glutamina sintetasa	<i>glnR</i>	LACR_2513	8
9)	<u>4798910</u>	<u>4432071</u>	dipeptidasa PepV	<i>pepV</i>	LACR_0908	9, 158
10)	<u>4797781</u>	<u>4433907</u>	subunidad beta de ATP sintasa tipo F0F1 (subunidad beta de ATP sintasa F1)	<i>atpD</i>	LACR_1933	10
11)	<u>4797899</u>	<u>4433798</u>	3-fosfoglicerato cinasa	<i>pgk</i>	<i>pgk</i>	11
12)	<u>4797877</u>	<u>4432135</u>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>gapB</i>	LACR_2555	12, 159
13)	<u>4798785</u>	<u>4432332</u>	acetato cinasa	<i>ackA1</i>	LACR_2295	13, 160
14)	<u>4796577</u>	<u>4432366</u>	3-oxoacil-(acil-vehículo-proteína) sintasa II	<i>fabF</i>	LACR_0825	14
15)	<u>4797984</u>	<u>4432365</u>	3-cetoacil-(acil-vehículo-proteína) reductasa	<i>fabG</i> <i>fabG1</i>	<i>fabG</i>	15, 161
16)	<u>4797865</u>	<u>4434231</u>	ARN polimerasa dirigida a ADN, subunidad alfa/subunidad 40 kD	<i>rpoA</i>	LACR_2375	16
17)	<u>4798484</u>	<u>4432446</u>	Prolina dipeptidasa	<i>pepQ</i>	LACR_1813	17,162
18)	<u>4798307</u>	<u>4434211</u>	fructosa-bisfosfato aldolasa	<i>fbaA</i>	LACR_2168	18,163
19)	<u>4798643</u>	<u>4433237</u>	proteína ribosomal 30S S4	<i>rpsD</i>	<i>rpsD</i>	19
20)	<u>4796682</u>	<u>4433052</u>	superóxido dismutasa	<i>sodA</i>	LACR_0458	20
21)	<u>4799037</u> (<i>rpsL</i>)	<u>4433371</u> (<i>rpsL</i>)	proteína ribosomal 30S S12 (<i>rpsL</i>) y proteína ribosomal 30S S7 (<i>rpsG</i> /LACR_2596))	<i>rpsL</i>	<i>rpsL</i>	21, 164
	<u>4797556</u> (<i>rpsG</i>)	4433370 (LACR_2596)		<i>rpsG</i>	LACR_2596	
22)	<u>4799022</u> (<i>rplR</i>)	<u>4433741</u> (LACR_2385)	proteína ribosomal 50S L18 (<i>rplR</i> /LACR_2385) y proteína ribosomal 30S S5 (<i>rpsE</i> /LACR_2384) y proteína ribosomal 50S L30/L7E (<i>rpmD</i>)	<i>rplR</i>	LACR_2385	22,165
	<u>4798090</u> (<i>rpsE</i>)	4433740 (LACR_2384)		<i>rpsE</i>	LACR_2384	
	<u>4797873</u> (<i>rpmD</i>)	4433739 (<i>rpmD</i>)		<i>rpmD</i>	<i>rpmD</i>	
23)	<u>4798265</u>	<u>4434424</u>	S-ribosilhomocisteinasa	<i>luxS</i>	LACR_0270	23
24)	<u>4798969</u>	<u>4432986</u>	proteína ribosomal 50S L19	<i>rplS</i>	<i>rplS</i>	24
25)	<u>4798819</u>	<u>4434232</u>	proteína ribosomal 30S S11	<i>rpsK</i>	LACR_2376	25, 168 154)
26)	<u>4797191</u>	<u>4433166</u>	proteína ribosomal 50S L10	<i>rplJ</i>	<i>rplJ</i>	26, 169

ES 2 595 729 T3

27)	<u>4797926</u>	<u>4433165</u>	proteína ribosomal 50S L7/L12	<i>rplL</i>	LACR_1386	27, 170		
28)	<u>4797353</u>	<u>4433712</u>	proteína de unión de ADN tipo HU	<i>hllA</i>	LACR_0525 (<i>hup</i>)	28		
29)	<u>4797103</u>	<u>4433888</u>	proteína ribosomal 50S L28	<i>rpmB</i>	LACR_0198	29		
30)	<u>4797109</u>	<u>4433007</u>	componente IIB del sistema fosfotransferasa	<i>ptcB</i>	LACR_0465	30, 170		
31)	<u>4798114</u>	<u>4432141</u>	Subunidad alfa ATP sintasa de tipo F0F1	<i>atpA</i>	LACR_1935	31, 172		
32)	<u>4797024</u>	<u>4433016</u>	proteína de unión a ATP de transporte de unión a azúcar múltiple	<i>msmK</i>	LACR_0474	32, 173		
33)	<u>4798130</u>	<u>4434638</u>	subunidad alfa de componente E1 del complejo acetoina deshidrogenasa (<i>acoA</i>)	<i>pdhA</i>	LACR_0051	33; 174		
34)	<u>4797264</u>	<u>4432815</u>	proteína de división celular	<i>ftsA</i>	LACR_2057	34, 175		
35)	<u>4798554</u>	<u>4434372</u>	UDP-galactopiranos mutasa	<i>glf1</i>	LACR_0219	35		
36)	<u>4796852</u>	<u>4433097</u>	glutamil aminopeptidasa	<i>pepA</i>	LACR_0433	36		
37)	<u>4798279</u>	<u>4433301</u>	proteína relacionada con deshidrogenasa predicha	llmg-0272	LACR_0268	37, 176		
38)	<u>4797347</u>	<u>4432587</u>	proteína ribosomal 30S S2	<i>rpsB</i>	<i>rpsB</i>	38, 177		
39)	<u>4798807</u>	<u>4433762</u>	factor de inicio de la traducción 3 (IF-3)	<i>infC</i>	LACR_0436	39, 178		
40)	<u>4798524</u> (<i>rplD</i>)	<u>4433828</u> (<i>rplD</i>)	proteína ribosomal 50S L4 (<i>rplD</i>) y proteína ribosomal 50S L23 (<i>rplW</i>) y proteína ribosomal 50S L2 (<i>rplB</i>)	<i>rplD</i>	<i>rplD</i>	40, 179		
	<u>4798431</u> (<i>rplW</i>)	<u>4433827</u> (<i>rplW</i>)		<i>rplW</i>	<i>rplW</i>			
	<u>4798645</u> (<i>rplb</i>)	<u>4433826</u> (<i>rplB</i>)		<i>rplb</i>	<i>rplB</i>			
41)	<u>4797346</u>	<u>4433100</u>	cadena beta de fenilalanil-ARNt sintetasa	<i>pheT</i>	LACR_0436	41		
42)	<u>4799077</u>	<u>4433204</u>	factor de elongación de la transcripción GreA	<i>greA</i>	LACR_0660	42		
						43		
43)	<u>4796752</u>	<u>4432931</u>	subunidad proteasa de Clp proteasa dependiente de ATP	<i>clpP</i>	<i>clpP</i>	44		
44)	<u>4797213</u>	<u>4433738</u>	proteína ribosomal 50S L15	<i>rplO</i>	LACR_2382	45		
45)	<u>4798439</u>	<u>4433280</u>	proteína ribosomal 50S L11	<i>rplK</i>	<i>rplK</i>	46		
46)	<u>4797933</u>	<u>4433743</u>	proteína ribosomal 30S S8	<i>rpsH</i>	LACR_2387	47		
47)	<u>4797761</u>	<u>4432457</u>	proteína ribosomal 50S L21	<i>rplU</i>	<i>rplU</i>	48		
48)	<u>4798259</u>	<u>4433733</u>	proteína ribosomal 30S S13	<i>rpsM</i>	<i>rpsM</i>	49		
49)	<u>4797839</u> (<i>rpsS</i>)	<u>4433825</u> (<i>rpsS</i>)	proteína ribosomal 30S S19 (<i>rpsS</i>) y proteína ribosomal 50S L22 (<i>rplV</i>) y proteína ribosomal 50S L16 (<i>rplP</i>) y ribosomal 50S	<i>rpsS</i>	<i>rpsS</i>	50		
	<u>4798792</u> (<i>rplV</i>)	<u>4433824</u> (<i>rplV</i>)					<i>rplV</i>	<i>rplV</i>
	<u>4798472</u> (<i>rplP</i>)	<u>4433822</u> (<i>rplP</i>)					<i>rplP</i>	<i>rplP</i>
	<u>4799034</u> (<i>rplN</i>)	<u>4433748</u> (LACR_2392)	proteína ribosomal L14 (<i>rplN</i>)	<i>rplN</i>	LACR_2392			
50)	<u>4798419</u>	<u>4433829</u>	proteína ribosomal 30S S10	<i>rpsJ</i>	LACR_2402	51		
51)	<u>4798582</u>	<u>4433103</u>	co-chaperonina GroES	<i>groES</i>	<i>groES</i>	52, 180		
52)	<u>4797891</u>	<u>4433747</u>	proteína ribosomal 50S L24	<i>rplX</i>	<i>rplX</i>	53		
53)	<u>4797916</u>	<u>4432598</u>	revolvase de unión de Hollyday putativa (MG1363)	llmg_0151	LACR_0137	54		

Tabla 2

Secuencia promotora (SEQ ID No Tabla 1)	Amplificada con cebadores
	Directo (SEQ ID NO) Inverso (SEQ ID NO)
1	G TTCAGAAACTGCCTGATGGATTTTGTAATTAATATTTTGAGATTTATTTACTGAC (55)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTCCTTCTCCACTTCTAATAAAATTTAAC (56)
2	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGCTAGATAAGCCTTGAAAATTC (57)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAAGTGTTTTCTCCTCTATTTTTTAG (58)
3	G G TTCAGAAACTGCCTGATGGACTAATCTATACGAAAATTGATTTTGAATG (59)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCACTAATCCCTCCATTTTTTAAATATTA (60)
4	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCTAAGTTACTGCAAATCTGTTTC (61)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTGTGTTTTCTCCTATAATG (62)
5	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATAAATTTCACTGACGCAAGC (63)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTAATCCAATTCCTCCTAGG (64)
6	G TTCAGAAACTGCCTGATGGAAATTAAGGATAGATTTTTTCTATCCTTTTTTC (65)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTAGTCTCCTTATTATTTTTAAGTGCG (66)
7	G TTCAGAAACTGCCTGATGGATTTGGTTGACATAATTTGTCAAG (67)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATGCTTACTCTCCTAGTTAAATTTTC (68)
8	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCAAATAAAAAGAAGCTGATGTGAGAAAATC (69)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATAGAGCGTCTTAATTCACG (70)
9	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATATTATCTTTATCCTCCTTATATATAATC (71)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATCTTCTCCTTGAAGTAG (72)
10	G TTCAGAAACTGCCTGATGGTTACTGTCAAACATTATTCTCAATGTTAC (73)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTAAGCTAATCAGTAAAAATTTAC (74)
11	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGTTGCTTAGCAAAGCTC (75)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTGAAAAATTCTCCTTATAAG (76)
12	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGAATAAAAATTACTGTCAGCCTGC (77)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATAGTAGTTTCTCCTTATAGGG (78)
13	G TTCAGAAACTGCCTGATGGAAATAAAAAATTATTGGCTAGTCTGTGAG (79)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATGTTAATAAACCTTCTTGAATTTG (80)
14	G TTCAGAAACTGCCTGATGGATTGCTCATTTATAAATTTGAAATTAAGAAGG (81)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTTTATCCTTCTTAATTTCAAATTTATAAATG (82)
15	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGGAGAAAGGAATTGAGTTTCG (83)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTATAAGATGTGAGCCC (84)
16	G TTCAGAAACTGCCTGATGGTTAGTCACTCTTGTCACTAATCAC (85)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATGTATGTTCTCCTCTAAAGCG (86)
17	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCTATCCTCTTCTTTTCTTTTATTCATAG (87)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAAAATGGTTCCTCCAATATTAATG (88)
18	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATAAGATTAATAGTTTATAGCTATTAATC (89)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTCAAATTTCTCCGAATA (90)
19	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGCTTTTCTTGACAAAATAAGGATTTTTG (91)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTATGCTCCTCAAATATTTTATTTG (92)
20	G TTCAGAAACTGCCTGATGGAAATCAAATCATTGGCAATGATTC (93)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATAGTAATTCCTTTTTAAGATGTG (94)
21	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCTCAAATATAAGCTTAATCGC (95)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTACTGTCTGCTTTTTATATTTTTCC (96)
22	G TTCAGAAACTGCCTGATGGGCGTCGGGCTTGCG (97)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAAAATCTACCTCTATATTATTTAAATTTTC (98)
23	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCTACAAACGCTTACTGAAAACG (99)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATAAATATATGATACAAAACCTCAGC (100)
24	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCAGCATTAAAGATAAAGAGTTATGAGC (101)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAATTTTTCTCCTTTGCC (102)
25	G TTCAGAAACTGCCTGATGGTAAATCATAAAACCTCTGTGAGAGG (103)
	C ATAAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCAAGCAAAGTACCTCCTTAAAAATTTTC (104)

ES 2 595 729 T3

26	G TTCAGAAACTGCCTGATGGAATAGAAGATATTTTTTCAGTAGATATAG (105)
	C ATTAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCATTTTTTTACCTCCATTTTATTTTGG (106)
27	G TTCAGAAACTGCCTGATGTTATAAGCAACATCACCTTATATCGG (107)
	C ATTAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCATTTTAATATTCTCCTATTAATTTTTTAG (108)
28	G TTCAGAAACTGCCTGATGGAAAACGCCTTAAAATGGCATTTTG (109)
	C ATTAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCATTTTAGAAATGTCCTCCATTTG (110)
29	G TTCAGAAACTGCCTGATGGCAAAGCTTGATTTTTTTATTTGAAAAATG (111)
	C ATTAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCATTATATTTACCTCCCATTAGAATTTTTATG (112)
30	G TTCAGAAACTGCCTGATGGTAAATTTGTTCCAAATGAAGAAACAAATA (113)
	C ATTAAAATAGCTGAGATAATCTTTTTTTTCATAATTATTTCTCCTTATTCTTAACG (114)
153	T GGATATTTTTTATAAATCTGG (155)
	C ATGAAATTTTCCTATCTTTTTTAATTC (156)

Tabla 3

Secuencia promotora (SEQ ID NO en la Tabla 1)	Sintetizada con oligos Oligo (SEQ ID NO)	
6	AAATTAAGGATAGATTTTTT	(115)
	ATAATAATGAAAAAGGATAGAAAAATCTATCCTTAATTT	(116)
	CTATCCTTTTTTATTATTATTCAAATGATAAAAATTTTCAAA	(117)
	AAAAGGTTTTGCGCTTACATTTTTGAAATTTTATCATTGGA	(118)
	ATGTAAGCGCAAAACCTTTTGAAGTTTAGGTTTGCGAAGA	(119)
	AAAGATTTTTCAAGTGAAAATCTTCGCAAAACCTAAACTTC	(120)
	TTTTCACTTGAAAAATCTTTCAAAAAATAGTAAAATCAAA	(121)
	GTCTGCACTCTTAATACATCTTTGATTTTACTATTTTTTG	(122)
	GATGTATTAAGAGTGCAGACGCACCTTAAAAATAAAGGAGACTAAAATG	(123)
	CATTTTAGTCTCCTTATTATTTTTAAGTGC	(124)
18	AGAGGGTTTCAGAAACTGCCTGATGGGATAAGATTAATAGT	(125)
	TTTAGCTATTAATCTTTTTTATTTTTATTTAAGAATGGC	(126)
	TTAATAAAGCGGTTACTTTGGATTTTTGTGAGCTTGACT	(127)
	AGAAAAAACTTCCAAAAATGCTATACTAGGTAGGTAAAA	(128)
	AAATATTCGGAGGAATTTTGAATGAAAAAAAAGATTATC	(129)
	TCAGCTATTTAATGTCTAC	(130)
	GTAGACATTAATAAGCTGAGATAATCTTTTTTTTTCATTT	(131)
	CAAAATTCCTCCGAATATTTTTTACCTACCTAGTATAGC	(132)
	ATTTTGTGAAGTTTTTTTCTAGTCCAAGCTCACAAAAATC	(133)
	CAAAGTAACCGCTTTATTAAGCCATTCTTAAATAAAAATA	(134)
	AAAAAAGATTAATAGCTAAAACCTATTAATCTTATCCCATC	(135)
	AGGCAGTTTCTGAACCCTCT	(136)
30	GGGTTTCAGAAACTGCCTGATGGTAAATTTGTTCCAAATGA	(137)
	AGAAACAAAATATTTTCAAAATCCTACTATTTGATAGTAGGA	(138)
	TTTTTAATATATTAGTCCAAAAGCTCAAAAAGGCTGATTT	(139)
	AAAGCAGATGAGTAGACTTTTTCAATTATTTTGTAAAGCAC	(140)
	TTTCAAAAAAATAGATAACGCTTGCATTATGAAAATGAAA	(141)
	ACGTTATAATTATTTTTATAAAGAACGTTAAATTATAAAA	(142)
	CGTTAAGAATAAGGAGAAATAATTATGAAAAAAAAGATTA	(143)
	TCTCAGCTATTTAATGTCT	(144)
	AGACATTAATAAGCTGAGATAATCTTTTTTTTTCATAATT	(145)
	ATTTCTCCTTATTCTTAACGTTTTATAATTTAACGTTCTT	(146)
	TATAAAAATAATTATAACGTTTTTCATTTTTCATAATGCAAG	(147)
	CGTTATCTATTTTTTGAAGTGCCTTACAAAAATAATTGA	(148)
	AAAGTCTACTCATCTGCTTTAAATCAGCCTTTTTGAGCTT	(149)
	TTGGACTAATATATTAATAATCCTACTATCAAATAGTAGG	(150)
	ATTTTGAATATTTGTTTCTTCATTTGGAACAAATTTACC	(151)
	ATCAGGCAGTTTCTGAACCC	(152)

Tabla 4. Composición de BM9:

	# ml
BM9	1000
sales 10x M9	100
casitona al 10 % (Difco, BD Biosciences San Jose, CA USA)	50
glucosa al 20 %	25
agua	772
NaHCO ₃ 1 M	25
Na ₂ CO ₃ 1 M	25
MgSO ₄ 1 M	2
CaCl ₂ 100 mM	1

5 Las sales 10x M9 es por litro: 60 g de Na₂HPO₄, 30 g de KH₂PO₄, 10 g de NH₄Cl, 5 g de NaCl.

Tabla 5 Resumen de los diversos plásmidos y sus constituyentes.

Plásmidos	Promotor	Líder de secreción	Gen	Referencia
pTREX1	P1	-	-	Wells y col., 1996
pT1NX	P1	usp45	-	Steidler y col., 1998b
pT1GLP2	P1	usp45	h[Gly2]GLP-2	Este trabajo
pThyAGLP2	PthyA	usp45	h[Gly2]GLP-2	Este trabajo
pT1N ₄ GLP2	P1	usp45 N ₄	h[Gly2]GLP-2	Este trabajo
pThyAN ₄ GLP2	PthyA	usp45 N ₄	h[Gly2]GLP-2	Este trabajo
phIIAN ₄ GLP2	PhIIA	usp45 N ₄	h[Gly2]GLP-2	Este trabajo

Tabla 6

Promotor	Resistencia del promotor relativa	Cepa	Referencia
thyA	1	Thy12	[2]
		sAGX0005	este trabajo
PdpsA	1,6	sAGX0012	este trabajo
PpepV	1,7	sAGX0018	este trabajo
PsodA	1,3	sAGX0029	este trabajo
PhIIA	3	sAGX0037	este trabajo

5 Resistencia relativa de los diversos promotores ensayada como se evaluó mediante la medición de la expresión de hIL-10 de las cepas indicadas. [2]: Steidler y col., 2003.

Tabla 7

Cepa	Conc. media hIL 10 (ng/10 ⁹ células)	Resistencia relativa del promotor	Densidad bacteriana (x10 ⁹ UFC/ml)
MG1363	0	0	4,1
sAGX0005	7,3	1	4,8
sAGX0037	29,1	4	4,2

10 Resistencia del promotor relativa en función de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Tabla 8

Promotor	usp45	Gen	Expresión relativa	Cepa	Referencia
PthyA	ts	hTFF1	1	sAGX0041	este trabajo
PhIIA	mut	hTFF1	2,3	sAGX0049	este trabajo
PhIIA	ts	hTFF1	6,5	sAGX0048	este trabajo
PthyA	ts	hTFF3	1	sAGX0043	este trabajo
PdpsA	ts	hTFF3	1,2	sAGX0059	este trabajo
PhIIA	mut	hTFF3	7,5	sAGX0057	este trabajo

Resumen de las diversas cepas de expresión de TFF usadas en este estudio y niveles de expresión relativos de TFF secretado de las cepas indicadas.

Tabla 9

Plásmido	Promotor	Gen	Expresión relativa	Referencia
pT1NX	P1	-	0	[3]
pAGX0211	P1	hPYY G9 (3-36)	1	este trabajo
pAGX0212	PthyA	hPYY G9 (3-36)	1,4	este trabajo
pAGX0213	PhIIA	hPYY G9 (3-36)	6,3	este trabajo

Resumen de las diversas cepas de expresión de hPYY G9 (3-36) usadas en este estudio y niveles de expresión relativos de hPYY G9 (3-36) secretado de los plásmidos indicados. Todos los plásmidos estaban presentes en MG1363 de *L. lactis*. [3]: Schotte y col., 2000.

Tabla 10

Plásmido	Promotor	Gen	Expresión relativa	Referencia
pT1NX	P1	-	0	[2]
pAGX0233	PthyA	GLP-1 G8 (7-36)	1	este trabajo
pAGX0234	PhIIA	GLP-1 G8 (7-36)	3	este trabajo

Resumen de las diversas cepas de expresión de hGLP-1 G8 (7-36) usadas en este estudio y niveles de expresión relativos de hGLP-1 G8 (7-36) secretado de los plásmidos indicados. Todos los plásmidos estaban presentes en *L. lactis* MG1363. [3]: Schotte y col., 2000

Tabla 11

Promotor	Cepa	hIL-10 (ng/ml)	Resistencia del promotor relativa	SEQ ID	Referencia
PthyA	sAGX0005 Thy12	27,74	1,000	153	este trabajo [2]
PpepQ	sAGX0026	26,39	0,951	17	este trabajo
PinfA	sAGX0033	16,20	0,584	25	este trabajo
Ppgk	sAGX0020	14,58	0,526	11	este trabajo
PatpD	sAGX0019	6,08	0,219	10	este trabajo
PrpsD	sAGX0028	5,70	0,205	19	este trabajo
Pluxs	sAGX0031	4,00	0,144	23	este trabajo
PglnR	sAGX0017	3,03	0,109	8	este trabajo
PrpoB	sAGX0011	0,59	0,021	2	este trabajo
PrplL	sAGX0035	0,50	0,018	27	este trabajo
PrpoA	sAGX0025	0,24	0,009	16	este trabajo
PfabF	sAGX0023	0,20	0,007	14	este trabajo
PglnA	sAGX0016	0,06	0,002	7	este trabajo
PfabG	sAGX0024	0,02	0,001	15	este trabajo

Resistencia relativa de los diversos promotores según se evaluó midiendo la expresión de hIL-10 de las cepas 10 indicadas.

Tabla 12 Secuencias promotoras subclonadas con éxito

Cepa	SEQ ID	Promotor
sAGX0005	153	PthyA
sAGX0011	2	PrpoB
sAGX0012	3	PdpsA
sAGX0016	7	PglnA
sAGX0017	8	PglnR
sAGX0018	9	PpepV
sAGX0019	10	PatpD
sAGX0020	11	Ppgk
sAGX0023	14	PfabF
sAGX0024	15	PfabG
sAGX0025	16	PrpoA
sAGX0026	17	PpepQ
sAGX0028	19	PrpsD
sAGX0029	20	PsodA
sAGX0031	23	Pluxs
sAGX0033	25	PinfA
sAGX0035	27	PrplL
sAGX0037	28	PhIIA

REFERENCIAS

15

Altschul et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10;
 Antelmann et al. (2000) J Bacteriol 182: 4478-90;
 Babyatsky M. W., de Beaumont M., Thim L., Podolsky D. K. (1996). Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. Gastroenterology 110, 489-497;

- Bolotin et al. (2001) "The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403" *Genome Res* 11: 731-753;
- Booth et al. (2004) *Cell Prolif* 37(6): 385-400;
- 5 Cazzaniga et al. (1994) "Oral delayed release system for colonic specific delivery" *Int. J. Pharm.* 108:7';
- Chien (1992) "Novel drug delivery system" 2nd edition, M. Dekker;
- Deacon CF, Knudsen LB, Madsen K, Wiberg FC, Jacobsen O, Holst JJ. (1998) "Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity" *Diabetologia* Mar;41 (3):271-8;
- 10 Delorme et al. (1999) *J Bacteriol* 181 (7): 2026-37;
- Gasson (1983) *J Bacteriol* 154: 1-9;
- Hansel et al. (1990) "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems" 5th edition, William and Wilkins;
- Kok et al. (1984) *Appl Environ Microbiol* 48(4): 726-31;
- Nauta et al. (1996) *Mol Microbiol* 19(6): 1331-41;
- 15 Maglott et al. (2005), Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 33 (Database Issue): D54-D58;
- Perez-Martinez et al. (1992) *Mol Gen Genet* 234: 401-11;
- Playford RJ, Marchbank T, Goodlad RA, Chinery RA, Poulson R, Hanby AM (1996). Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 2137-2142;
- 20 Prescott et al. (1989) *Novel drug delivery*, J. Wiley & Sons;
- Ross et al. (1990) "Cloning and characterisation of the thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*." *Appl Environ Microbiol* 56: 2156-2163;
- Schotte L, Steidler L, Vandekerckhove J, Remaut E. (2000) "Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*". *Enzyme and Microbial Technology* 27:761-765;
- 25 Sibakov et al. (1991) *Appl Environ Microbiol* 57(2): 341-8;
- Steidler et al. (1995) "Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*." *Appl Environ Microbiol* 61 (4): 1627-9;
- Steidler et al. (1998) "Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine." *Infect Immun* 66(7): 3183-9;
- 30 Steidler et al. (2000) *Science* 289:1352-5
- Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox E, Remon JP, Remaut E. (2003) "Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10" *Nat Biotechnol* 21:785-789;
- 35 Stemmer, et al. (1995) *Gene* 164(1) 49-53;
- Tan X.-D, Hsueh W., Chang H., Wei, K.R. and Gonzalez-Crussi F. (1997) Characterization of a putative receptor for intestinal trefoil factor in rat small intestine: Identification by in situ binding and ligand blotting. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 237, 673-677.
- Tatusova and Madden (1999) *FEMS Microbiol Lett* 174: 247-250;
- 40 van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de Vos WM, Simons G (1990) "Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363" *Gene* 95(1):155-160;
- van der Vossen et al. (1985). *Appl Environ Microbiol* 50: 540-2;
- van der Vossen et al. (1992) *Appl Environ Microbiol* 58: 3142-9;
- Waterfield NR, Le Page RW, Wilson PW, Wells JM. (1995) "The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*" *Gene* 165(1):9-15;
- 45 Wells et al. (1993A) *Appl Environ Microbiol* 59: 3954-9;
- Wells et al. (1993B) *Mol Microbiol* 8(6): 1155-62;
- Wong, W.M. (1999). Trefoil peptides. *Gut* 44: 890-895.
- Wright N.A., Poulson R., Stamp G.W., Hall P.A., Jeffery R.E., Longcroft J., Rio M.C., Tomasetto C and Chambon P. (1990). Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J. Pathol.* 162, 279-284.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor nativo de un gen para la proteína de unión a ADN tipo HU (PhIIA) de una especie *Lactococcus* como se expone en la SEQ ID NO: 28, o un homólogo o una variante funcional o fragmento funcional del mismo, en el que el homólogo o variante funcional o fragmento funcional el mismo es al menos un 95 % idéntico al promotor como se expone en la SEQ ID NO: 28, unido operativamente a un marco de lectura abierto heterólogo al promotor, comprendiendo dicho marco de lectura abierto una secuencia que codifica un polipéptido, y que comprende adicionalmente una secuencia que codifica una secuencia de señal usp45 o usp45N4 5' aguas arriba de dicha secuencia que codifica el polipéptido.
2. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente
- una secuencia terminadora de la transcripción 3' con respecto a dicho marco de lectura abierto;
 - un operador configurado para controlar la transcripción de dicho promotor PhIIA; y/o
 - secuencias configuradas para realizar la inserción de dicho ácido nucleico recombinante en el cromosoma de una célula huésped, preferiblemente por recombinación homóloga.
3. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho marco de lectura abierto codifica un polipéptido capaz de provocar una respuesta terapéutica o inmunógena en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano o animal.
4. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho marco de lectura abierto codifica un antígeno y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo.
5. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal.
6. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es capaz de producir un efecto terapéutico en un sujeto humano o animal.
7. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria y de usarse como una vacuna en un sujeto humano o animal.
8. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es hIL-10, GLP-2, GLP-1, TFF o hPYY.
9. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho ácido nucleico recombinante comprende:
- (a) PhIIA, usp45 y hIL-10; PhIIA, usp45N4 y hIL-10;
 - (b) PhIIA, usp45N4 y hTFF1; PhIIA, usp45 y hTFF1;
 - (c) PhIIA, usp45N4 y hTFF3; PhIIA, usp45 y hTFF3;
 - (d) PhIIA, usp45N4 y hPYY; PhIIA, usp45 y hPYY; PhIIA, usp45 y hPYY G9 (3-36);
 - (e) PhIIA, usp45N4 y GLP-1; PhIIA, usp45 y GLP-1;
 - (f) PhIIA, usp45N4 y GLP-2; o PhIIA, usp45 y GLP-2.
10. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.
11. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho ácido nucleico recombinante comprende PhIIA, usp45 y hTFF1.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que preferiblemente, dicho vector se obtiene a partir de pT1NX.
13. Una célula huésped transformada con el ácido nucleico recombinante como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o con el vector de la reivindicación 12.
14. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 13, transformada con el ácido nucleico recombinante como

se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o con el vector de la reivindicación 12, en la que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.

15. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 14, transformada con el ácido nucleico recombinante como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o con el vector de la reivindicación 12, en la que dicho ácido nucleico recombinante comprende PhIIA, usp45 y hTFFI.

16. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante, como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho promotor PhIIA está presente en el cromosoma de dicha célula huésped, y en la que dicho promotor está unido operativamente a un marco de lectura abierto heterólogo a dicho promotor.

17. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 16, en la que dicho promotor PhIIA comprende adicionalmente un operador configurado para controlar la transcripción de dicho promotor.

18. La célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, en la que dicho marco de lectura abierto codifica un polipéptido capaz de provocar una respuesta terapéutica o respuesta inmunógena en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano o animal.

19. La célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que dicho marco de lectura abierto codifica un antígeno y/o un polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo.

20. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19, en la que

- dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, en un sujeto humano o animal,
- dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es capaz de producir un efecto terapéutico en un sujeto humano o animal;
- dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es hIL-10, GLP-2, GLP-1, TFF o hPYY,
- dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria y de usarse como una vacuna en un sujeto humano o animal.

21. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicha célula huésped comprende:

- (a) PhIIA, usp45 y hIL-10; PhIIA, usp45N4 y hIL-10;
- (b) PhIIA, usp45N4 y hTFFI; PhIIA, usp45 y hTFFI;
- (c) PhIIA, usp45N4 y hTFF3; PhIIA, usp45 y hTFF3;
- (d) PhIIA, usp45N4 y hPYY; PhIIA, usp45 y hPYY; PhIIA, usp45 y hPYY G9 (3-36);
- (e) PhIIA, usp45N4 y GLP-1; PhIIA, usp45 y GLP-1;
- (f) PhIIA, usp45N4 y GLP-2; o PhIIA, usp45 y GLP-2.

22. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.

23. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende PhIIA, usp45 y hTFFI.

24. La célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, que es una bacteria no patógena y no invasiva, preferiblemente una bacteria Gram-positiva, más preferiblemente una bacteria de ácido láctico, incluso más preferiblemente una bacteria *Lactococcus* o una bacteria *Lactobacillus* y mucho más preferiblemente una bacteria *Lactococcus lactis* o *Lactobacillus casei*.

25. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24, en la que la célula huésped es *Lactococcus lactis*.

26. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en la que la célula huésped se *Lactococcus lactis* y en la que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.

27. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en la que la célula huésped es *Lactococcus lactis* que comprende PhIIA, usp45 y hTFFI.

28. Uso del ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el vector de la reivindicación 12 para conseguir la expresión de un producto de expresión codificado por dicho marco de lectura abierto, en una célula huésped *in vitro*.
- 5 29. Una composición farmacéutica que comprende la célula huésped como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27.
30. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 29, en la que la célula huésped es *Lactococcus lactis*.
- 10 31. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 29 o 30, en la que la célula huésped es *Lactococcus lactis* y en la que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.
- 15 32. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 29 que comprende PhIIA, usp45 y hTFFI.
33. Una célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27 para su uso como un medicamento.
- 20 34. La célula huésped para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 33, en la que la célula huésped es *Lactococcus lactis*.
35. La célula huésped para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, en la que la célula huésped es *Lactococcus lactis* y en la que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.
- 25 36. La célula huésped para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 33 que comprende PhIIA, usp45 y hTFFI.
- 30 37. Uso de la célula huésped como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27 para la fabricación de un medicamento para la administración del polipéptido codificado por dicho marco de lectura abierto del ácido nucleico recombinante para un ser humano o animal.
38. Uso de la célula huésped para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 37, en el que la célula huésped es *Lactococcus lactis*.
- 35 39. Uso de la célula huésped para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 37 o 38, en el que la célula huésped es *Lactococcus lactis* y en el que dicho polipéptido no vacinógeno terapéuticamente activo es TFF.
- 40 40. Uso de la célula huésped para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 37, en el que la célula huésped comprende PhIIA, usp45 y hTFFI.

FIGURA 1

GATTTTGTAAATTAATATTTGGAGAGGGATTTACTGACAAAAATTCTGTCAGTAAATCTCTAATCTCAAA
ATCGTCTAGCGTTAAATTTATTAGAAGTGGAGAAAGAATTG (SEQ ID NO: 1)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGGCTAGATAAGCCTTGAAAATTTCTACAATAAATAGTATAATAGAAATAA
TGGTTTGTGTCAGCAAAATCTGTGGGATATATTGTCCCATAGGCTTTGTAAGCAACGAAACACTACTGTT
TTCGTTGCTTTTTTTGGCGTCTTTTATATTGAATAAATCAGAAAAGTTATTAAAAAGACAACTACTGAA
TTTTCGGTTTTTTTAAATTAATAATTCATCAAAAACACAGACTTTTTTAATCAAATCTAAAAAATAGAGG
AGAAAACACTTGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATG (SEQ ID NO: 2)

GCTAGATAAGCCTTGAAAATTTCTACAATAAATAGTATAATAGAAAATAATGGTTTGTGTCAGCAAAATCTG
TGGGATATATTGTCCCATAGGCTTTGTAAGCAACGAAACACTACTGTTTTCGTTGCTTTTTTTGGCGTC
TTTTTATATTGAATAAATCAGAAAAGTTATTAAAAAGACAACTACTGAATTTTCGGTTTTTTTTAATTAA
AAATTCATCAAAAACACAGACTTTTTTAATCAAATCTAAAAAATAGAGGAGAAAACACTTG (SEQ ID
NO: 157)

ACTAATCTATACGAAAATTGATTTTGAATGTAACATAAAATGGAATTAATAAGAAAATTTGGTTTATAAT
ATATTTATAGAAAAGTTAATATTTAAATCTCTTTTATGACATTTAATATTTAAAAAATGGAGGTTAGTTAT
G (SEQ ID NO: 3)

CTAAGTTACTGCAAATCTGTTTCTAGTTAAGTGTTAAACGCATAATTAGGGCAGAGATATATAATTAAT
CATTATAGGAGAAAAACACAAAATG (SEQ ID NO: 4)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATAAATTTCACTGACGCAAGCTTCTTTAATTTGTGGTAAAATAGATGT
GATTGTTAGAGTAGTAATTAATAATTTAAAACCAATAAAGATTTCATTTCTGATAAAAAAGAAGTGAAGAA
ATCAATGAGGAGAATTGGATTAAAATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATG (SEQ ID NO:
5)

AAATTAAGGATAGATTTTTTCTATCCTTTTTTCATTATTATTCAAATGATAAAATTTCAAATGTAAGCG
CAAAACCTTTTGAAGTTTAGGTTTGCAGAGATTTTCACTTGAAAAATCTTTCAAAAAATAGTAAAATCA
AAGATGTATTAAGAGTGCAGACGCACTTAAAAATAATAAGGAGACTAAAATG (SEQ ID NO: 6)

ATTTGGTTGACATAATTTGTCAAGCAAGTTTACAGCGAAAATTTAACTAGGAGAGTAAAGCATG (SEQ
ID NO: 7)

CAAATAAAAAGAACTGATGTGAGAAAATCTCACATTGAAGCTTGACTTTGCGAAAGACAAGGTCTATAA
TGATACGTATGGAGGCGAGATTTGGTGAAGAACGTGAATTAAGACGCTCTATG (SEQ ID NO: 8)

FIGURA 1B

G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATATTATCTTTATCCTCCTTATATATAATCTTTTTAAATAGTATTTTC
AGAATAACATAATAACCTGTAACAAGGTAGGTAATTAAGATGCCAATAAAAAGCTCGTTATTAGTGCAGT
TTTTGAAACAATATAAAAATGACTACCTAATAACTGTGATACTTATTTGAGTAAAATATTTTGAAGGGAA
ATTTACTGATGAAAGTGGTTAAGAAAAGTTACTTTAATTCATATTTATTAGTACTTATTGCACCATGTT
GAGTAACTATGATACAATAGATAAAATATACTACTTCAAGGAGAAGATTATGAAAAAAAAGATTATCTCA
GCTATTTTAATG (SEQ ID NO: 9)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATATTATCTTTATCCTCCTTATATATAATCTTTTTAAATAGTATTTTC
AGAATAACATAATAACCTGTAACAAGGTAGGTAATTAAGATGCCAATAAAAAGCTCGTTATTAGTGCAGT
TTTTGAAACAATATAAAAATGACTACCTAATAACTGTGATACTTATTTGAGTAAAATATTTTGAAGGGAA
ATTTACTGATGAAAGTGGTTAAGAAAAGTTACTTTAATTCATATTTATTAGTACTTATTGCACCATGTT
GAGTAACTATGATACAATAGATAAAATATACTACTTCAAGGAGAAGATTATG (SEQ ID NO: 158)

AAATGAATAGAAATTCTGTTGTTAGACAGAAAATAAAAACAGGAGGAAAAACATTG (SEQ ID NO:
10)

G TTGCTTAGCAAAGCTCAAAAAATCTGTCAGTAAAAATAAAATCAAGAATCTTGTA AAAAGTAACCCTTT
ACAAGCTAAAAGTAAAATTCTCAAAGCCAAAATATCCGAATTTGTGATATAATTAACCTATCGATTTGA
ATTGAATCAGCATGGTGCTTTTTTCAATCTCAACAAAATTATCTTATAAGGAGAATTTTTTCCAAATG
(SEQ ID NO: 11)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGGAATAAAAATTACTGTCAGCCTGCTCAGTAATTTTTTTAGTCATATTTT
TAGGTGAAAAGTCAAAGATTATTGCCAAAAGTATTAGCTTTTTTAAATGTTAACCGCTTTCAGGAGAAGG
GGAGTTCATTTGCTTTTGTAGAGCGCTTCTAAGGTAGTTTATGTTTGCAAATTTTAAAAAAGTGTTA
AAATAAAAAGAGTAAGTTAAATTGTTAACTTAGTCAATTTAAAAGGTTTGCCTTTTATAAAAATCTAATCC
CTATAAGGAGGAACTACTAATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATG (SEQ ID NO: 12)

AACCGCTTTCAGAAGAAGGGGAGTTCATTTGCTTTTGTAGAGCGCTTCTAAGGTAGTTTATGTTTGCA
AATTTTAAAAAAGTGTTAAAATAAAAAGAGTAAGTTAAATTGTTAACTTAGTCAATTTAAAAGGTTTGC
CTTTTATAAAAATCTAATCCCTATAAGGAGGAACTACTAATG
(SEQ ID NO: 159)

AAATAAAAAATTTATTGGCTAGTCTGTCAGTAATTTTTTTATTGTATAAAAATCATTAAAAATGCAAACGCT
TTTTATTTGTAATTGAAATAAAAAAATAACCAAGTGAATCATGGCTGAAAAACACAAAAGAAATTGTAA
TTGTGTTATAATTTAACCGTATTTCAAATTC AAGGAAGGTTTATTAAACATG (SEQ ID NO: 13)

TGTCAGTAATTTTTTTATTGTATAAAAATCATTAAAAATGCAAACGCTTTTTATTTGTAATTGAAATAAAA
AAATAACTAAGTGAATCATGGCTGAAAAACACAAAAGAAATTGTAATTGTGTTATAATTTAACCGTATT
TCAAATTC AAGGAAGGTTTATTAAACATG
(SEQ ID NO: 160)

FIGURA 1C

ATTGCTCATTTATAAATTTTGAAATTAAGAAGGATAAAAAATATG (SEQ ID NO: 14)

GGAGAAAGGAATTGAGTTCGTCCCTTCTAAACAGTCAGCAATAATCTGACATCAGAGATATCAGATTATT
GCTGTCCCTGAAGTCTAAGCACTAAAGTGCTAAGACCCTAAGGCGGGCTCACATCTTATAAATAATG
(SEQ ID NO: 15)

GGAGAAAGGAATTGAGTTCGTCCCTTCTAAACAGTCAACGATAATCTGACATCAGATTATT
GCTGTCCCTGAAGTCTAAGCACTAAAGTGCTAAGACCCTAGGGCGGGCTCACATCTTATA
AATAATG (SEQ ID NO: 161)

TTAGTCACTCTTGTCACTAATCACTTTTCGCTTTAGAGGAGAACATACATG (SEQ ID NO: 16)

CTATCCTCTTTCTTTTCTTTTATTTCATAGTATTTATGAAAACCATTTTCATTTACAAATTATATCATG
AACTGTAAACCTTTTCAACCTTCAAGTGTGTTTTTTTACGTGATTTTCAATAAAAAATAGCGTAGAATG
GGTATATAATGTTTTTTATTTTTCAGGAGAATTTAGAAAACCTATTTTCATTAATATTGGAGGAACCATT
TTG (SEQ ID NO: 17)

CTATCCTCTTTCTTTTCTTTTATTTCATAGTATTTATGAAAACCATTTTCATTTACAAATTATATCATG
AACTGTAAACCTTTTCAACCTTCAAGTGTGTTTTTTTACGTGATTTTCAATAAAAAATAGCGTAGAATG
GATATATAGTGTTTTTTATTTTTCAGGAGAATTTAGAAAACCTATTTTCATTAATATTGGAGGAACCATT
TTG (SEQ ID NO: 162)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGGATAAGATTAATAGTTTTAGCTATTAATCTTTTTTTATTTTTATTTAAG
AATGGCTTAATAAAGCGTTACTTTGGATTTTTGTGAGCTTGACTAGAAAAAACTTCACAAAATGCT
ATACTAGGTAGGTAAAAAATATTCGGAGGAATTTTGAAATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTA
ATG (SEQ ID NO: 18)

GATAAGATTAATAGTTTTAGCTATTAATCTTTTTTTATTTTTATTTAAGAATGGCTTAATAAAGCGGTT
ACTTTGGATTTTTGTGAGCTTGACTAGAAAAAACTTCACAAAATGCTATACTAGGTAGGTAAAAA
TATTCGGAGGAATTTTGAAATG (SEQ ID NO: 163)

GCTTTTCTTGACAAAATAAGGATTTTTGGTATAATAGAAAAGTTGAATATAGCAGTCAGCTAGAAAGCT
CGTCAACATTTTGCTGTTATGTCAAGGAAGATAAGTCATTATGTTCCCTTGTGTCAAGTAACTGAAGCTA
TAAGCGAAGGCAAAATGAACGAATTCGAGGCTGTCAATATTCTTCAAATAAAATATTTGGAGGACATAA
ATTATG (SEQ ID NO: 19)

AAATCAAATCATTGGCAATGATTTCAAAAACGACTATAATGAGAATAGAATTAAAAAATAATCTAACT
GAATTCCATTCTCAATCTGGTCAAATAACCAAGTATTAAGACTTCAAATGGATTACATCTTAAAAG
GAGAATTACTATG (SEQ ID NO: 20)

FIGURA 1D

G TTCAGAAACTGCCTGATGGCTCAAAATATAAGCTTAATCGCTTTTTTAAAAAAGGATTGAAAGTAAAA
A TAGATTGACAATCACTGTAAAAAATGATATTATATTAACGGTACTTTTTACTTTGGACTCTCAGGAG
A AACTTGTATAAGTTGCTAAACTTCTTGTGCAACTTTGGCTTAAGCGACCATATACTGACTAAAAAATTG
A TAAAAAGAAATTGAGTTTCGATTTCCCATATTCTAGGAAAATAGACAAATGTTTCCAAGGAACTTCGTT
C TCTCCAACGTTTTCTAATTTTCTACGAATATAAACGGTCAATCTCACATCTTAAATCATCCAATAAAA
A GAAAAGGAATGCTTTTTGTATTTCTCATCGCTTCGCAGAAATGTGGAAAAATATAAAAAGCAGACAGTAA
A ATGAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATG (SEQ ID NO: 21)

T CAAAAATATAGGCTTAATCGCTTTTTTAAAAAAGGATTGAAAGTAAAAAAGGAATGCCAGT
T CCTTTTTTACAATATTCTAAAAAATAGATTGACAATCACTATAAAAAAATGATATTATA
T TAAACGGTACTTTTTACTTTGGACTCTCAGGAGAACTTGTATAAGTTGCTAAACTTCTT
G TCAACTTTGGCTTAAGCGACCATATACTGACTAAAAAATTGATAAAAGAAATTGAGTT
C GATTTCCCATATTCTAGGAAAATAGACAAATGTTTCCAAGGAACTTCGTTCTCTCCAA
C ATTTTCTAATTTTCTACGAATATAAACGGTCAATCTCACATCTTAAATCATCCAATAAAA
A GAAAAGGAATGCTTTTTGTATTTCTCATCGCTTCGCAGAAATGTGGAAAAATATAAAAAGC
A GACAGTAAAATG (SEQ ID NO: 164)

G CGTCGGGCTTGCCTGCTAGCTTTTGGCTTTATGTACGTCAGTACGATTCAGCACGGACTTCGTCCTAA
A AAGCTGCCTAGCAATCCTTTAGCAAAAAATGTTATCCGTAATTGGTGGTTTTGATTTAGGTCAAATTGCC
A GTATTTTGTCAATGCTAACCTTTGTTAGACAGACAAAAACTCCCGCTTGCTGATTATTTTATTAATCA
G TAAGAAAATCGATGGCAAAAACTATCGAAATTTAAATAATATAGAGGTAGAATTGTG
(SEQ ID NO: 22)

T TTTTGGCTTGGGCTTGCCTGCTTAGCTTTTGGCTTTACATACGTCAGTACGCTTCAGCAT
G GACTTCGTCCTAAAAGCTGCCTAGCAATCCTTTAGCAAAAAATGTTATCCGTAATTGGT
G GTTTTGATTTAGGTCAAATTGCCAGTATTTTGTCAATGCTAACTTTGTTAGACAGACAAA
A AACTCCCGCTTGCTGATTATTTTATTAATCAGTAAGAAAATCGATGGCAAAAACTATCG
A AAATTTAAATAATATAGAGGTAGAATTGTG (SEQ ID NO: 165)

C TACAAACGCTTTACTGAAAACGCTATAAAGTCATTTTACCCTTTATAATAAAAAAATAAAAAATATTT
C GCATAAAAAAATGATAGAATAGAATTAGAATTTAAATAAAGGAGGAGATACGACAAGGCTGACTTTTA
T CCGCTGAGTTTTGTATCATATATTTTATG (SEQ ID NO: 23)

C TACAAACGCTTTACTGAAAACGCTATAAAGTCATTTTACCCTTTATAATAAAAAAATAAAAAA
A AAAATATTTGCTTAAAAAATGATAGAATAGAATTAGAATTTAAATAAAGGAGGAGATA
C TGACAAGGCTGACTTTTATCGGCTGAGTTTTGTATCATATATTTTATG (SEQ ID NO: 166)

FIGURA 1E

G TTCAGAAACTGCCTGATGGCAGCATTAAAGATAAAGAGTTATGAGCTAAAAATAAGCACTTGTCAAAC
TCTGATAATCTGTTATACTTATTTAGTATGTTTTTGCATACTAATAAAACTGTTTCATCCGCTGAGCTTA
ATTTGCTAAAAGCTGCTTATGATGGGCAAGAGGAGAAAAAATGAAAAAAGATTATCTCAGCTATTT
TAATG (SEQ ID NO: 24)

CAGCATTAAAGATAAAGAGTTATGAGCTAAAAATAAGCACTTGTCAAACCTTCTGATAATCTGTTATACTT
ATTTAGTATGTTTTTGCATACTAATAAAACTGTTTCATCCGCTGAGCTTAATTTGCTAAAAGCTGCTTAT
GATGGGCAAGAGGAGAAAAAATG (SEQ ID NO: 167)

TAAATCATAAAACCTCTGTCAGAGGTTTTTTATTTTAAATATGAAAAATGAAAGATAAAATTTACTGAC
AGAAAAGTCAACAAGCTTAAAAATAAAAAGAAACACCCGAAAGCATTGCCATAGGTACTCTTATCAGAT
AATCTGAAAATAAAAATGTTGCATTTGTTGTTGAAAAATGCTAAAATACATAAGTCCGACTTTTTAGAT
ATATTTAAATTTGTATTTATATCTTTCGGGAAATTTTTAAGGAGGTACTTTTGCTG
(SEQ ID NO: 25)

TAAATCATAAAACCTCTGTCAGAGGTTTTTTATTTTAAATATGAAAAATGAAAGATAAAA
TTTACTGACAGAAAAGTCAACAAGCTTAAAAATAAAAAGAAACACCCGAAAGCATTGCCA
TAGGTACTCTTATCAGATAATCTGAAAATAAAAATGGACTCAGGCTAGAAAAATAAAGGC
TTTTATGAAAGAAAGACTTGCATTTGTTGTTGAAAAATGCTAAAATACATAAGTCCGACT
TTTTAGATATATTTAAATTTGTATTTATATCTTTCGGGAAATTTTTAAGGAGGTACTTTT
GCTTG (SEQ ID NO: 168)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGAATAGAAGATATTTTTTCAGTAGATATAGATTAATAAAAAGATAAATAGAT
TTCAAAGTAAGTTTATCCTTGCATTTCTAAAAAACTTTGATATACTTATTTACGGTTCTAAAAGAACT
GACCGAAGACAGTAGGGGACGAAAGTCATAAECTTCTACCGAGGACAAATATCAAATGATAATTGAA
CTCTCTATGTCTTTTGTGTGTAGAGATTTTTTGTCTTACAACCAAATAAAATGGAGGTAAAAAATG
AAAAAAGATTATCTCAGCTATTTAATG (SEQ ID NO: 26)

TTTTTCAGTAGATATAGATTAATAAAAAGATAAATAGATTTCAAAGTAAGTTTATCCTTGCATTTCTAAA
AAAACTTTGATATACTTATTTATGGTTCTAAAAGAACTGACCGAAGACAGTAGGGGACGAAAGTCATAA
ACTTCTACCGAGGACAAATATCAAATGATAATTGAACTCTCTATGTCTTTTGTGTGTAGAGATTTTT
TGTTTCTACAACCAAATAAAATGGAGGTAAAAAATG (SEQ ID NO: 169)

AAGAAGAATCAGCTGCTTAATTATAAGCAACATCACTTATATCGGCGGATTTACGCAACAACTAAAAA
ATTAATAGGAGAATATTAATGGCATTGAACATTGAAAACATCGTTGCTGAA (SEQ ID NO: 27)

TTATAAGCAACATCACTTATATCGGCGGATTTACGCAACAACTAAAAAATTAATAGGAG
AATATTAAATG (SEQ ID NO: 170)

AAAACGCCTTAAAATGGCATTGTTGACTTGCAAACCTGGGCTAAGATTTGCTAAAATGAAAAATGCCTATG
TTAAGGTAAAAACAAATGGAGGACATTTCTAAAATG (SEQ ID NO: 28)

FIGURA 1F

CAAAAGCTTGATTTTTTTTATTTGAAAAATGTTATAATCAACAAGTATGTTGTTTTTAAGCACATAAAAA
TTCTAATGGGAGGTAAATATAATG (SEQ ID NO: 29)

G TTCAGAAACTGCCTGATGGTAAATTTGTTCCAAATGAAGAAACAAATATTTCAAAATCCTACTATTTG
ATAGTAGGATTTTTAATATATTAGTCCAAAAGCTCAAAAAGGCTGATTTAAAGCAGATGAGTAGACTTT
TCAATTTATTTGTAAAGCACTTTCAAAAAATAGATAACGCTTGCATTATGAAAATGAAAACGTTATAA
TTATTTTTATAAAGAACGTTAAATTATAAAACGTTAAGAATAAGGAGAAATAATTATGAAAAAAAAGAT
TATCTCAGCTATTTTAATG (SEQ ID NO: 30)

TAAATTTGTTCCAAATGAAGAAACAAATATTTCAAAATCCTACTATTTGATAGTAGGATTTTTAATATA
TTAGTCCAAAAGCTCAAAAAGGCTGATTTAAAGCAGATGAGTAGACTTTTTCAATTTATTTTGTAAAGCAC
TTTCAAAAAATAGATAACGCTTGCATTATGAAAATGAAAACGTTATAATTATTTTTATAAAGAACGTTA
AATTATAAACGTTAAGAATAAGGAGAAATAATTATG (SEQ ID NO: 171)

TCAGGATAGAAAAATTTTCTTCCTTTGTTAAAACTTAGTGGAGAATTTTTCAAACCTCAAATGTTAAA
CTTTTGAAAACATGCAAAGGTAATTTTTAAAACCTTGCTTATTCATGCTCAAAAAGTATAACTGCAGTTTA
AAGCTAAATAGCCTTGAACCTAGTAAAAATTTCTAGAAGGGAGCATATTTTTTG (SEQ ID NO: 31)

TCAGGATAGAAAAATTTTCTTCCTTTGTTAAAACTTAGTGGAGAATTTTTCAAACCTCAAACCTGTTAAA
CTTTTGAAAACATGCAAAGGTAATTTTTAAAACCTTGCTTATTCATGCTCAAAAAGTATAACTGCAGTTTA
AAGCTAAATAGCCTTGAACCTAGTAAAAATTTCTAGAAGGGAGCATATTTTTTG
(SEQ ID NO: 172)

TAAATGATAAAAGTTGCTGACAGAGTTGTCAGTACTTTTTTTTGATGCTGTCAGCAAAAAGAAAAGATA
ATTTTAAATTTTATGAATAAGAGTGTGGTTTAAATTGCTAGCCTGTCAGTAATTTGTGCAAACCTGCCAAA
AGATTTAGGCACTTATCTTATTGTTTTTTAGAAAACGTTTACAGTAGAATATAAACAAAGAACAAAAGTT
ACTAGAGGAGAAATAATG (SEQ ID NO: 32)

ATGATAAAAGTTGCTGACAGAGTTGCCAGTACTTTTTTTTGATTCTGTCAGCAAAAAGAA
AAGATAATTTTAAAATTGTGAATAAGCGTGTGGTTTAAATTGCTAGCCTGTCAGTAATTTG
TGCAAACCTGCCAAAAGATTTAGGCACTTATCTTATTGTTTTTTAGAAAACGTTTACAGTA
GAATATAAACAAAGAACAAAAGTTACTAGAGGAGAAATAATG (SEQ ID NO: 173)

CTTATTTACAAAGCATAACCTTAGGAAATTTCTCCAAAAAATGATAAATTTCTAATTATAGACACATAA
AAAAGAAAGGGAATCTATTATG (SEQ ID NO: 33)

CTTATTTACAAAGCATAACCTTAGGAAATTTCTCCAAAAAATGATAAATTTCTAATTATAGACACATAA
AATAGAAAGGGAATCTATTATG (SEQ ID NO: 174)

FIGURA 1G

TTTAATAAAAACTGAAAAATCACAGCTAAACTCTTGTTTTACTGTGATTTTATGTTAAAATAATTAA
TGAGTGTAATTGTATATAAAATTATCTGTACACTTAACTAATTTATTAATAAAAAAATATGAATCGTGAT
GTGTGAGGGAAAGGAGTCGCTTTTATG (SEQ ID NO: 34)

TTTAATAAAAACTGAAAAATCACAGGTAACCTCTTGTTTTACTGTGATTTTATGTTAA
AATAATTAATGAGTGTAATTGTATATAAAATTATCTGTACACTTACCTAATTTATTTGAAA
AAAAATATGAATCGTGATGTGTGAGGGAAAGGAGTCGCTTTTATG (SEQ ID NO: 175)

ACTAATTTAATTACCAGTAAAAATCACTTGTATTAAAGTTAAAGGTTGAGTTTCAAAGATGAAAGTTA
GGAAAAATTG (SEQ ID NO: 35)

ATGGAAATTTTAACATATTTCTTGGTATAATTATAGTGAAATCATCAAAGAATTACTGACAGATTTG
TCAGTAAATTTTTTTCAGTATCCCGGAGGAGAAAAATG (SEQ ID NO: 36)

AATTCGCTCACTTACCGCACGAAGCAATTTTAAACTATCAACGTTTTTTAGATTACAACACTTAATCATT
TCCTTTTGTAAGGAATTTAATAGGTTAATTTTTACTGACAGTTCTGTTCAGTAAATTTTCGTACGTCAA
TCTACTTAGAAAGGAAGTGAATTCAGTGAGTAATTTACTTGCTGAATCGTATTTAATCTTATG (SEQ
ID NO: 37)

AATTCGCTCACTTACCGCACGAAGTAATTTTAAACTATCAACGTTTTTTAGATTACAACAC
TTAATCATTTCCTTTTGTAAGGAATTTAATAGGTTAATTTTTACTGACAGTTCTGTTCAGT
AAATTTTCGTACGTCAAATCTACTTAGAAAGGAAGTGAATTCAGTGAGTAATTTACTTGC
TGAATCGTATTTAATCTTATG (SEQ ID NO: 176)

ATTTCTCTCCTCACAAACTATTTTATTTACTATAATTATTTTATCACAAAAAAGCGTTTTTCAGCAAAA
ATATTAATTTTATTCTTAGAAAAAATGCAAAATCTCCCTTAAGGGATTATATTGGCAAAAAATATTA
GTTAAATTTGTCAGATAACATTGAGATATAAAAAACAGAATAAAAAGAAAGTGGAGTAGGATAGCTTTC
ACTTACTCATATTGATAAAAAGAAATAAATGAATAGATGCTTGCAAAAGTAGCTTAAACAATGTATAATG
AGAGAGTTGCTATGCAACCATCTCGCATTTCGTCTCGACAAAGTCGTAGTGTACGCAAGTATTGCGGCT
GCGGATGACAGATGAAAGAGGAAAAACTATTTTAAAAGGAGACATTAATATGT (SEQ ID NO: 38)

TTCTCTCCTCACAAACTATTTTATTTACTATAATTATTTTATCACAAAAAAGCGTTTTTC
AGCAAAAATATTAATTTTATTCTTAGAAAAAATGTAAAAATCTCCCTTATGGGGATTAT
ATAGGCAAAAATATTCGTAAATTTGTCAGACAACATTGAGATATAAAAAACAGAATAAA
AAGAAAGGGGAGTAGGATAGCTTTCATTTACTCATATTGATAAAAAGAAATAAATGAATAG
ATGCTTGCAAAAGTAGCTTAAACAATGTATAATGAGAGAGTTGCTATGCAACCATCTCGC
ATTTCTGCTCGACAAAGTCGTAGTGTACGCAAGTATTGCGGCTGCGGATGACAGATGAAA
GAGAAAAACTATTTTAAAAGGAGACATTAACATG (SEQ ID NO: 177)

FIGURA 1H

GTTGTGTATCTGCCATTTTATTCTCCTTTCGTATTTTTATTATTATAATCATTTTATCATTTAATTA
 TCATTTTACTAAATGATATGATGCATTTTGAAGATAATAAAAATGCTAGTAATAAGAGCTGGCCTAATAT
 TCTAAAATTGTAATATATATATATCTAAATAATAAAAATTAATCTTAAAAGTCATCTAAAACAATCAGTC
 AAAAGTTGATAAAGAATTAGGGCTTGACAAGTTCTAAAATAATTGATAGAATAATAGAGTTGAAAAGCA
 GAAGCACCCGCTTCTCGCCTTAGAGGTTATAGCCCTGGGCAAACAAATG (SEQ ID NO: 39)

TATTTTTATTTTATTATAATCATTTTCATCATTTAATTATCATTTTGCTAAATGATATGAT
 GCATTTTGAAGATAATAAAAATGCTAGTAATAAGAGCTGGCCTAATATTCTAAAATTGTAT
 TATATATATCTAAATAATAAAAATTAATCTTAAAAGTCATCTAAAACAATCAGTCAAAAAGT
 TGATAAAGAATTAGGGCTTGACAAGTTCTAAAATAATTGATAGAATAATAGAGTTGAAA
 GCAGAAGCACCCGCTTCTCGCCTTAGAGGTTATAGCCCTGGGCAAACAAATG (SEQ ID NO: 178)

TTAAGAAAAGTAATTCTCATGTCAAAAAGGAATCTTAGGGAAAAAAGTGGGAATGACTCAAATCTTCACA
 GACAACGGTGAATTAATTCCTGTACTGTGATCGAAGCGACTCCAAACACAGTTCTTCAAGTTAAATCT
 GTCGAAAACAGACGGTTACGAAGCAACTCAAGTTGGTTTTGATACACTTCGTGAAGTTTTGACCAACAAA
 CCTGCCAAAAGGTCATGCTGCTAAAGCTAATACGACTCCTAAGCGCTTCGTTTCGTGAATTCAAAAGGACTC
 GAAGGCGCTGAAGTAGGAGCAGAAAATCACTGTTGATACATTTGCAGCCGGAGATGTTGTTGATGTTACC
 GGAACTTCTAAAGGTAAAGGTTTCCAAGGCCAATCAAACGTCATGGTCAATCACGTGGTCCATATGGC
 CCACGGTTCACGTTACCACCGTCGTCTGGTTCATGGGTCCGTGTCAGCTAACAAAGTTCCAAAAGG
 TAAAAAATCTGCTGGACGTATGGGTAACAAACGCTTACTGTACAAAACCTTGTTATTGCACAAGTGCT
 TCCTGAAAAGAACGTTATCCTTGTAAGGTAATGTCCAGGTGCTAAGAAATCATTGATTGTTGTTAA
 ATCAGCAATCAAAGCTAAATAAGAAGGAAAGGAGATAGAAATCTATAATG (SEQ ID NO: 40)

AAATCCTCCTATATAAATAGTTTATAAAAACCTTTAATCAAATTATATCAAAAAGTTTAAA
 GATGACAAAAGTGTGGGTTCTTGTCTTTTTTCAGTAAATTCATTGATTTTATTTAAAATTTT
 AAAAGATATACAAAAGAACAGGAAAGAATGAAAAAAGTCTAAAAAGTCCTTGACAAGG
 CACATCTCCTTTGATAGAATAGACAAGTGCTGTTAAAAACAGTATGTAGCGATGAAACGA
 GAGGTTGCGACACACCCGAAGGTATTGCCATACCTAACGTGTCGGTTTTCCCGTGGAGCT
 AGCCTATTGAATACAATAGACGAGAGGAGAAAAAATGGCAACTAAAAAATTCGCATTTCG
 CTTGAAAGCATAACGAACATCGTATCCTTGACGCAGCTGCAGAAAAAATCGTAGAAACTGC
 TAAACGTACAAACGCAGAAGTAAGTGGTCCAATTCCTCACTTCCAAGTACCGTAGCGTCTA
 CACTGTTATCCGCGGACTCACAAATATAAAGACTCACGCGAACAATTCGAAATGCGTAC
 ACACAAACGCTTGATCGACATCATCGAACCAACACAAAAAATGTTGATTCACTTATGAA
 ACTCGATTTGCCAAGTGGTGTAAACATCGAAATTAAGTCTAATTAAGAAAGGTAATTCTCATGTCAA
 AGGAATCTTAGGGAAAAAAGTGGGAATGACTCAAATCTTACAGACAACGGTGAATTAATTCTGTTAC
 TGTGATCGAAGCGACTCCAAACACAGTTCTTCAAGTTAAATCTGTCGAAACAGACGGTTACGAAGCAAC
 TCAAGTTGGTTTCGATACACTTCGTGAAGTTTTGACCAACAAACCTGCCAAAGGTCATGCTGCTAAAGC
 TAATACGACTCCTAAGCGCTTCGTTTCGTGAATTCAAAGGACTCGAAGGCGCTGAAGTAGGAGCAGAAAT
 CACTGTTGATACATTTGCAGCCGGAGATGTTGTTGATGTTACCGGAACCTTCTAAAGGTAAAGGTTTCCA
 AGGCCCAATCAAACGTCATGGTCAATCACGTGGTCCATATGGCCCACGGTTCACGTTACCACCGTCTGTC
 TGTTTCAATGGGTCCTGTTGCAGCTAACAAAGTTCCAAAAGGTAAAAAATCTGCTGGACGTATGGGTAA
 CAAACGCGTTACTGTACAAAACCTTGTTATTGCACAAGTGCTTCCTGAAAAGAACGTTATCCTTGTAAG
 AGGTAATGTCCAGGTGCTAAGAAATCATTGATTGTTGTTAAATCAGCAATCAAAGCTAAATAAGAAGG
 AAAGGAGATAGAAATCTATAATG (SEQ ID NO: 179)

FIGURA 11

GACTGATTTCTTGAGGTAAAATGGAGTCAAATACTGACCATTGATAAATCCAGAAATATATTTCTATAAT
AATCACTGTTAAGAAATTTAAAAGGGAAAATTTAAAAATG (SEQ ID NO: 41)

AGTATGATTGATTTTGATTTAACTAAAAAGAAAAGTTTATAATAAAAAGGAAAGAAATAAAAATG
(SEQ ID NO: 42)

AACACATAAAAAGTGAGGCATCAGCCTCACTTTTATGAATATTTTCTTTTTATTTGTAAAAGTTTAAAAG
AACGGTTACAATTATAAAAAGAAAAATTTAATTATTGAGCGAGAGCTAATCATAAGGAGAACAAATTTG
(SEQ ID NO: 43)

GCCATAATTATAACAAATTTGAAAAGCGTTAAGAAAGTTTAAACTCTTTTTTTAATAATTTTAGTAAAAG
TTGCTAAAAAAAACAATTTTCTTTGACCTTTTTTTGACCAATGAGTTATAATATAGAAAAATAACAAT
TGAACTTAATTTATTCCTAAATTGAGTCCATATCTTATTTATAAAGGAGATTCATTCTATG
(SEQ ID NO: 44)

ATAAAAATAACAATCCTATCTTTACTGATAGGATTTTTTTTCTTAAAAAATCCGTCAGTAATTTAAAAAC
TTGTAAATTTTATCTCACCAATTCAAAAGATAACTTTAGAATTGTAAAATGCAGGACAAACGAGGAAAT
GGCTTGTAATTCCAATCGAAAAATAGTAAAATAATAGGAGTCTGTTAATAGACAAATAAATATATTGAA
GTATCGGCGAGTTTAATTTTACGTTCCCTTACATGAAAATTAGGCGACAGCAAGGTACAAAAAAGGAG
AAAAAATG (SEQ ID NO: 45)

GAGTGCTCTTTTTTGGATATAATACTCGGGTATGTGAATTTTACATATAAGGCGTGGAAGCTGTAAAA
TACAGCATCATACCACATCACGAAAACAAAATATAAGGAGAATTTATCGTG (SEQ ID NO: 46)

TTGTAAAGAAAAATGTTGACAGAGTGCGGAACCTCTGCTATACTAATTAAGTTCGGTCTTTTTATGAAA
AAGACCTCATTAATTTGAAAGTGGGATTTGAACAAGCCCAAACCTACAAATAAGGAGAAATTACACTATG
(SEQ ID NO: 47)

AAAAGAAGTAGTATAATAATATAGTTGTCTTTGTGAAATCTCATAAAGTGCAACCGCACGAAGTTTCGT
AATAAGTGGCGTAAGCCACGAACAAAGGCGAGTCTAACAGTCGCTTGACTTAAAAGCGATGAAATCTA
ACAAGGAGGAATCACAATG (SEQ ID NO: 48)

CTGTCAGAGGTTTTTTATTTTAAATATGAAAAATGAAAGATAAAAATTTACTGACAGAAAAGTCAACAAG
CTTAAAAATAAAAAGAAACACCCGAAAGCATTGCCATAGGTAATCTGATAAATCTGAAAAATAAAA
ATGGACTCAGGCTAGAAAAATAAAGGCTTTTTATGAAAGAAAGACTTGCATTTGTTGTTGAAAAATGCTA
AAATACATAAGTCCGACTTTTTAGATATATTTAAATTTGTATTTATATCTTTTCGGGAAATTTTTAAGGA
GGTACTTTTGCTTG (SEQ ID NO: 49)

FIGURA 1J

GAGCCTTCTCGGCGTCTTGTAAATTTGATAAACTTATTATCAAATTTAATGAGATGTCGAAAGTGCA
TCTATAAATTCGCCAACTCCGCCTTAGTAGCGGCAGTGGTACAAATATTTAAAGGAGAACTCGCAAA
ATG (SEQ ID NO: 50)

ATGACGAAATTGATAACATCGTTTAAAGAAAGCTCCGTAAGTAAATTTAGTCTTACCAACAGTTACTGAT
AAGTGGGCAAGAGCGCTGCTTTGGACGAACATTCCAATCAAAGGGTTAATCAAATTTATCAACCAAAGAT
TTAACTAAAGCAGTAAAAGCTGCCCGATGATAACCCCAACGGCCAAGTCTAAGACATTGCCACGCAAA
ATAAAGTTTTTAAATTCCTTTAACATAAAATCCTCCTATATAAATAGTTTATAAAAACCTTTAATCAAAT
ATATCAAAAAGTTTTAAAGATGACAAAGTGTGGGTTCTTGTCTTTTTTCAGTAAATTCATTGATTTTATTT
AAAAATTTTAAAGATATATAAAAAGAAGTGGAAAGAATAAAAAAAGTCTAAAAAGTCTTTGACAAGGCA
CATCTCCTTTGATAGAATAGACAAGTGTGTTAAAAACAGTATGTAGCGACGAAACGAGAGGTTGCGAC
ACACCCGAAGGTATTGCCATACCTAACGTGTGGTTTTTCCCGTGGAGCTAGCCTATTGAATACAATAGA
CGAGAGGAGAAAAAATG (SEQ ID NO: 51)

AAATCTAAATGTTTTCTCTTACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAGCACACA
ACT ATTAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGTAAAGTATAATG (SEQ ID NO: 52)

AAATCTAAATGTTTTCTCTTACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAG
CACTCAACTATTAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGGAAAGTATAATG (SEQ ID NO: 180)

ATGGTTTTGTGCGAAAAATTTTTTGACAGAGTCATATTTTACTGTTATTATTAACAGAATAGTCCCCTG
ATAGTAAAAATATGAGGGTGCCCATCGGGCGTAAGAAAGGAAATAAACATG (SEQ ID NO: 53)

TATTTGGTGATTTTTCAAATTAGAATTCATATTTTATTTAAAAGTCTTTTTCTAAAGACTTTTTGTTTACT
TTACTAGAGAAAACGGTTGAATTCAGGCAAAAAATAACGTATAATTAACATGTATCTAAGAAATTTTTA
ATGAGATATTTCTGTCAGTATTAGAAAATGTAAAGTTCTCTAAAGATGAGAAAGTTAAGTAACTGACAG
AAGTGAATTTATTAGTTTTTAGTTTGATCTGGCTTTTTTACAGATAAATTTAAAGGAGGTGTCTTATG
(SEQ ID NO: 54)

TGGATATTTTTTATAAATCTGGTTTGAACAAATTATATTGACATCTCTTTTTCTATCCTGATAATTCTG
AGAGGTTATTTTTGGGAAATACTATTGAACCATATCGAGGTGGTGTGGTATAATGAAGGGAATTA
GATAGGAAATTTTCATG (SEQ ID NO: 153)

TCCGGACATTCATTGAGTGCATGATGCACAGTAACCATAGAAAGGAAGACACAATG
(SEQ ID NO: 154)

FIGURA 2

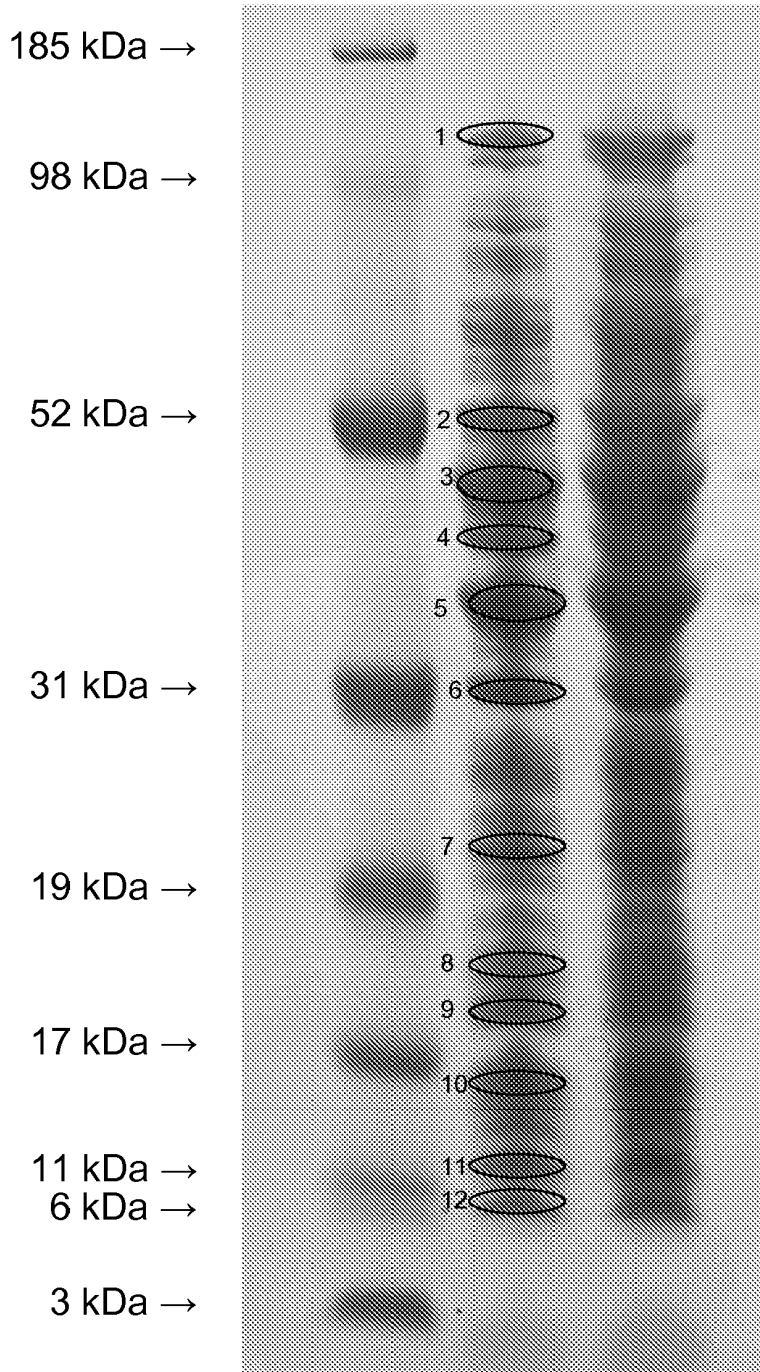
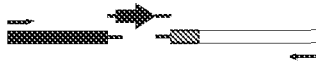


FIGURA 3

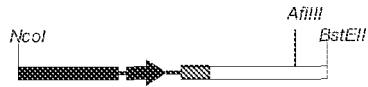
A) Aislamiento del promotor



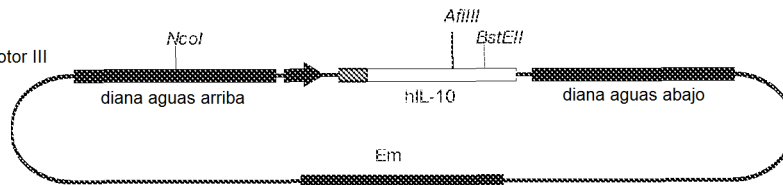
B) Clonación del promotor I



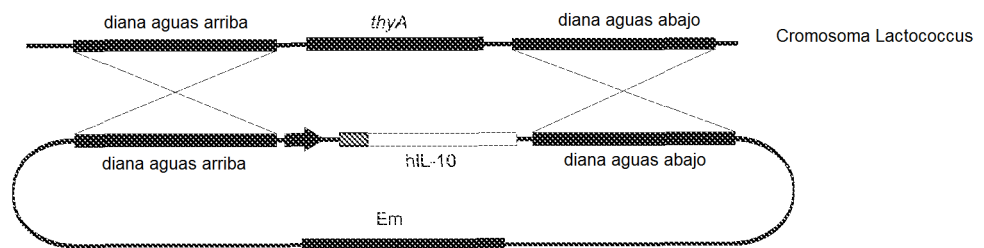
C) Clonación del promotor II



D) Clonación del promotor III



E) Integración cromosómica I



F) Integración cromosómica II

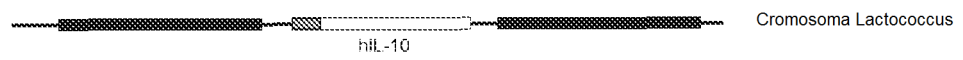


FIGURA 4

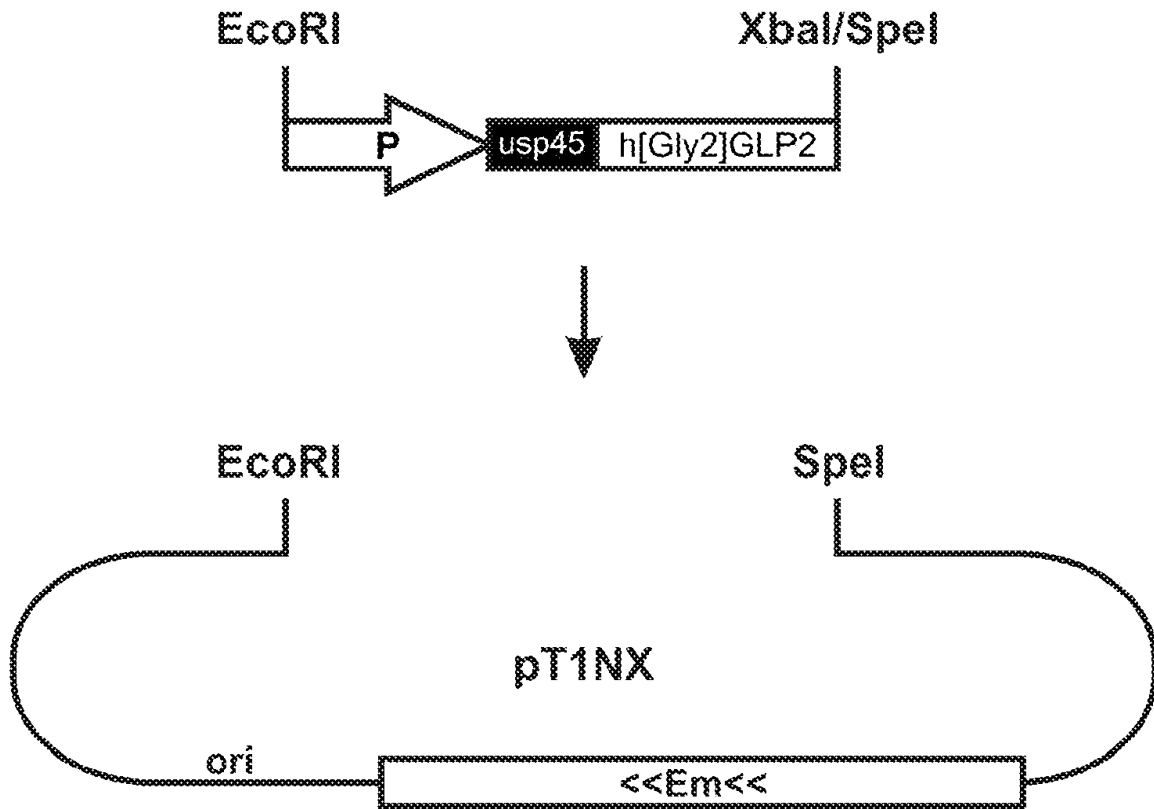


FIGURA 5

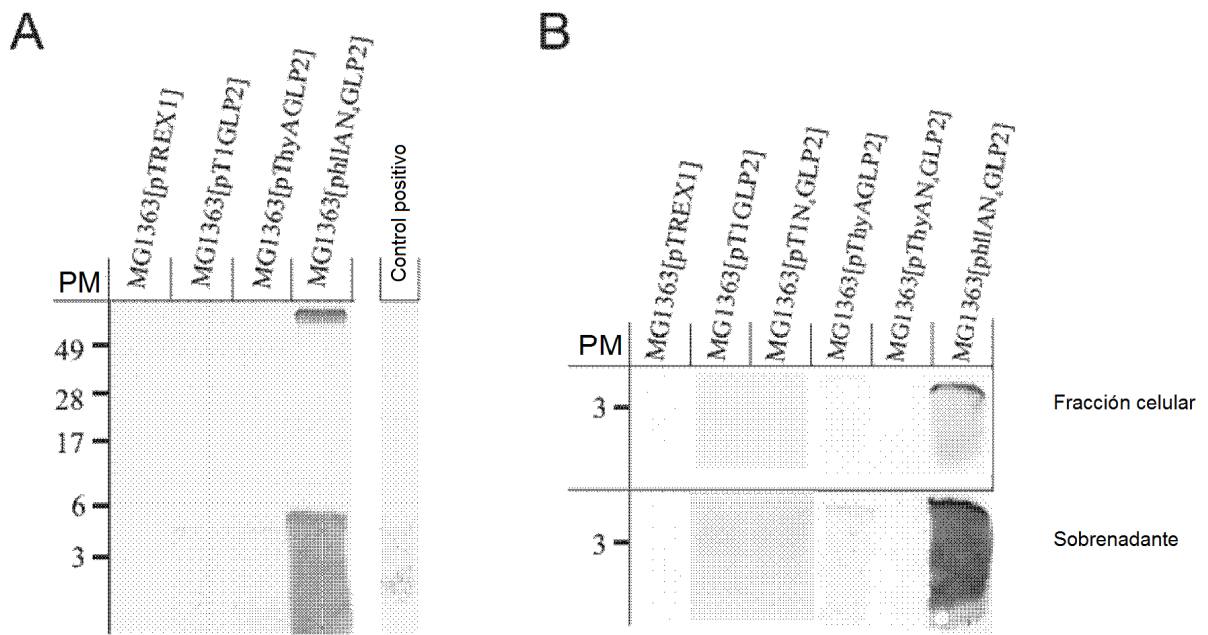


FIGURA 6

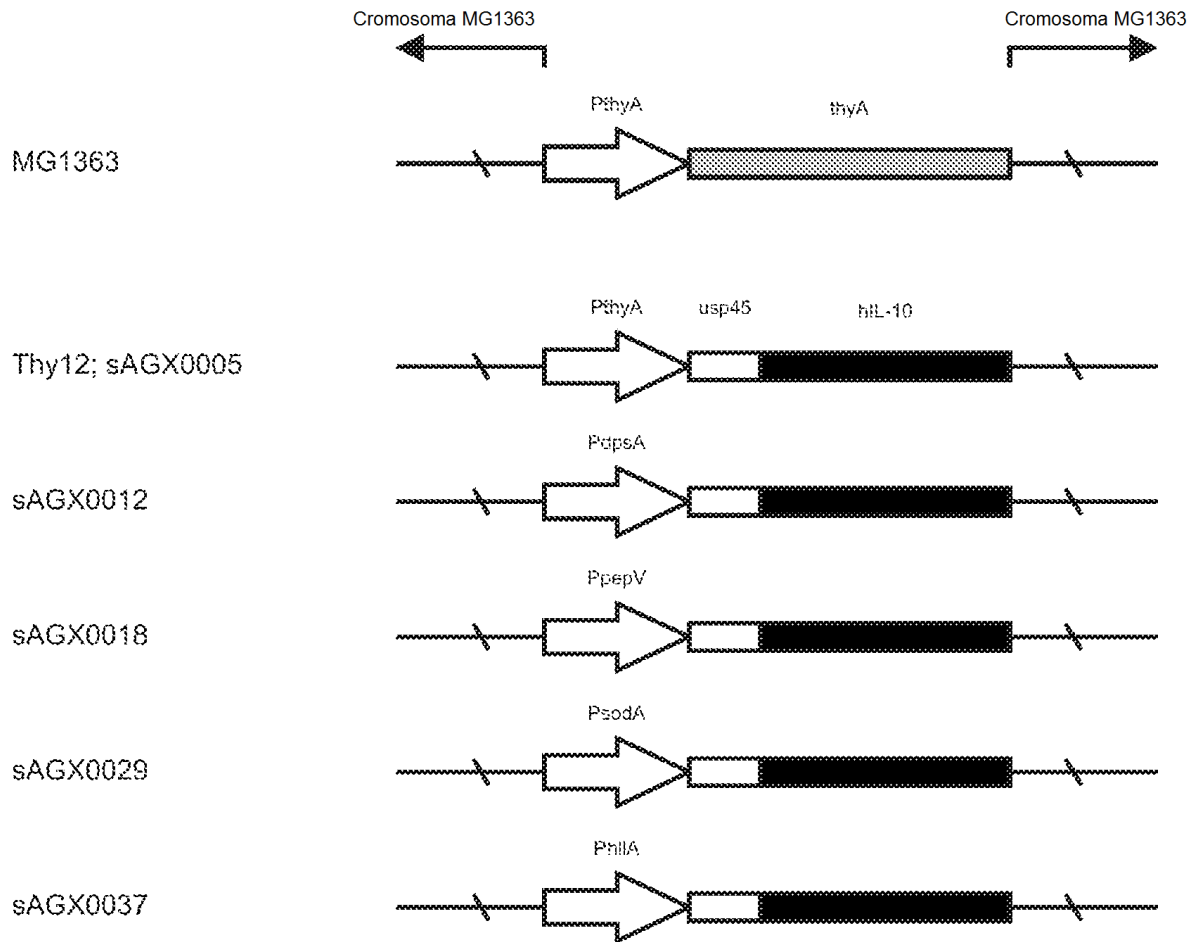


FIGURA 7

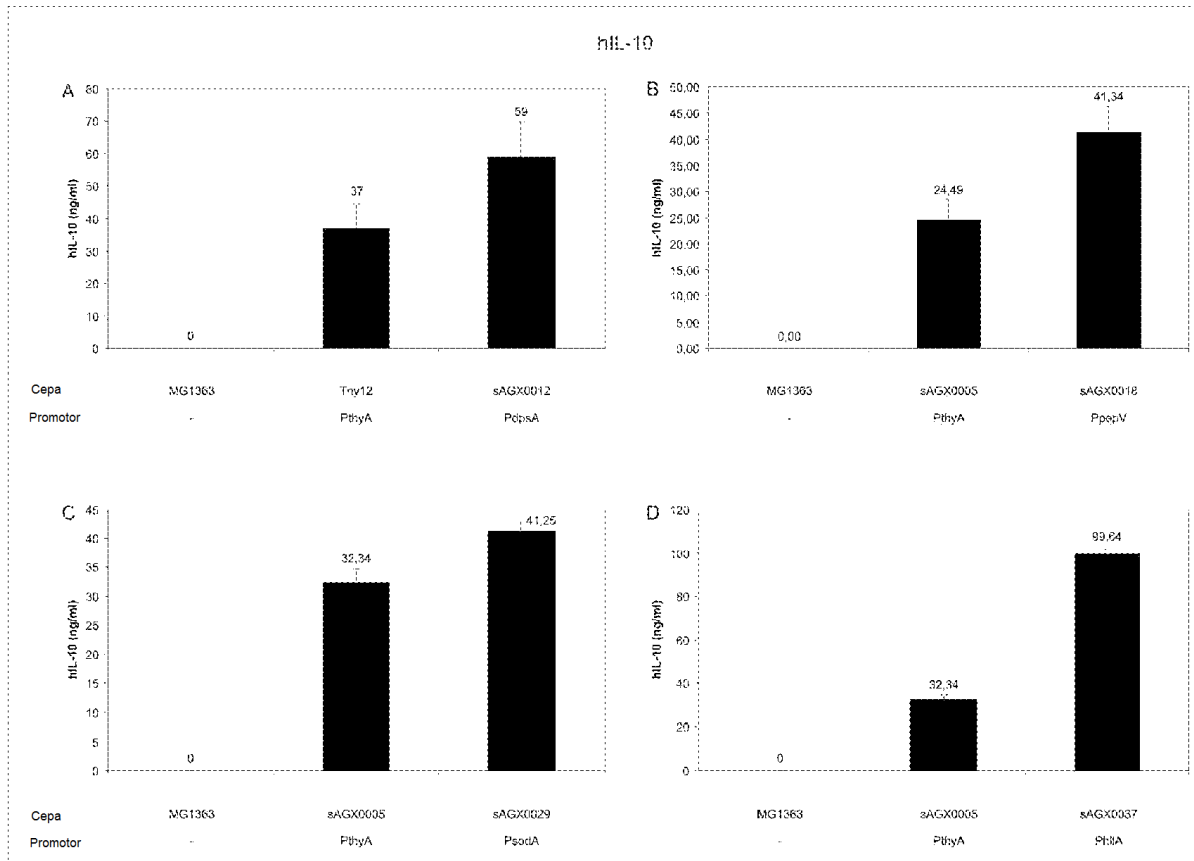


FIGURA 8

Secreción de hIL10 por 10^9 células de MG1363, sAGX0005 y sAGX0037

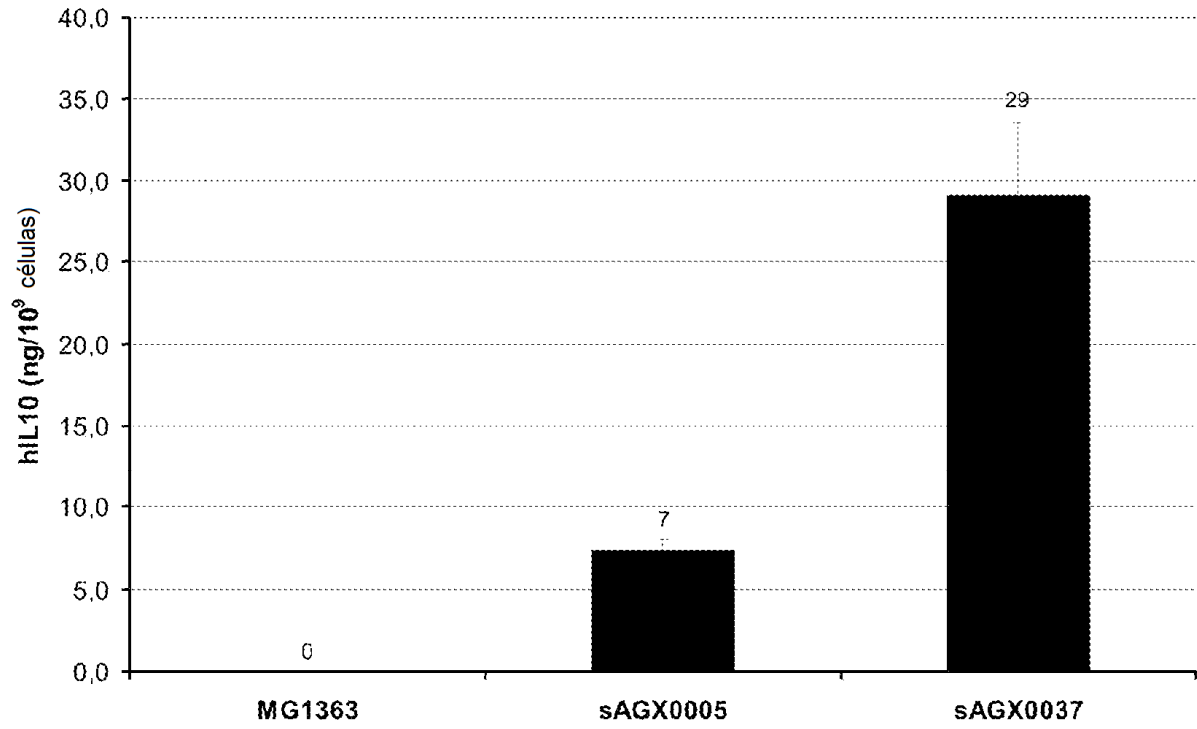


FIGURA 9

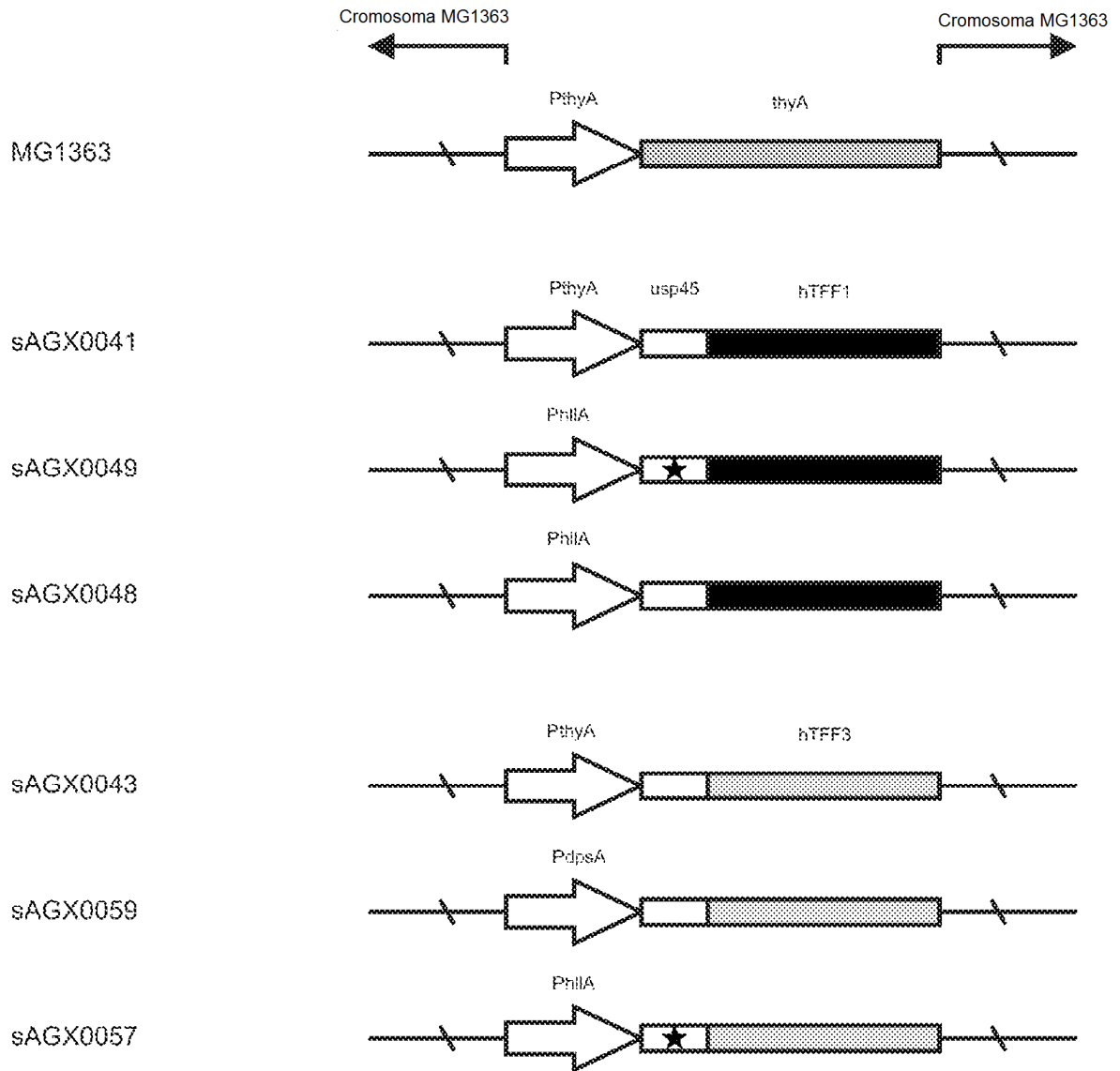


FIGURA 10

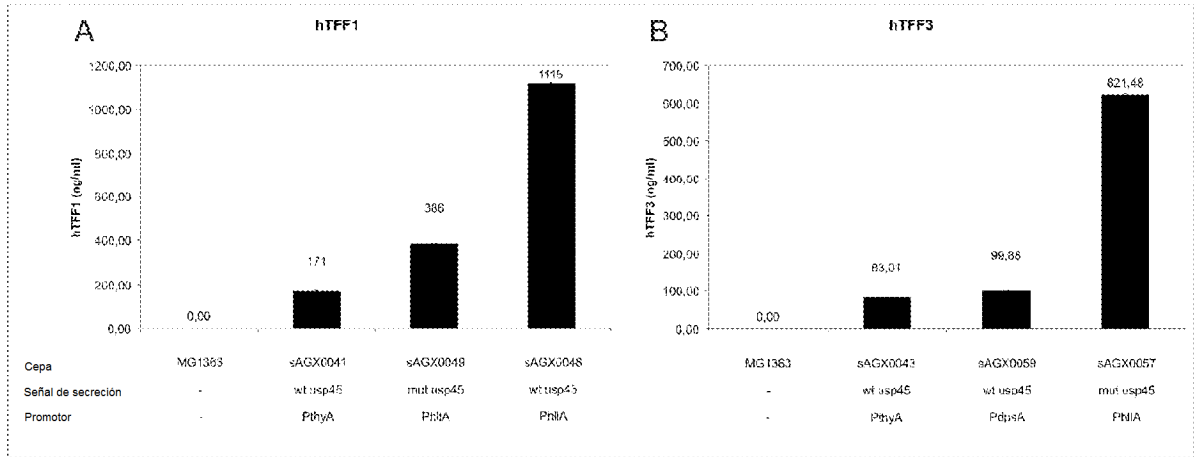


FIGURA 11

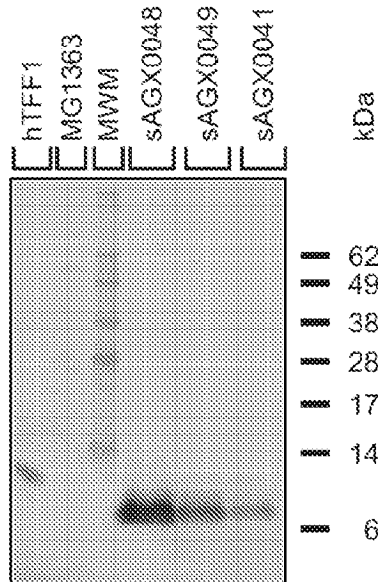


FIGURA 12:

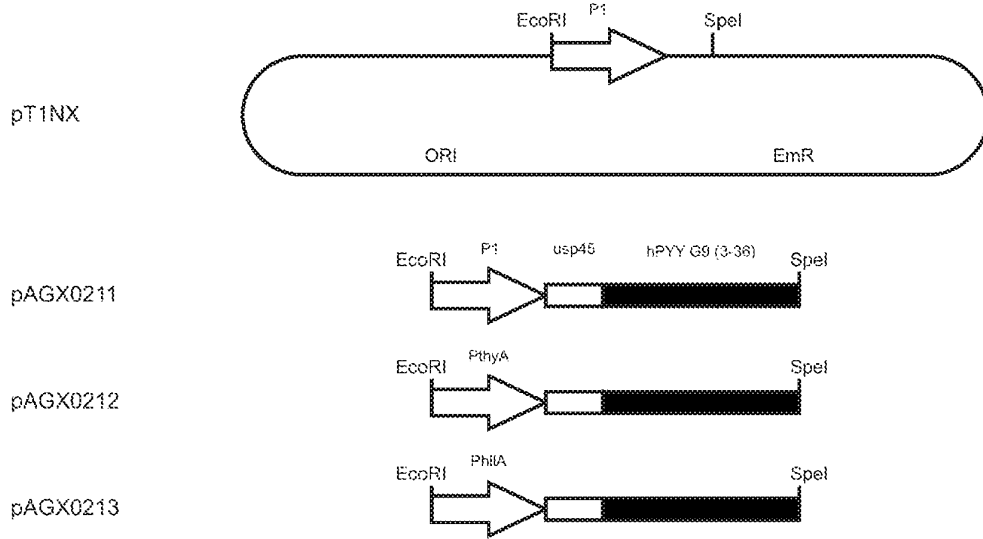


FIGURA 13:

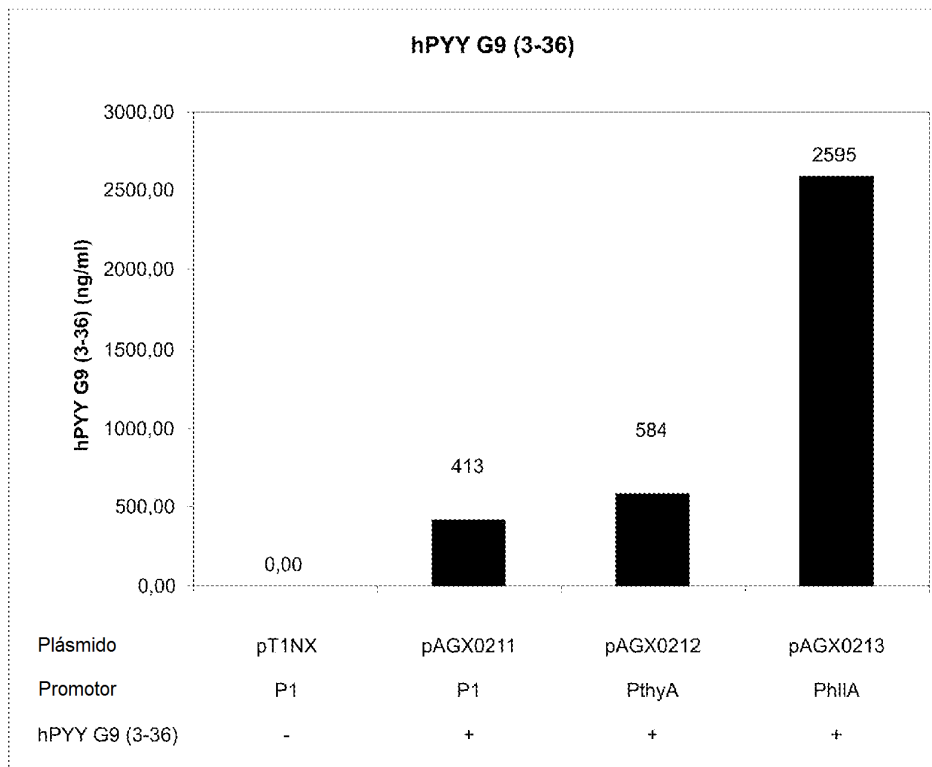


FIGURA 14

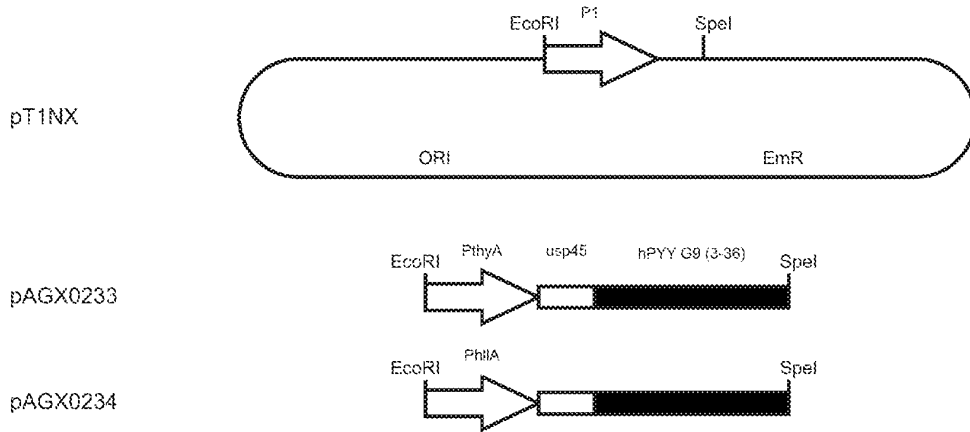


FIGURA 15

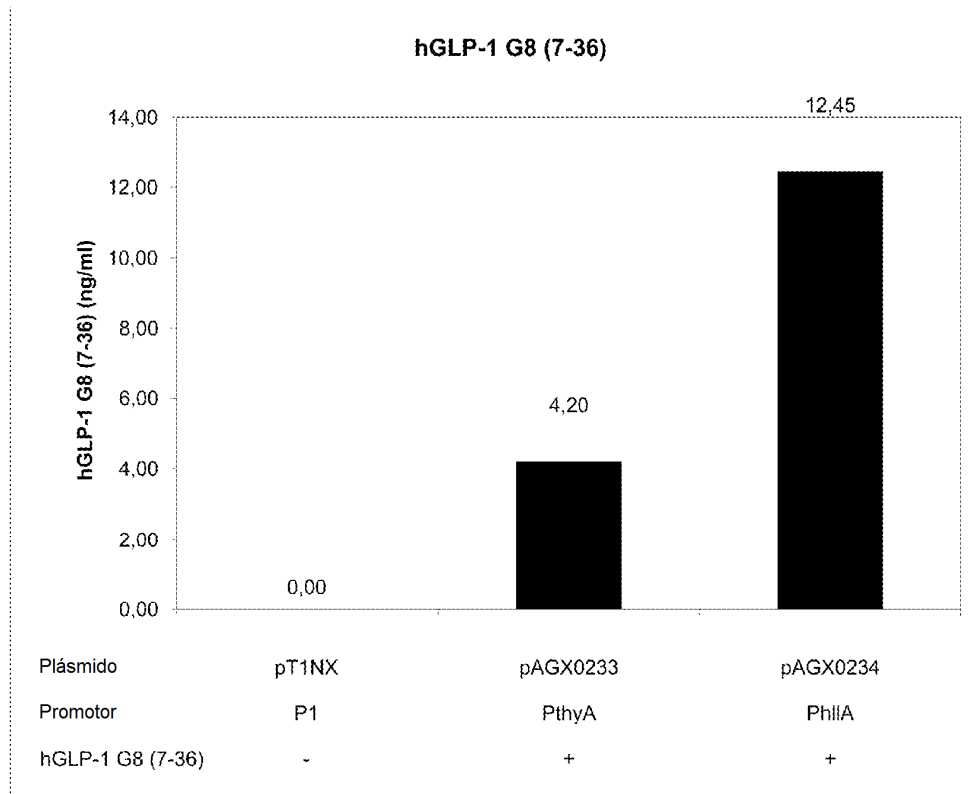


FIGURA 16

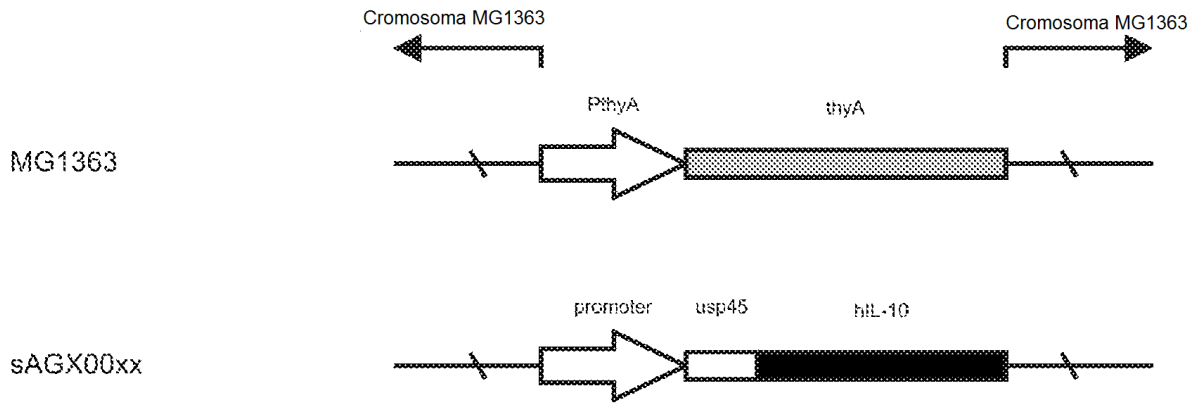


FIGURA 17

