

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 345**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/IL2011/000352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11138776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11777356 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2566490**

54 Título: **Anticonceptivos femeninos biológicos**

30 Prioridad:

19.10.2010 IL 20882010
06.05.2010 US 331892 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2018

73 Titular/es:

HERVANA LTD. (100.0%)
Naftali 9/8
Jerusalem 93507, IL

72 Inventor/es:

TEITELBAUM, RACHEL

74 Agente/Representante:

GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 671 345 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

Anticonceptivos femeninos biológicos

5 **Campo de la invención**

Esta invención proporciona una bacteria comensal genéticamente modificada del tracto genital femenino, en la que dicha bacteria genéticamente modificada es un *Lactobacillus* modificado para expresar un agente anti-espermatozoides, en el que dicho agente anti-espermatozoides es un anticuerpo anti-espermatozoides, o un fragmento del mismo, eficaz para evitar la motilidad de los espermatozoides, la fusión espermatozoide-óvulo o la penetración del espermatozoide en el óvulo, o una combinación de los mismos, y composiciones y dispositivo insertable por vía intravaginal que comprende las mismas. La presente invención proporciona el uso de composiciones que comprenden dicha bacteria comensal genéticamente modificada en la anticoncepción femenina y en la reducción de la incidencia del embarazo en una población femenina, o en la reducción de la incidencia de fertilización en una población femenina.

Antecedentes de la invención

El desarrollo de nuevos anticonceptivos es necesario para proporcionar métodos anticonceptivos accesibles para todas las personas, a pesar de las limitaciones sociológicas, económicas o educativas.

Aunque actualmente existen diferentes anticonceptivos, ninguno está libre de problemas. Hasta el momento, el anticonceptivo utilizado más frecuentemente es una formulación de estrógeno, progesterona, o una formulación e combinación de los mismos, que aunque es eficaz, no obstante, se ha sugerido que es preneoplásica con el uso prolongado, y en algunas poblaciones.

Los métodos de barrera, como el diafragma, o el dispositivo intrauterino, muestran una eficacia reducida, e incumplimiento con lo anterior, y mayor riesgo de enfermedad inflamatoria pélvica con el uso de este último. Los espermicidas también se han utilizado en este contexto, con menos eficacia, y además, su uso se asocia a un mayor riesgo de enfermedades de transmisión sexual.

Por lo tanto, se necesitan anticonceptivos mínimamente invasivos, fáciles de utilizar, que no estén asociados con las limitaciones anteriores.

35 **Sumario de la invención**

La invención proporciona, en una realización, una célula genéticamente modificada que produce un fragmento de anticuerpo contra un antígeno de los espermatozoides, y de esta manera puede servir como un anticonceptivo.

En una realización, la invención proporciona una bacteria comensal genéticamente modificada del tracto genital femenino, en la que dicha bacteria genéticamente modificada es un *Lactobacillus* diseñado para expresar un agente anti-espermatozoides, en el que dicho agente anti-espermatozoides es un anticuerpo anti-espermatozoides, o un fragmento del mismo, eficaz para evitar la motilidad de los espermatozoides, la fusión espermatozoide-óvulo o la penetración del espermatozoide en el óvulo, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo es una molécula Fv de cadena sencilla (scFv).

En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo específico de un antígeno de los espermatozoides es derivado de humano o humanizado. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo interactúa específicamente con un acrosoma o antígeno localizado en la membrana plasmática del espermatozoide o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo interactúa específicamente con un antígeno localizado en la región del cuello del espermatozoide o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo se secreta de la bacteria modificada, y en algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo está asociado con o unido a la pared celular bacteriana.

La bacteria modificada divulgada en la presente memoria es *Lactococcus*. La bacteria modificada divulgada en la presente memoria es la cepa de *Escherichia coli* Nissle 1917. La bacteria modificada divulgada en la presente memoria es *S. gordonii*. En algunas realizaciones, la bacteria modificada es *L. jensenii* o *L. crispatus*.

En algunas realizaciones, el scFv interactúa específicamente con un péptido que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 2. En algunas realizaciones, el scFv tiene una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el scFv está codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende la bacteria modificada como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición está en la forma de un supositorio, crema o espuma vaginal. En algunas realizaciones, el anticonceptivo se asocia con o se incorpora en un anillo

vaginal.

5 En la presente memoria se divulga un método anticonceptivo, comprendiendo dicho las etapas de poner en contacto células del tracto genital de un sujeto del sexo femenino con bacterias modificadas como se describe en la presente memoria en una cantidad suficiente para inhibir o prevenir la motilidad del espermatozoide, la fusión del espermatozoide-óvulo o la penetración del óvulo en el sujeto del sexo femenino. En la presente memoria se divulga un método que comprende administrar una composición que comprende la bacteria modificada al tracto genital de un sujeto del sexo femenino que necesita de la misma en una cantidad suficiente para inhibir o prevenir.

10 En la presente memoria se divulga un método para reducir la incidencia de embarazo en una población femenina, comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto células del tracto genital de un sujeto del sexo femenino con bacterias modificadas como se describe en la presente memoria en una cantidad suficiente para afectar, inhibir o prevenir la motilidad de los espermatozoides, la fusión del espermatozoide-óvulo o la penetración del óvulo en el sujeto del sexo femenino, reduciendo de esta manera la incidencia de embarazo en una mujer y reduciendo de esta manera la incidencia de embarazo en una población femenina.

20 En la presente memoria se divulga un método para reducir la incidencia de la fertilización en una población femenina, comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto células del tracto genital de un sujeto del sexo femenino con bacterias modificadas como se describe en la presente memoria en una cantidad suficiente para afectar, inhibir o prevenir la motilidad de los espermatozoides, la fusión del espermatozoide-óvulo o la penetración del óvulo en el sujeto del sexo femenino, reduciendo de esta manera la incidencia de ocurrencia de fertilización en una mujer y reduciendo de esta manera la incidencia de la fertilización en una población femenina.

25 En algunas realizaciones, la invención se proporciona el uso de una bacteria modificada o una composición como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para uso en la reducción de la incidencia de la fertilización en una población femenina.

Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 representa gráficamente las afinidades relativas de los scFv expresados en fagos aislados y clonados contra péptidos de los espermatozoides determinados por el ensayo ELISA. Las columnas 1-3 representan la unión de tres scFvs al péptido derivado de FA-1 de los espermatozoides y las columnas 4-6 representan la unión de tres scFvs al péptido derivado de YLP(12) de los espermatozoides. BSA sirve como un control de unión negativo.

35 La Figura 2 representa las afinidades relativas de algunos scFv expresados en fagos aislados y clonados para los péptidos de los espermatozoides probados. Los clones se consideraron que tienen alta afinidad cuando el valor OD fue mayor en relación al péptido frente a los controles de BSA, o en muestras incubadas sin péptidos. Los Clones 102, 103, 105 y 106 en particular, muestran una afinidad relativamente alta para el péptido y el Clon 102 se caracterizó además *in vitro* e *in vivo*.

40 La Figura 3 representa gráficamente los resultados de los ensayos de unión ELISA que identifican una serie de scFv no unidos, que posteriormente se utilizaron como controles, en comparación con el Clon 102, que como se muestra en la Figura 2 demostró tener una buena afinidad por los péptidos probados. Uno de estos clones scFv, J112, se utilizó normalmente en este contexto. Los controles A y B, que eran muestras que no contenían fago scFv, ni ningún péptido, o ningún scFv, respectivamente, se evaluaron, también. La unión se detectó midiendo la OD en muestras probadas con anticuerpo anti-fago marcado con HRP (anticuerpo de PVIII).

50 La Figura 4A es un mapa del plásmido del vector pSLP111.1. La Figura 4B es una fotografía que representa los productos de digestión NcoI y NotI del plásmido. Los plásmidos se cortaron con NcoI y NotI, a 37 °C durante tres horas. El inserto del plásmido se muestra claramente en varios clones representativos.

La Figura 5A representa el ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos de J102, respectivamente (SEQ ID NO: 7-8). La Figura 5B representa los dominios respectivos dentro del scFv J102.

55 La Figura 6 representa la unión específica de los lactobacilos que expresan J102 a los espermatozoides murinos, *in vitro*. La Figura 6A es una micrografía en microscopio óptico que muestra la unión significativa del scFv que expresa los lactobacilos a los espermatozoides de ratón, donde casi cada espermatozoide evaluado muestra una tinción significativa. La Figura 6B es una micrografía en microscopio óptico de un lactobacilo que expresa J112, que sirve como un control, donde no es evidente la unión apreciable a los espermatozoides murinos.

60 La Figura 7 representa gráficamente la demostración *in vivo* de la eficacia de los lactobacilos que expresan J102. La Figura 7A representa las tasas de preñez de ratones hembra en dos experimentos en los que se administra *L. jensenii* que expresa scFv J102 anti-espermatozoides o lactobacilos control que expresan un scFv que no se une a los espermatozoides (J112), y en cada experimento, se demostró la anticoncepción eficaz en ratones tratados con J102 frente a J112. La Figura 7B representa el número de la progenie total y el número de la progenie por jaula en cada uno de los dos experimentos realizado como se describe en la Figura 7A, y tanto el número de la progenie total

como la progenie por jaula se redujeron en *L. jensenii* que expresa J102 en comparación con los controles.

Descripción detallada de la invención

- 5 En la presente memoria se divulgan células recombinantes, que incluyen, microorganismos y métodos para utilizar los mismos, para la producción de compuestos espermicidas. Los métodos y células, descritos en la presente memoria, proporcionan un medio efectivo de anticoncepción.
- 10 En la presente memoria se divulga una célula recombinante que es una célula no de mamífero, que persiste en la mucosa del tracto genital femenino durante un periodo de tiempo suficiente para expresar un compuesto, que interfiere con la motilidad de los espermatozoides, la fusión espermatozoide-óvulo o la penetración de los espermatozoides en el óvulo. En la presente memoria se divulga un compuesto, que cuando se expresa en el tracto genital femenino del sujeto tratado por el organismo comensal colonizante se obtienen los mismos resultados en fertilidad reducida en el sujeto. En la presente memoria se divulga un compuesto que cuando se expresa en el tracto genital femenino de los sujetos tratados da como resultado una tasa de embarazo reducida en una población a la que se administra tal organismo comensal.
- 15 En la presente memoria se divulga un organismo comensal modificado que expresa un compuesto espermicida, organismo que es capaz de colonizar el tracto reproductor femenino o regiones del mismo.
- 20 En la presente memoria se divulga una célula que está modificada para expresar un fragmento de ácido nucleico que es capaz de ser expresado como una proteína específica, incluyendo las secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y las posteriores (secuencias no codificantes 3') a la secuencia de codificación.
- 25 Las bacterias modificadas genéticamente pueden ser modificadas para ser deficientes en genes específicos mediante cualquier medio como sabrá el experto en la materia, o los organismos modificados pueden modificarse para sobreexpresar ciertos genes, por métodos conocidos en la técnica.
- 30 En una realización, se introduce una construcción en las bacterias de esta invención, de manera que es posible seleccionar acontecimientos de recombinación homóloga en la bacteria para procedimientos de desactivación de los genes. Alguien con experiencia ordinaria en la materia puede fácilmente diseñar una construcción de desactivación que incluye tanto genes de selección positivos como negativos para seleccionar eficientemente células transfectadas que se someten a un acontecimiento de recombinación homóloga con la construcción.
- 35 En otra realización, los cambios en la expresión, actividad y función génica, incluyendo, entre otros, una expresión génica mejorada, disminuida y abolida pueden realizarse utilizando una construcción genética que se integra en el genoma de la célula. En otra realización, los cambios en la expresión, actividad y función génica pueden realizarse utilizando una construcción genética que es extra-cromosómica y en una realización, sigue siendo extra-cromosómica.
- 40 En una realización, el término construcción o vector se refiere a un vehículo de ácido nucleico que contiene una secuencia de interés que se ha subclonado dentro del vector.
- 45 Para generar los vectores, los polinucleótidos que codifican las secuencias de interés se pueden ligar en sistemas del vector de expresión adecuados para transducir/transformar células procariotas y para dirigir la expresión de productos recombinantes dentro de las células transducidas/transformadas. Se apreciará que tales sistemas de vectores adecuados se pueden modificar fácilmente mediante técnicas recombinantes frecuentemente utilizadas con el fin de reemplazar, duplicar o mutar secuencias del promotor o potenciador existentes y/o introducir cualquier secuencia de polinucleótidos adicionales tales como por ejemplo, secuencias que codifican marcadores de selección adicionales o secuencias que codifican genes indicadores.
- 50 De acuerdo a otra realización, los vectores comprenden además un elemento regulador, tal como un promotor para regular la expresión del ácido nucleico aislado. Tales promotores son conocidos por ser elementos de secuencia que actúan en cis requeridos para la transcripción ya que sirven para unir la ARN polimerasa dependiente de ADN, que transcribe las secuencias presentes en dirección 3'. El vector puede, en otra realización, comprender un promotor inducible, o. uno que expresa las secuencias de interés constitutivamente.
- 55 Un vector puede incluir además un origen de replicación, y puede propagarse en más de una especie de célula procariota, y en algunas realizaciones, el vector puede ser construido para facilitar su integración dentro del genoma de un organismo de elección. El vector, en otras realizaciones puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácido, un fagémido o un fago, o cualquier vector apropiado, como se apreciará por el técnico experimentado.
- 60 Un ejemplo de dicho vector se describe y utiliza en la sección de Ejemplos, más adelante. El técnico experimentado entenderá, sin embargo, que la invención no se limita al uso de cualquiera de tales vectores, y que es de rutina en la técnica crear nuevos vectores, y/o modificar vectores existentes, con el objetivo de optimizar la expresión heteróloga de la secuencia insertada o incorporada, para la cual el vector sirve como el vehículo para
- 65

administración/modificación.

Algunos ejemplos de vectores adecuados para su uso incluyen: M. Posno et al., *Appl Environ Microbiol.* Junio 1991, 57(6): 1822-1828; M Shimizu-Kadota, et al., *Appl Environ Microbiol.* Noviembre 1991; 57(11): 3292-3300; T. Duong, et. al., *Microbial Biotechnology* Volumen 4, Número 3, páginas 357-367, Mayo 2011; V V Aleshin et al., *Mikrobiologiya* Volume: 69, Número: 1, Páginas: 75-80; X. Liu et al., *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006, vol. 50, no 10, pp 3250-3259; WO/2005/112567; Luca Vangelista et. al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Julio 2010, p. 2994- 3001, Vol. 54, N.º 7; patente US-7.179.458, patente US-7.754.467; Caren J. Chancey, et. al., *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 5627-5636; patente US-5.733.540 y otros.

La incorporación de secuencias de ácido nucleico deseadas dentro de las células se puede lograr a través de diversos métodos bien conocidos en la técnica. Las construcciones de ácido nucleico pueden ser utilizadas para transfectar o transducir establemente o transitoriamente las células.

Existen diversas técnicas conocidas en la técnica para introducir vectores en células de la presente invención, tales como, pero no limitadas a: técnicas de incorporación de ADN directas, y transducción mediada por plásmido, ADN lineal o liposomas, absorción mediada por receptor y magnetoporación que emplean métodos de introducción mediados por DEAE-dextrano mediados por calcio-fosfato, electroporación o transfección mediada por liposoma, (para detalles adicionales ver, por ejemplo, "Methods in Enzymology", vol. 1-317, Academic Press, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M. et al. (Eds.) Greene Publishing Associates, (1989) y en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), u otros manuales de laboratorio estándares). También se prevé el bombardeo con partículas recubiertas de ácido nucleico. Debe entenderse que cualquiera de estos métodos puede ser utilizado para la introducción de las secuencias deseadas en las células, para la producción de las células de esta invención, y para efectuar los métodos de esta invención.

La electroporación se ha utilizado con éxito para la transformación de varias células.

La conjugación bacteriana, basada en el contacto directo de las células donantes y receptoras, también se puede utilizar para la transferencia de genes en bacterias. Los procesos de conjugación bacteriana pueden implicar mezclar juntas las células "donantes" y "receptoras" en contacto estrecho unas con las otras. La conjugación ocurre por formación de conexiones citoplasmáticas entre las bacterias donantes y receptoras, con transferencia directa del ADN donante recién sintetizado en las células receptoras. El receptor en una conjugación acepta el ADN a través de la transferencia horizontal de una bacteria donante. El donante en la transferencia conjugativa puede tener un plásmido conjugativo, transposón conjugativo, o plásmido movilizable.

En algunos casos, solo se requiere un donante y un receptor para la conjugación. Esto ocurre cuando el plásmido a transferir es un plásmido auto-transmisible que es tanto conjugativo como movilizable (es decir, que portando tanto los genes *tra* como los genes que codifican las proteínas Mob). En general, el proceso implica las siguientes etapas: 1) el ADN del plásmido de hebra doble se fragmenta en un sitio específico en *oriT*; 2) un ADN de hebra sencilla es liberado al receptor a través de una estructura de poro o pilus; 3) una enzima ADN relaxasa escinde el ADN de hebra doble en *oriT* y se una a un extremo 5' liberado (formando una relaxosoma como la estructura intermedia); y 4) Posteriormente, un complejo de proteínas auxiliares se ensamblan en *oriT* para facilitar el proceso de transferencia de ADN.

Una conjugación "triparental" también puede ser requerida para la transferencia del plásmido donante al receptor. En este tipo de conjugación, participan células donantes, células receptoras, y un plásmido "cooperador". Las células donantes llevan un plásmido movilizable o transposón conjugativo. Los vectores movilizables contienen un *oriT*, un gen que codifica una nickasa, y tienen genes que codifican las proteínas Mob, sin embargo, las proteínas Mob solas no son suficientes para lograr la transferencia del genoma. Por lo tanto, los plásmidos movilizables no son capaces de promover su propia transferencia a menos que se proporcione un sistema de conjugación apropiado por un plásmido cooperador (ubicado dentro del donante o dentro de una célula "cooperadora"). El plásmido conjugativo es necesario para la formación del par de acoplamiento y la transferencia de ADN, ya que el plásmido codifica las proteínas para la transferencia (Tra) que están implicadas en la formación del poro o pilus.

El término "recombinante" o la expresión "alterado recombinantemente" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan anormalmente, son subexpresados o no expresados en absoluto.

El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce generalmente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados configurados para conseguir una nueva funcionalidad de ácido nucleico, por ejemplo, un

promotor de una fuente y una región de codificación de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

5 Un "casete de expresión" es un ácido nucleico, generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedadora. El casete de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Generalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico para ser transcrito operativamente ligado a un promotor.

10 En otra realización, los ácidos nucleicos utilizados en la presente memoria comprenden análogos de ya sea ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases naturales, azúcares y uniones de internucleósidos covalentes (estructura principal) así como oligonucleótidos que tienen porciones que no existen en la naturaleza, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular potenciada, afinidad potenciada por el ácido nucleico diana, estabilidad incrementada en presencia de nucleasas y/o silenciamiento de genes eficiente.

15 Los ácidos nucleicos utilizados en la presente memoria pueden ser producidos por cualquier proceso sintético o recombinante tal como es bien conocido en la técnica. Los ácidos nucleicos pueden además ser modificados para alterar las propiedades biofísicas o biológicas por medio de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser modificado para incrementar su estabilidad contra nucleasas (por ejemplo, "protección terminal"), o para modificar su lipofilia, solubilidad o afinidad de unión a secuencias complementarias.

20 El ADN también puede ser sintetizado químicamente por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ADN puede sintetizarse químicamente a partir de los cuatro nucleótidos total o parcialmente por métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen aquellos descritos en Caruthers (1985). El ADN también puede ser sintetizado preparando oligonucleótidos de hebra doble solapantes, rellenado los huecos y ligando los extremos entre sí (ver, generalmente, Sambrook et al. (1989) y Glover et al. (1995)). El ADN que expresa homólogos funcionales de la proteína se puede preparar a partir de ADN de tipo silvestre por mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, Zoller et al. (1982); Zoller (1983), y Zoller (1984); McPherson (1991)). El ADN obtenido puede ser amplificado por métodos conocidos en la técnica. Un método adecuado es el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrito en Saiki et al. (1988), Mullis et al., patente US-4.683.195, y Sambrook et al. (1989).

25 En otra realización, la transposición *in vitro* puede llevarse a cabo en ADN genómico clonado en un vector, por ejemplo, un cósmido, fago, plásmido o vector BAC (cromosoma artificial bacteriano). Puede realizarse mutagénesis de alta densidad similar en organismos no naturalmente competentes utilizando ADN genómico clonado en un vector de reemplazo alélico (ver, por ejemplo, la patente US-6.207.384, cuyos métodos se pueden utilizar para modificar el organismo como se describe en la presente memoria.

30 Las cepas hospedadoras bacterianas apropiadas se seleccionan, por ejemplo, en cuanto a su capacidad de transformación, capacidad para expresión de la proteína heteróloga, y/o superficie mucosal. El hospedador bacteriano se volverá competente para la transformación usando técnicas estándar, tales como el método de cloruro de rubidio o electroporación (ver, por ejemplo, Wei et al., J. Microbiol. Methods 21:97-109 (1995).

35 La transformación de un comensal, por ejemplo, *L. jensenii* por electroporación puede realizarse modificando métodos estándar como se describe en, por ejemplo, Luchansky et al. (J. Dairy Sci. 74: 3293-3302 (1991)). Brevemente, se cultiva *L. jensenii* recién inoculado en caldo MRS (por ejemplo, hasta 0,6-0,7 a una DO₆₀₀ a 37 °C y CO₂ al 5 %). Las células bacterianas se cosechan, lavan y se vuelven a suspender en una solución fría de sacarosa y MgCl₂. Las células competentes se mezclan a continuación con ADN y se electroporan. Después, se permite que las células se recuperen antes de sembrarlas en placa de agar selectivo que contiene un antibiótico de otro agente selectivo. A continuación, las células modificadas se administran al sujeto, por ejemplo, en una formulación de supositorio, crema o espuma.

40 Opcionalmente, el pretratamiento antibiótico puede ser utilizado para eliminar de la superficie mucosal las bacterias residentes antes de la introducción de las bacterias de la invención en la vagina (ver, por ejemplo, Freter et al., Infect. Immun., 39:686-703 (1983)). Los antibióticos se pueden administrar por vía oral o se pueden aplicar directamente a la vagina.

45 También se proporciona un método no limitativo para la selección de una cepa bacteriana para modificar de acuerdo con los métodos de esta invención, cepa que es eficiente para colonizar la superficie mucosal a la que las bacterias se aplican y cuyo método puede implicar seleccionar repetidamente las bacterias de rápida colonización en capas mucosas de animales o seres humanos. Por ejemplo, se aplica una cepa bacteriana de tipo silvestre a una superficie mucosa y se aísla repetidamente y se cultivan *in vitro* las bacterias, volviendo a cada etapa para la superficie mucosal. En algunas realizaciones, de acuerdo con este aspecto, en última instancia, se obtiene una bacteria con una capacidad colonizadora mejorada.

En otra realización, la divulgación proporciona un método no limitativo para el diseño de una cepa bacteriana de acuerdo con los métodos de esta invención, cepa que es eficiente para colonizar la superficie mucosal a la que se aplica la bacteria, que puede implicar la expresión de proteínas de fusión en la superficie de las bacterias recombinantes. La proteína de fusión consiste en un dominio unido al hospedador unido a un polipéptido de interés.

5 El dominio unido al hospedador permitirá que las bacterias se unan a ciertos determinantes (proteína o carbohidrato) en una superficie mucosal hospedadora seleccionada con alta afinidad, confiriendo de esta manera a las bacterias una ventaja de supervivencia sobre la microflora residente.

Otro método abarcado para modificar cepas bacterianas implica la inducción de la microflora residente para expresar una proteína heteróloga introduciendo el gen a través del bacteriófago. Se han desarrollado varios vectores de bacteriófago para su uso en diferentes bacterias. Por ejemplo, se puede utilizar un vector de bacteriófago basado en el adh de bacteriófago templado (ver, por ejemplo, Raya et al., J. Bacteriol 174:5584-5592 (1992) y Fremaux et al., Gene 125:61-66 (1993)). Este vector experimenta integración específica del sitio en el cromosoma hospedador en el fago definido (attP) y sitios de unión bacterianos (attB). De manera similar, puede usarse el bacteriófago específico de *Lactobacillus* para transducir vectores u otros polinucleótidos en el cromosoma de *Lactobacillus*. El fago específico de *Lactobacillus* incluye mv4 (Auvray et al., J. Bacteriol., 179:1837-1845 (1997)), adh (Fremaux et al., Gene 126:61-66 (1993)), gle (Kakikawa et al., Gene 175:157-165 (199.6) y aquellos que pertenecen a los grupos A o B de Bradley en aislados de lactobacilos vaginales (Kilic et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:31-39 (2001)).

También se pueden añadir a una dosis unitaria de las bacterias ciertos agentes que no irritan las células epiteliales de la mucosa para contribuir a la colonización. Muchas de las bacterias en las superficies de la mucosa secretan materiales capsulares que se fusionan para formar una biopelícula que recubre la superficie mucosal completa. Puede ser beneficioso añadir una enzima que digiere este material de biopelícula para promover la penetración de las bacterias modificadas en la biopelícula para un mayor éxito en la colonización. Las enzimas incluyen ADNasas, peptidasas, colagenasas, hialuronidasas y otras enzimas degradantes de carbohidratos. También se pueden añadir antibióticos a los cuales las propias bacterias modificadas no son susceptibles para disminuir el número de bacterias residentes en la superficie mucosal con el fin de facilitar la colonización efectiva de las bacterias modificadas.

La expresión de los polinucleótidos o polipéptidos heterólogos puede ser constitutiva (por ejemplo, utilizando promotores P59 (van der Vossen et al., Appl. Environ. Microbiol. 58:3142-3149 (1992)) o P23 (Elliot et al., Cell 36:211-219 (1984)). Como alternativa, la expresión puede estar bajo el control de un promotor inducible. Por ejemplo, se pueden usar los promotores amilasa de *Bacillus* (Weickert et al., J. Bacteriol. 171:3656-66 (1989)) o xilosa (Kim et al. Gene 181:71-76 (1996)) así como el promotor nisin de *Lactococcus* (Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:2763-2769 (1998)) para dirigir la expresión inducible. Además, pueden utilizarse promotores inducidos por ácido o base. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores que son activos en las condiciones relativamente ácidas de la vagina (por ejemplo, aquellos descritos en la patente US-6.242.194). Como alternativa, se pueden utilizar promotores que se inducen sobre cambios en la vagina en respuesta al semen. Por ejemplo, se utilizan promotores inducidos por bases para inducir la expresión en respuesta al aumento de alcalinidad de las condiciones en la vagina que resultan de la introducción de semen.

Se conoce una variedad de secuencias de señal y anclaje para dirigir la expresión de polipéptidos a la membrana, espacio extracelular o la pared celular (por ejemplo, por unión covalente a peptidoglicano). Los ejemplos de secuencias de señal incluyen la secuencia señal de la α -amilasa de *L. amylovorus* (Giraud y Cuny, Gene 198:149-157 (1997)) o la secuencia señal del gen de la capa S (cbsA) de *L. crispatus* (por ejemplo, MKKNLRIVSAAAAALLAVAPVAA (SEQ ID NO: 3) o MKKNLRIVSAAAAALLAVATVSA (SEQ ID NO: 4)). Las secuencias señal se localizan generalmente en el extremo amino terminal de un polipéptido.

Las secuencias de anclaje están generalmente localizadas en el extremo carboxilo de una secuencia de proteína codificada. Las secuencias de anclaje incluyen, por ejemplo, una secuencia asociada a la pared celular; la secuencia LPQ(S/A/T)(G/A), donde los restos en los paréntesis indican las diferentes opciones en tal posición; y una secuencia hidrófoba, y, opcionalmente, una secuencia cargada. En algunas realizaciones, la secuencia de anclaje comprende

```

VRTINVVDPI TGKISTSVQTA KFTREDKNSNAGYTD PVTGKTTMNPWTPAKQGLRA
VNVEQIKGYVAKVDGNVDAVVVTPDSANMVVTITYQANKPEGQNITNKKDTPDP
ADGIKNKDDLPDGTKYTWKEVPD VNSVGEKTGIVTVTFPDGTSVDVKVTYVYDPPV
ESNRDTLSKEANTGNTNVAKAATV TSSKVESKKTLPQTGSKTEQV GILGLAIATVGS
LLGLGVNRKKRQK (SEQ ID NO:5);

```

o

ES 2 671 345 T3

KKAEVVKNNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNLDLGGQTTDKSKLDEAIKSADDTKSTD
KYNNASDDTKSKFDEALKKAEVVKNNNSNATQKEVDDATKNLKQAQNLDLGGQTTN
KDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDTKSKFDDALKKAEDVKNDSNANQKEVDD
ATKNLKNLNNLKGQPAKKANLIASKDNAKIHKQTLPLPQTGTETNPLTAIGIGLMAL
GAGIFAKKKRKDDFA (SEQ ID NO:6),

o secuencias sustancialmente idénticas a la SEQ ID NO:5 o SEQ ID No:6.

5 La localización correcta y el plegado de un polipéptido se puede determinar utilizando métodos estándar. Por ejemplo, las fracciones enriquecidas con pared celular de *Lactobacillus* pueden obtenerse suspendiendo las bacterias en una solución tamponada (por ejemplo, sacarosa al 25 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) seguido por tratamiento con enzimas que degradan la pared celular (por ejemplo, lisozima y mutanolisina) y después separando los protoplastos resultantes por centrifugación diferencial (Piard et al., J. Bacteriol. 179:3068-3072 (1997)). Las fracciones pueden seleccionarse a continuación por transferencia Western para confirmar la expresión dentro de la pared celular.

15 La actividad de plegado y biológica de un polipéptido expresado también puede determinarse utilizando métodos estándar. Por ejemplo, se pueden utilizar los ensayos ELISA utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido plegado de forma nativa para confirmar el plegado y la estructura tridimensional del polipéptido. Los ensayos de actividad biológica variarán por supuesto dependiendo de la actividad del polipéptido. Por ejemplo, para los polipéptidos que se unen a los espermatozoides, el polipéptido expresado se puede probar usando ensayos de unión estándar.

20 Cuando se sintetiza un gen para aumentar la expresión en una célula hospedadora, es deseable diseñar el gen de manera que su frecuencia de uso de codón sea similar a la frecuencia de uso de codón preferida de la célula hospedadora. El porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de codón preferido para un gen sintético respecto a la empleada por una célula hospedadora se calcula primero determinando del porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un solo codón de la de la célula hospedadora seguido por la obtención de la desviación promedio respecto a todos los codones.

25 La secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido particular puede ser alterada para coincidir con el uso del codón de un hospedador particular. Por ejemplo, el uso de codón de *Lactobacillus* puede ser utilizado para derivar un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y comprende codones preferidos de *Lactobacillus*. La frecuencia de uso de codón preferida exhibida por una célula hospedadora se puede calcular promediando la frecuencia de uso del codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula hospedadora. Este análisis está limitado preferiblemente a genes que están altamente expresados por la célula hospedadora. Pouwels y Leunissen (Nucleic Acids Res. 22:929-936. (1994)), por ejemplo, proporciona la frecuencia de uso de codón por genes altamente expresados exhibidos por diversas especies de *Lactobacillus*. Las tablas del uso de codones están también disponibles a través de Internet.

35 En otra realización, el vector contemplado en la presente memoria comprende además una inserción de una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido marcador. El polipéptido marcador puede comprender, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), DS-Rojo (proteína fluorescente roja), fosfatasa alcalina secretada (SEAP), beta-galactosidasa, luciferasa, o cualquier número de otras proteínas indicadoras conocidas para alguien experto en la materia.

40 Una variedad de GFP relacionadas con *Aequorea* que tienen excitación y espectros de emisión útiles han sido modificados mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos de una GFP de origen natural de *Aequorea victoria* (Prasher et al., 1992, Gene, 111:229-233; Heim et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:12501- 12504; PCT/US95/14692).

45 En una realización, la transferencia de ácidos nucleicos que tienen secuencias que codifican compuestos espermicidas en organismos heterólogos da como resultado la expresión.

50 Los métodos para la detección del producto expresado son bien conocidos en la técnica, y pueden comprender, en una realización, transferencia Northern, PCR, HPLC, Espectroscopia de masas, ELISA, RIA o transferencia Western [ver "Cell Biology: A Laboratorio Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds)].

55 En algunas realizaciones, los casetes de resistencia a antibióticos se pueden introducir en los organismos como se describe en la presente memoria como marcadores para confirmar la expresión de la construcción introducida. En algunas realizaciones, los casetes de susceptibilidad a los antibióticos se introducirán en los organismos, como un protocolo de seguridad para construcciones introducidas en los sujetos, y en algunas realizaciones, para la

supresión del efecto anticonceptivo, para facilitar un medio seguro para la concepción, por ejemplo, por la sujeto que ingiere un ciclo corto de terapia antibiótica, que erradica el anticonceptivo biológico.

5 Esta invención proporciona una bacteria comensal genéticamente modificada del tracto genital femenino, en la que dicha bacteria genéticamente modificada en un *Lactobacillus* modificado para expresar un agente anti-espermatozoides, en el que dicho agente anti-espermatozoides es un anticuerpo anti-espermatozoides, o un fragmento del mismo, efectivo para prevenir la motilidad de los espermatozoides, la fusión del espermatozoide-óvulo o la penetración del espermatozoide en el óvulo, o una combinación de los mismos.

10 Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados. En algunas realizaciones, los fragmentos scFv se contemplan como parte de los organismos modificados, composiciones, kits y para su uso de acuerdo con los métodos de esta invención. En algunas realizaciones, otros fragmentos contemplados incluyen un F(ab')₂, un monómero de Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (ver, Paul (Ed.) Fundamental Immunology, Tercera Edición, Raven Press, Nueva York (1993)) y otros. Mientras que diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. De esta manera, el término anticuerpo, como se usa en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos ya sea producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla (scFv)).

Los métodos de preparación abarcados de tales células se describen en la presente memoria, sin embargo el experto apreciará que cualquier compuesto espermicida, o combinaciones de compuestos, se pueden producir de forma recombinante en un organismo comensal.

25 En algunas realizaciones, se utilizan fragmentos de anticuerpo, los cuales son espermicidas o de otro modo inhiben la motilidad de los espermatozoides o la capacidad de fusión del espermatozoide-óvulo o la penetración del espermatozoide en el óvulo en diversas especies animales. Por ejemplo, y en algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo, por ejemplo scFv, interactúa específicamente con un epítipo específico de los espermatozoides altamente conservado, que se conserva en especies animales y seres humanos, de manera que la prueba de eficacia *in vivo* puede llevarse a cabo en modelos animales, y la validación del mismo fragmento de anticuerpo, por ejemplo scFv humano o una versión humanizada del mismo puede realizarse en ensayos clínicos en seres humanos.

30 En algunas realizaciones, tales anticuerpos/fragmentos de anticuerpo pueden ser generados como se ilustra en la presente memoria, o como se describe en Xu, et al. Arch Androl. Sep- Oct 1994; 33(2):141-4; Clarke et al., Arch Androl. Jul-Ago 1995; 35(1):21-7; el documento WO0107083A1; las patentes US-5.830.472, US-5.753.231, US-5.227.160 o por cualquier método apropiado, como se apreciará por los expertos en la materia. El diseño de un organismo comensal para expresar tal compuesto puede realizarse por cualquier medio, también, por ejemplo como se describe en PNAS 102:11993-11998 (2003).

Los anticuerpos completamente humanos/fragmentos de anticuerpo son particularmente deseables para aplicaciones en la anticoncepción en mujeres. Los anticuerpos/fragmentos de anticuerpo humanos se pueden obtener por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos en la presente memoria usando colecciones de anticuerpos/fragmentos de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Ver patentes US-4.444.887 y US-4.710.111; y los documentos WO 98/46645; WO 99/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741, e incluyendo los Ejemplos proporcionados más adelante.

45 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo humanos, por ejemplo scFv también se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar, 1995. Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos y fragmentos de los mismos, ver, por ejemplo, los documentos WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; EP 0598877; patentes US-5.413.923; US-5.625.126; US-5.633.425; US-5.569.825; US-5.661.016; US-5.545.806; US-5.814.318; US-5.885.793; US-5.916.771 y US-5.939.598. Además, las compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA). Kirin, Inc. (Japón), Medarex (NJ) y Genpharm (San José, CA) pueden proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

60 Los anticuerpos de la invención también pueden ser modificadas por los métodos y agentes de acoplamiento descritos por Davis et al. (patente US-4.179.337) con objeto de producir fragmentos de anticuerpo, que sustancialmente no inducen ninguna respuesta inmunogénica.

65 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende la bacteria modificada como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender bacterias modificadas como se describe en la presente memoria, donde la composición comprende bacterias que expresan diferentes agentes anti-espermatozoides heterólogos, estando contenidas dentro de la misma composición como parte de la dosis unitaria administrada. En algunas realizaciones, tales bacterias que expresan diferentes agentes anti-espermatozoides heterólogos pueden variar en términos de la especificidad para un antígeno o epítipo particular, o pueden variar en términos del antígeno o epítipo al cual se une el fragmento, o puede variar en términos de avidéz por el epítipo, o variar en término del isotipo del cual se deriva, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, tal composición también puede comprender diferentes cepas bacterianas que expresan los mismos o diferentes agentes anti-espermatozoides heterólogos, que están contenidos dentro de la misma composición como parte de la dosis unitaria administrada.

En algunas realizaciones, la composición está en la forma de un supositorio, líquido, aerosol, espuma, crema, mousse vaginal, o cualquier vehículo adecuado para la administración vaginal.

En algunas realizaciones, las bacterias modificadas o composiciones que comprenden las mismas se aplican o se incorporan dentro de un anillo vaginal, que luego se administra a un sujeto del sexo femenino. En algunas realizaciones, la invención contempla un condón que contiene una bacteria modificada o composiciones que comprenden la misma aplicada a la superficie exterior del condón y conservarse de tal forma que el usuario del condón puede transferir las bacterias modificadas a su pareja femenina durante el coito.

En algunas realizaciones, el término "comprende" o formas gramaticales del mismo, se refiere a la inclusión del principio activo indicado, tal como el comensal modificado de esta invención o fago como se describe en la presente memoria, así como la inclusión de otros agentes activos, y vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, emolientes, estabilizadores, etc., como se conocen en la industria farmacéutica. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único principio activo es el principio activo indicado, es decir, el organismo comensal modificado como se describe en la presente memoria, sin embargo, se pueden incluir otros agentes/componentes/compuestos para la estabilización, conservación, etc. de la formulación, pero que no están implicados directamente en el efecto anticonceptivo. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" puede referirse a los componentes, que ejercen un efecto anticonceptivo a través de un mecanismo diferente de aquel del organismo comensal modificado, que intensifica la eficacia anticonceptiva o prolonga la eficacia anticonceptiva o ambas. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" puede referirse a componentes que facilitan la liberación del organismo comensal modificado, por ejemplo, aumentando su liberación de la formulación de supositorio u otra formulación, promueven la colonización efectiva, promueven la colonización uniforme, y otros efectos deseables, que facilitan la actividad del organismo comensal modificado, y que no son componentes del organismo comensal modificado. En algunas realizaciones, tales agentes pueden incluir agentes que inducen la expresión del agente anti-espermatozoides codificado, o en algunas realizaciones, aumentan la expresión del agente anti-espermatozoides codificado. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste en" se refiere a una composición, que contiene el principio activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La administración de bacterias modificadas a una superficie mucosal deseada depende de la accesibilidad del área y las condiciones locales. Por ejemplo, las bacterias modificadas pueden ser colocadas en una solución salina, crema, supositorio o en una espuma para su administración a la mucosa vaginal. Las espumas pueden incluir, por ejemplo, uno o más polisacáridos hidrofóticamente modificados tales como celulosas y quitosanos. Los celulosos incluyen, por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, y similares. Los quitosanos incluyen, por ejemplo, las siguientes sales de quitosano; lactato de quitosano, salicilato de quitosano, pirrolidona carboxilato de quitosano, itaconato de quitosano, niacinato de quitosano, formiato de quitosano, acetato de quitosano, galato de quitosano, glutamato de quitosano, maleato de quitosano, aspartato de quitosano, glicolato de quitosano y quitosano sustituido con amina cuaternaria y sales de los mismos, y similares. La espuma también puede incluir otros componentes tales como agua, alcohol etílico, alcohol isopropílico, glicerina, glicerol, propilenglicol y sorbitol. Los espermicidas se incluyen opcionalmente en la composición bacteriana. Otros ejemplos de espumas y vehículos para la administración de espuma se describen, por ejemplo, en las patentes US-5.595.980 y US-4.922.928.

En algunas realizaciones, las bacterias pueden administrarse como un supositorio o pesario. Ver, por ejemplo, la patente US-4.322.399. En algunas realizaciones, las bacterias de la invención se preparan en una matriz de conservación tal como se describe en la patente US-6.468.526 y se administran en un elemento soluble hecho de material polimérico soluble y/o material de carbohidrato complejo seleccionado por sus propiedades de disolución, de manera que se mantiene en forma sustancialmente sólida antes de su uso, y se disuelve debido a las temperaturas del cuerpo humano y la humedad durante el uso para liberar el material de agente en un tiempo de liberación y la administración deseados. Ver, por ejemplo, la patente US-5.529.782. Las bacterias también pueden ser administradas en un vehículo de administración de esponja tal como se describe en la patente US-4.693.705.

En algunas realizaciones, las aplicaciones de bacterias modificadas a una superficie mucosal necesitarán repetirse de forma regular; los intervalos de administración óptimos se determinan de rutina, pero variarán con diferentes

ambientes mucosales y la cepa bacteriana. Los intervalos de administración, en algunas realizaciones, pueden variar desde una vez al día hasta una vez hasta cada 2-4 semanas, o más. En algunas realizaciones, la administración seguirá un ciclo menstrual femenino, de manera que la administración seguirá al cese o cese aproximado de menstruación para optimizar la colonización antes de la ovulación en la mujer que se está tratando.

5 En algunas realizaciones donde se introducen bacteriófagos para transformar *Lactobacillus* nativo, el ácido nucleico del bacteriófago seleccionado puede ser manipulado de tal manera que el gen o los genes heterólogos reemplazan a los genes codificados para proteínas recubiertas por bacteriófagos, haciendo que el bacteriófago sea defectuoso para la replicación. Añadir estas moléculas de ADN recombinante en los lisados celulares que contienen proteínas
10 de bacteriófago funcionales llevarán al ensamblaje de partículas de bacteriófago funcionales que llevan el gen o los genes heterólogos. Estas partículas de bacteriófago defectuosas para la replicación pueden ser introducidas posteriormente en una superficie mucosal deseada para infectar bacterias seleccionadas de la flora. La dosis típica sería de 10^8 a 10^{12} UFP/ml aplicado a la superficie mucosal. La proporción de solución a aplicar a la superficie tratada debe ser aproximadamente de 0,1 a 1,0 ml por centímetro cuadrado de superficie mucosal. El vehículo sería similar al vehículo descrito anteriormente para las bacterias.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método anticonceptivo, comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto células del tracto genital femenino con bacterias modificadas como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, de acuerdo con este aspecto, el método comprende administrar una
20 composición que comprende las bacterias modificadas al tracto genital de un sujeto del sexo femenino que necesita del mismo, incluyendo en algunas realizaciones, una composición como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención también se proporciona para poner en contacto el tracto genital femenino con un bacteriófago como se describe en la presente memoria, que a su vez conduce a la modificación de la flora comensal *in situ*, con objeto de obtener las bacterias modificadas como se describe en la presente memoria.

25 En algunas realizaciones, la expresión "poner en contacto" o "administrar" se refiere tanto a la exposición directa como indirecta al material indicado.

En algunas realizaciones, la dosis administrada al tracto genital femenino puede estar en el intervalo de 10^5 - 10^9
30 bacterias recombinantes. En algunas realizaciones, la dosis está optimizada para un hospedador o población particular. En algunas realizaciones, tal dosis óptima puede estar en el intervalo de 10^7 - 10^9 bacterias recombinantes, o 10^6 - 10^8 bacterias recombinantes, o 10^8 - 10^9 bacterias recombinantes.

35 Se conocen en la técnica varios medios para demostrar la anticoncepción efectiva, todos los cuales son considerados útiles en esta invención, algunos de los cuales se ilustran en la presente.

En una realización, el efecto anticonceptivo del anticonceptivo biológico de la presente invención se determina evaluando el número de crías producidas por ciclo de reproducción por un animal hembra a la que se administró un anticonceptivo de la presente invención. Por ejemplo, después de 1 hasta 3 días de la administración del anticonceptivo biológico a, por ejemplo, se coloca un ratón, ratones hembra individuales en jaulas con un ratón macho. Los ratones machos luego se retiran después de entre 1 y 7 días después del apareamiento. Los ratones hembra se observan diariamente para determinar el nacimiento de las crías. El efecto anticonceptivo del anticonceptivo administrado se determina por la reducción en la preñez y/o en la reducción en tamaño de la camada después de la administración. Por ejemplo, para las especies animales que producen camadas promedio de 3 crías o más (por ejemplo, como se ilustra a continuación, en ratones el tamaño de camada promedio es 11 o más crías, cuando se utilizaron líneas no consanguíneas), la proteína anticonceptiva puede considerarse efectiva si hay una reducción en la tasa de preñez o tamaño de camada del 10 % - 100 %, 30 % - 100 %, o 50 % hasta 100 %, o 60 % - 100 %, 70 % - 100 %, o 80 % hasta 100 %, o 90 % - 100 %, o 95 % - 100 %, o más. Como se ilustra en la presente memoria, cuando se evalúa la eficacia anticonceptiva de una cepa de *L. jensenii* que expresa J102, se observó una
40 eficacia anticonceptiva de al menos 50 %, y por lo tanto, ya que los estudios de colonización realizados en la presente memoria indican que aproximadamente el 50 % de los ratones se colonizaron bien con los lactobacilos, se espera por lo tanto, que en otros animales conocidos que son más receptivos a la colonización de lactobacilos tendría un efecto anticonceptivo superior.

55 Un anticonceptivo se considera efectivo si existe una reducción en el tamaño de camada de al menos un 50 %, y por lo tanto, la Figura 7 demuestra la producción de un anticonceptivo femenino biológico efectivo, que comprende un comensal modificado, que expresa un agente anti-espermatozoides.

60 En algunas realizaciones, la eficacia de los anticonceptivos de la presente invención puede determinarse midiendo los niveles de anticuerpos expresados en secreciones mucosales. La eficacia del anticonceptivo también puede ser evaluada visualizando anticuerpos unidos a los espermatozoides mediante técnicas de inmunohistoquímica, por ejemplo en secreciones recogidas después del coito.

65 Como se ilustra en la presente memoria, cuando los ratones se colonizaron con *L. jensenii* que expresa un scFv anti-espermatozoides, se observó una reducción de entre el 50-58 % en la tasa de preñez y una reducción concurrente en el número de la progenie producida por jaula y, por lo tanto, también por ratón.

En una realización, el organismo comensal que expresa un agente anti-espermatozoides puede ser modificado además para expresar un agente, agente que es efectivo contra la infección de la mujer tratada con un organismo que causa una enfermedad de transmisión sexual. En una realización, el organismo que causa la enfermedad de transmisión sexual es *Chlamydia*, VIH, VPH, y otros, como apreciará el experto en la materia.

5 En una realización, tal agente, agente que es efectivo contra la infección del sujeto del sexo femenino tratado con un organismo que causa la enfermedad de transmisión sexual puede interferir con la infección por el organismo, o en otra realización, tal agente puede reducir la incidencia o carga de la infección. En algunas realizaciones, tal agente puede interferir con la patogénesis de la infección por el organismo. Se entenderá que en este sentido se prevé la
10 incorporación adicional de cualquier agente que es efectivo contra la infección de la mujer tratada con un organismo que causa la enfermedad de transmisión sexual y que deberá considerarse como parte de esta invención.

De acuerdo con este aspecto, y en algunas realizaciones, los anticonceptivos de esta invención pueden ser contemplados como una terapia de combinación anticonceptiva-anti-ETS.

15 Aunque se contempla qué los comensales modificados de esta invención pueden ser modificados adicionalmente, por ejemplo para expresar un scFv anti-*Chlamydia*, o un scFv anti-VPH o anti-VIH, u otros agentes anti-VIH, por ejemplo, cianovirina, se entiende que la presencia de colonización de lactobacilos tipo silvestre del tracto reproductor femenino es protectora contra la infección del tipo ETS. Se contempla también, que los organismos modificados de
20 esta invención que expresan un agente anti- espermatozoides son tan efectivos, o en algunas realizaciones, más efectivos en reducir la incidencia de una enfermedad de transmisión sexual en una población de sujetos del sexo femenino que hacen uso de tales organismos como se describe en la presente memoria que los lactobacilos de tipo silvestre solos.

25 Se entiende que cualquier realización descrita en la presente memoria, aplicable a cualquiera o todos los métodos de esta invención, debe considerarse como parte de esta invención. Se entenderá por los expertos en la materia que se pueden hacer varios cambios en la forma y los detalles de la misma sin alejarse del espíritu y alcance de la invención tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas. Aquellos expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando nada más que una experimentación de rutina, muchos equivalentes a las
30 realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Tales equivalentes se pretenden que estén abarcados en el alcance de las reivindicaciones.

Se apreciará que en referencia a los artículos en la presente memoria tales como “un”, “uno/una” y “el/la” significa uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o de otro modo sea evidente por el contexto. Las
35 reivindicaciones o descripciones que incluyen “o” o “y/o” entre los miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso dados a menos que se indique lo contrario o de otro modo sea evidente por el contexto. La invención incluye realizaciones en las cuales exactamente un miembro del grupo está presente en,
40 se emplea en, o de otra manera es relevante para un producto o proceso dados. La invención también incluye realizaciones en las cuales más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la invención proporciona, en varias realizaciones, todas las variaciones, combinaciones, y permutaciones en las cuales una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., a partir de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introduce en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base a menos que se
45 indique otra cosa o a menos que sea evidente para alguien de experiencia ordinaria en la materia que pudiera surgir una contradicción o incompatibilidad. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en el formato de grupo Markush o similares, debe entenderse que también se describe cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento o elementos pueden ser retirados del grupo. Se debe entender que, en general, cuando la invención, o aspectos de la invención, se refieren como que comprende elementos, características particulares, etc., ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten o consisten esencialmente en, tales elementos,
50 características, etc. Con el fin de una mayor simplificación, estas realizaciones no se han expuesto específicamente en cada caso con las mismas palabras en la presente. Ciertas reivindicaciones se presentan en forma dependiente por conveniencia, pero el Solicitante se reserva el derecho de volver a escribir cualquier reivindicación dependiente en formato independiente para incluir los elementos o limitaciones de la reivindicación independiente y cualquier otra u otras reivindicaciones de las cuales depende tal reivindicación, y tal reivindicación reescrita debe considerarse
55 equivalente en todos los aspectos a la reivindicación dependiente en cualquier forma en que se encuentre (ya sea modificada o enmendada) antes de ser reescrita en formato independiente.

Lo siguiente está destinado a proporcionar materiales, métodos y ejemplos para propósitos ilustrativos como un
60 medio de practicar/ejecutar la presente invención, y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplos

65 En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”

Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes US-4.666.828; US-4.683.202; US-4.801.531; US-5.192.659 y US-5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, ver, por ejemplo, patentes US-3.791.932; US-3.839.153; US-3.850.752; US-3.850.578; US-3.853.987; US-3.867.517; US-3.879.262. US-3.901.654; US-3.935.074; US-3.984.533; US-3.996.345; US-4.034.074; US-4.098.876; US-4.879.219; US-5.011.771 y US-5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D. and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology", Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Los procedimientos de la presente memoria se consideran bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos anti-espermatozoides humanos

Se preparan anticuerpos monoclonales contra antígenos de los espermatozoides humanos fusionando células de mieloma de ratón P3- X63-Ag8-653 con linfocitos de ratones Balb/c inmunizados con espermatozoides de epidídimo humano solubilizados con detergente Tergitol NP-40. El fluido de ascitis de los ratones inyectados con estos híbridos se analiza, siendo acrosoma positivo en los espermatozoides fijados con metanol y membrana plasmática positiva en los espermatozoides no fijados en inmunofluorescencia indirecta. Se verifica la reactividad cruzada del anticuerpo con espermatozoides murinos y de conejo.

Un antígeno de fertilización, FA-1, se purifica a partir de testículos de murinos solubilizados con desoxicolato o diyodosalicilato de litio por cromatografía de inmunoafinidad utilizando un anticuerpo monoclonal, MA-24, como se describe (Naz, R. K. et al., Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83(15):5713-7). Se preparan anticuerpos monoclonales anti-FA-1 como antes y se verifica también la reactividad cruzada con espermatozoides humanos y de conejo.

Ejemplo 2:

Clonación de anticuerpos anti-espermatozoides humanos

Preparación del ARN:

Se seleccionan células de hibridoma que secretan anticuerpos que son espermicidas o de motilidad espermática disminuida. Las células se cultivaron y se hizo un recuento de manera que se procesan 10 millones de células para la recogida de ARN utilizando el kit FastTrack 2.0 (Invitrogen). El ARN total se aisló directamente de las células utilizando una solución tampón de degradación de proteína y lisis de detergente. Seguidamente se aisló el poli(A)+ARN utilizando un protocolo Aviv y Leder modificado en el cual el ARNm se une a una resina oligo dT. La resina se lava a continuación con una solución tampón de bajo contenido en sal para eliminar el ARN total extraño, y el poli(A)+ARN se eluye de la resina. El análisis espectrofotométrico a 260 nm y 280 nm indica la concentración final de poli(A)+ARN.

Transcripción inversa y amplificación del poli(A)+ARN

Se identifican las regiones que reconocen epítomos o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo se identifican y se diseñan oligonucleótidos mediante análisis con sonda de las subunidades de cadena ligera (κ) y cadena pesada de la Ig.

Los oligos de cadena pesada se obtienen a partir del kit Ig-Prime (Novagen), y se diluyen a una concentración final de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con dH_2O .

La transcripción inversa y la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del poli(A)+ARN del hibridoma respectivo se realizan en una única reacción utilizando el sistema Acces RT-PCR de Promega. Brevemente, 5 μg del poli(A)+ARN de hibridoma, 1 μg de cada cebador apropiado (cebadores 1 y 2 para la cadena pesada, cebadores 3 y 4 para la cadena ligera), 1 μl de mezcla dNTP 10 mM, 10 μl de solución tampón de transcripción inversa 5xAMV, 2 μl de MgSO_4 25 mM, 1 μl de transcriptasa inversa AMV, 1 μl de Tfl polimerasa y 30 μl de dH_2O libre de nucleasa se

combinan en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml. La reacción de PCR se lleva a cabo de acuerdo con protocolos estándar y las temperaturas y tiempos de ciclo son optimizados. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa y se purificaron en gel.

5 **Clonación y secuenciación del anticuerpo:**

Los productos purificados en gel se subclonaron en un vector apropiado, que produce altos rendimientos de los productos. El vector, la solución tampón, el ADNc y la ADN ligasa de T4 se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se calienta a 65 °C durante 10 minutos. Se utilizan células de *E. coli* supercompetentes, se añade ADN a las células, se incuban en hielo, luego se calientan a 42 °C, y se añade el medio SOC. Las células se incuban seguidamente en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 1 hora. Estas células luego se extienden en placas Petri con LB y que contienen el compuesto de selección y se incuban durante la noche a 37 °C. Se seleccionan las colonias positivas y se cultivan para la purificación del plásmido.

15 Los plásmidos se purificaron usando columnas QIAGEN-tip 20 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para confirmar la presencia de un inserto de ADNc en los plásmidos purificados, se digiere cada clon con las enzimas de restricción apropiadas, y los productos digeridos se desarrollan en un gel de agarosa. Los clones que contienen el inserto se secuencian.

20 **Análisis de la secuencia de los clones de cadena pesada y ligera**

Los clones positivos se secuencian utilizando el kit Fidelity (Oncor), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación consisten en ADN de plásmido, cebador (por ejemplo, cebador T3, que se encuentra en dirección 5' del sitio de clonación 5' en el vector pCR-Script) y dH₂O, que se calienta a 95 °C durante 5 minutos, se añade solución tampón para la hibridación, y las reacciones se incuban a 37 °C durante 15 minutos. Las reacciones se marcan mediante la adición de solución tampón de reacción, ³³PαATP, ADN polimerasa de T4, y dH₂O y se incuban a 400 °C durante 15 minutos, a continuación se añade la mezcla de terminación A, C, G, T y se incuban a 40 °C durante 5 minutos. Las reacciones se detienen añadiendo solución de proteinasa K y se calienta a 95 °C antes de cargarla en un gel de secuenciación de acrilamida. El gel se desarrolla durante 2 horas a 2000 voltios, se seca sobre papel de filtro Whatman 3 MM a vacío, y se expone a película de rayos x durante una noche a temperatura ambiente. Después del desarrollo de la película los geles se leen en una caja de luz.

La secuenciación también puede realizarse usando un Secuenciador de ADN Automático (por ejemplo, ABI Prism 377). Para cada clon, el ADNc y cebador se combinan con cuatro didesoxinucleótidos marcados con tinción pigmento y la polimerasa AmpliTaq FS. La reacción completa se carga en un solo carril para electroforesis en gel de acrilamida al 5,0 % con pocillo para lectura de 36 cm. La detección en tiempo real de los fragmentos individuales colocados analizados por electroforesis se consigue con barrido láser con producción de imágenes de cámara CCD.

40 **Construcción del vector de expresión**

Se obtendrán vectores de expresión como se describe en McCracken A., et al. (2000) Arch. Microbiana. 173: 383-389; Perez- Casal, J., et al. (2003) Mol. Microbiol. 8: 809-819; Kruger C. et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 702-706; Rao, S. et al., (2005) PNAS 102: 11993-11998; Liu X. et al. (2006) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50: 3250-3259; del Rio, B. et al. (2008) Clinical and Vaccine Immunology 15: 1429-1435; patente US-7.312.076 o Patente Europea N.º 1 011 721 B1 o variaciones de los mismos se prepararán por métodos conocidos en la técnica.

Como alternativa, un vector se construirá de la siguiente manera:
50 Se crea un vector lanzadera subclonando el origen de replicación de *E. coli* a partir de pBluescript en el vector estructural (Fons, M., et al. (1997) Plasmid 37, 199-203) y a continuación se elimina la región de codificación M6 de longitud completa (PstI). Este plásmido se digiere con SmaI, se digiere parcialmente con NdeI, se rellena con la ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y se auto-liga. El plásmido resultante contiene un origen de replicación (repA) compatible con *Lactobacillus* y un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos, y se utiliza para la expresión de proteínas heterólogas en una variedad de especies de *Lactobacillus*.

Clonación de los fragmentos de anticuerpo amplificados en un vector

Los productos amplificados correspondientes a la cadena pesada y ligera se purifican en gel y se vuelven a suspender en dH₂O. El anticuerpo puede ser recodificado por PCR de ensamble (Stemmer W.P.- et al., (1995) Gene 164: 49-53) para ajustarse más estrechamente al uso óptimo del codón de *Lactobacillus*.

Se construye un casete de expresión por amplificación de PCR y se subclona en los sitios apropiados del vector. El casete contiene cuatro componentes, incluyendo elementos promotores compatibles con *Lactobacillus*, fragmento de anticuerpo, secuencia señal para la secreción o dominio de anclaje de la pared celular. Los sitios de restricción únicos se colocan entre cada componente de los extremos 5' a 3', respectivamente. La amplificación de cada

componente por PCR se realiza usando ADN polimerasa Pfu. El promotor P23 de *Lactococcus lactis* (van der Vossen, J.M., et al. (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53, 2452-2457) se crea por amplificación con cebadores 5'-GTGGAGCTCCCCGAAAAGCCCTGACAACCC-3' y 5'-GGAAACACGCTAGCACTAACTTCATT-3'. Para dirigir la secreción del anticuerpo, los cebadores se diseñan para amplificar la secuencia del gen de la capa S (cBSA) de *L. crispatus* desde el supuesto sitio de unión al ribosoma hasta el sitio de escisión de la peptidasa señal, con sitios únicos añadidos a los extremos 5' y 3', respectivamente. La secuencia de nucleótidos de señal de capa S amplificada (CbsAss) correspondiente a MKKNLRIVSAAAAALLAVAPVAA se digiere a continuación y se usa para la clonación en el casete de expresión.

Los productos se ligan en el vector y se inserta un codón de parada TAA en el motivo de anclaje N terminal para asegurar la secreción. La verificación de la secuencia se realiza antes de la transformación en cepas de lactobacilos.

Transformación de lactobacilos:

Cepas bacterianas y de cultivo. Los aislados vaginales humanos de origen natural de *L. crispatus*, *L. gasseri*, y *L. jensenii*, y otros pueden ser obtenidos mediante frotis vaginales de voluntarios sanos o como alternativa, se pueden utilizar las cepas comercialmente disponibles y cultivarlas a 37 °C (CO₂ 5%/aire 95 %) en un caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) o en un caldo Rogosa SL (Difeo). Para el análisis de expresión de proteínas, también se utiliza el Medio 199 (Invitrogen). Los plásmidos se introducen por electroporación en *Escherichia coli* DH12S (Invitrogen). Para el mantenimiento de los plásmidos, se cultiva la *Escherichia coli* DH12S transformada en caldo LB (Difeo) a 37 °C, complementado con eritromicina (300 µg/ml). Los plásmidos se transforman por electroporación en *L. jensenii* esencialmente como se describe para *L. gasseri* (Luchansky, JB, Tennant, M.C. y Klaenhammer, T.R. (1991) J. Dairy Sci. 74, 3.293-3.302). Las bacterias *L. jensenii* transformadas se propagan de forma rutinaria en medio líquido que contiene 20 µg/ml de eritromicina.

Los lactobacilos modificados se prueban para determinar su actividad anti-espermatozoides como se describe a continuación.

Ejemplo 3

Generación de una serie de scfv anti-espermatozoides

Construcción de la biblioteca

Se utilizó una librería de expresión en un fago filamentoso de scFv humano para aislar dominios variables unidos VH-VL humanos contra las proteínas de los espermatozoides. La biblioteca de scFv humanos se preparó usando cebadores diseñados de acuerdo a las secuencias obtenidas en V Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>) y de acuerdo con las técnicas descritas previamente por Barbas y Lerner (Barbas, Bain et al. 1992 Proc Natl Acad Sci USA 89 (10): 4457-61; Gram, Marconi et al. 1992 Proc Natl Acad Sci USA 89(8): 3576-80; Zebedeo, Barbas et al. 1992 Proc Natl Acad Sci USA 89(8): 3175-9; Barbas, Amberg et al. 1993 Gene 137(1): 57-62), Winter (Hawkins, Russell et al. 1992 J Mol Biol 226(3): 889-96; Hawkins and Winter 1992 Eur J Immunol 22(3): 867-70; Hoogenboom, Marks et al. 1992 Immunol Rev 130: 41-68; Hoogenboom and Winter 1992 Immunol Rev 130: 41-68; Marks, Griffiths et al. 1992 Biotechnology (N Y) 10(7): 77 9-83; Marks, Hoogenboom et al. 1992 J Biol Chem. 267(23): 16007-10; Marks and Winter 1992 Behring Inst. Mitt (91): 6-12; Orlandi, Gussow et al. 1992 Biotechnology 24: 527-31; Tomlinson, Walter et al. 1992 J Mol Biol 227(3): 776-98) y por el laboratorio Benhar (Azriel-Rosenfeld, Valensi et al. 2004 J Mol Biol 335 (1): 177-92). La amplificación de los genes de anticuerpo por PCR se realizó usando ADNc de bazo humano y linfocitos de sangre periférica como moldes. En esta biblioteca, el repertorio de dominios variables de la cadena pesada y ligera humanos, están unidos juntos de forma combinatoria para crear todas las combinaciones posibles de moléculas de unión artificiales VH-VL que se fusionan con el gen p3 del fago filamentoso m13, y la proteína de fusión se presenta después en la superficie del fago generalmente en promedio como una única copia por fago.

Antígenos de los espermatozoides

Los péptidos se diseñaron a partir de los antígenos de los espermatozoides FA-1 e YLP(12) respectivamente. El siguiente péptido 1 es un péptido de 35 restos diseñado a partir del antígeno FA-1 y el siguiente péptido 2 es el péptido YLP(12). Los péptidos se biotinilaron para facilitar la unión a las perlas magnéticas para el protocolo descrito a continuación. El péptido 2 tiene la adición de una unión entre la biotina y el péptido, ya que la secuencia del péptido es relativamente corta. La biblioteca de scFv de expresión en fago se seleccionó frente a ambos péptidos como se indica a continuación.

Selección del anticuerpo

La solución madre de la biblioteca se cultivó en LB+Amp (100 µg/ml) de glucosa +1 % a 37 °C. Se añadió fago M13K07 auxiliar, y los cultivos se incubaron con el fago auxiliar en presencia de 100 µg/ml de Amp +30 µg/ml

durante la noche a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 micras y se añadieron 1\5 volúmenes de PEG\NaCl, y el filtrado se colocó en hielo durante un mínimo de una hora, después se centrifugó durante 30 minutos a 4000 RPM, después de lo cual el sedimento que contiene fago se suspendió en PBS. El bloqueo del fago con BSA al 4 % durante 30 minutos tuvo lugar al

5 mínimo, y la selección del anticuerpo basado en perlas magnéticas se realizó de acuerdo con el protocolo como se describe en R. Kontermann y. S. Dübel (eds.), *Antibody Engineering* vol. 1, Springer-Verlag Berlín Heidelberg 2010, páginas 267-287. El bloqueo se realizó durante un mínimo de 30 minutos con BSA al 2 %. Las perlas bloqueadas se añadieron al fago bloqueado, y se eliminaron las perlas, eliminando así todo el fago que se une a la estreptavidina. El fago bloqueado se incubó seguidamente con biotina durante 30 minutos y posteriormente se incubó con las perlas

10 durante 30 minutos, después de lo cual se desecharon las perlas.

Los fagos se incubaron a continuación con los siguientes péptidos durante una hora:

ACGVSRPVIACSVTIKEGSQLKQQIQSIQQSIERL (SEQ ID NO: 1)---- biotina e YLPVGGRLRRIGG (SEQ ID NO: 2)---- Ahx---- y luego se incubaron con las perlas durante 30 minutos, se lavaron y se eluyeron. El eluido neutralizado se mezcló a continuación con células dh5 α F+ durante 60 minutos a 37 °C y se cultivaron en placas LB+ 100 μ g/ml de Amp+ glucosa al 1 % durante la noche. Las etapas de inmunopurificación se repitieron para varios ciclos.

15

20 **Especificidad del fragmento de anticuerpo**

Se llevó a cabo un ensayo ELISA utilizando los péptidos como sondas y la afinidad relativa por el fragmento se evaluó por D.O.

E. coli TG-1 infectada con los fagos inmunopurificados (como se describe más arriba) se sembró en placas para proporcionar colonias individuales. Estas colonias se seleccionaron en 100 μ l de medio YTAG en pocillos de una placa de 96 pocillos estéril de fondo plano y se cultivaron a 30 °C en un agitador a 150 RPM ON. Se transfirieron 10 μ l de fago en una placa de 96 pocillos fresca que contiene 90 μ l de YTAG + 2,5 μ l/ml (5X 10⁸ UFC) de fago M13K07 auxiliar y se cultivaron a 37 °C sin agitación durante 30 min después de agitación a 150 RPM durante 30 minutos. Las placas se centrifugaron a 4000 RPM durante 5 minutos a 14 °C y se desechó el sobrenadante. Se añadieron

25 200 μ l/pocillo de YTAG (con kanamicina) y la placa se dejó crecer a 30 °C en un agitador a 150 RPM durante la noche. La placa de bacterias se centrifugó a continuación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se mezclaron 100 μ l del sobrenadante con 100 μ l de PBST se utilizó para ELISA.

30

Se sembraron 100 μ l/pocillo de antígeno y antígeno de control en placas ELISA a 4 °C durante la noche para recubrir las placas. Las placas ELISA se lavaron una vez con tampón de lavado (300 μ l/pocillo de PBST) y se bloquearon con leche/PBS al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron una vez con tampón de lavado. A continuación los fagos se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) seguido de 3 lavados con tampón de lavado. Se añadieron 50-100 μ l/pocillo de anticuerpo anti-fago M13 diluido con anti fago conjugado por HRP y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de 3 lavados con

35 tampón de lavado se añadieron 100 μ l/pocillo de solución de sustrato OPD durante 20 minutos a TA. La reacción se detuvo a continuación con 50 ml de solución de HCl 1 M, las placas se leyeron a 450 nm. La detección se realizó usando un anticuerpo anti-fago etiquetado con peroxidasa rábano picante (HRP) y el color resultante de la reacción sustrato-enzima se leyó con un lector ELISA automatizado.

40

En otro protocolo ELISA se recubren las placas con 2 μ g/ml de BSA-biotina en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST y posteriormente se recubrieron con 2 μ g/ml de estreptavidina en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, y se lavaron de nuevo con PBST. Las placas se recubrieron a continuación con 2 μ g/ml de un péptido en PBS durante la noche a 4 °C, se lavaron una vez con PBST y se bloquearon con una solución al 3 % de leche/PBS durante 1 hora a 37 °C, siendo el resto del protocolo el mismo que antes excepto que las placas se desarrollaron con 50 μ l/pocillo de reactivo de parada TMB (tetrametil bencidina) diluido cuatro veces en SDDW y se detuvieron después de 5 minutos con 50 μ l/pocillo de H₂SO₄ 1M.

45

50

Resultados

La Figura 1 representa gráficamente las afinidades relativas de los scFv expresados en fagos aislados y clonados para los péptidos de los espermatozoides probados. Las columnas 1-3 representan la unión de tres scFvs al péptido derivado de FA-1 y las columnas 4-6 representan la unión de tres scFvs al péptido derivado de YLP(12). Se utilizó BSA como un control de unión negativo. Los scFv exhiben una afinidad significativa para los péptidos indicados en comparación con los controles. La Figura 2 representa las afinidades relativas de algunos scFv expresados en fagos aislados y clonados para los péptidos de los espermatozoides probados. La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos de unión ELISA que identifican una serie de scFv no de unión, que luego se utilizaron a como controles. Uno de estos clones de scFv, el J112, se utiliza generalmente en este contexto. El clon J102 muestra mayor afinidad que otros clones y que los controles A y B, que eran muestras que no contienen fago scFv, o ningún péptido ni scFv, respectivamente. Se detectó la unión midiendo la DO en muestras probadas con anticuerpo anti-fago marcado con HRP (anticuerpo anti-PVIII). Algunos de estos scFv se utilizaron posteriormente en los Ejemplos siguientes, sirviendo como controles y anticonceptivos, según corresponda.

55

60

65

Ejemplo 4**Lactobacilos modificados que expresan scFv****5 Clonación y secuenciación del anticuerpo:**

Los scFv se liberaron del genoma fagémido por digestión con escisión NcoI y NotI de acuerdo con los protocolos establecidos para demostrar fragmentos scFv intactos en los clones de fago. Los productos purificados de gel se subclonaron en el vector pSLP111.1, obsequio del Dr. Jos Seegers, que produce altos rendimientos de los productos.

10 En la Figura 4A se presenta un mapa del vector. La subclonación se realizó por amplificación de PCR del scFv con cebadores únicos que contenían en el cebador 5' un sitio de restricción NcoI y en el cebador 3' un sitio Ascl (5'-GCGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTG., 3'-GCGGGCGCGCCCCAGCACAGTGAGTTTGGTCCC). El ADN amplificado se purificó en gel y los sitios de restricción se activaron por escisión con NcoI y Ascl. El fragmento de ADN escindido se purificó a continuación en gel por segunda vez y se ligó en (con ligasa T4) el vector PSLP111.1 que se cortó previamente con NcoI y Ascl y se purificó también en gel. La mezcla de ligación se transformó con DH5alpha de *E. coli* que se hizo competente mediante la técnica de cloruro de calcio (Maniatis). Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar con cloranfenicol (10 microgramos/ml), se seleccionaron colonias después de la incubación durante la noche y el ADN de plásmido se preparó a partir de dos docenas de colonias. El ADN del plásmido se preparó a partir de estas colonias utilizando un kit de plásmido Qiagen miniprep y se cortó con NcoI y Ascl para identificar aquellas que contienen el inserto de ADN de tamaño apropiado. Los clones positivos se trasladaron a continuación en *Lactobacillus jensenii* como se describe a continuación.

Los plásmidos se purificaron usando columnas Qiagen-tip 20 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Para confirmar la presencia de un inserto de ADNc en los plásmidos purificados se digirió cada clon con NcoI - Ascl y los productos digeridos se desarrollaron en un gel de agarosa. Los clones que contienen el inserto se secuenciaron.

30 Análisis de la secuencia de clones de la cadena pesada y ligera

Los clones positivos se secuenciaron por el servicio de secuenciación del Instituto Weizman, que usa un secuenciador automatizado ABI con todas las condiciones y reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores de secuenciación iniciales utilizados fueron:

35 Directo CCATGATTACGCCAAGCTTGGGAGCC (SEQ ID NO: 9)
Inverso GAATTCAACCTTCAAATTGCC (SEQ ID NO: 10)

Clonación de los fragmentos de anticuerpo amplificados en un vector

40 Los productos amplificados purificados por gel se subclonaron en los sitios apropiados del vector. El casete contiene cuatro componentes, incluyendo elementos promotores compatibles con *Lactobacillus*, el fragmento de anticuerpo, la secuencia señal para la secreción o el dominio de anclaje de la pared celular.

La verificación de secuencia se realizó antes de la transformación en cepas de lactobacilos.

45 Transformación de lactobacilos:

Se utilizó el aislado vaginal humano ATCC de la cepa de *L. jensenii* número 25258 y se cultivó a 37 °C (CO₂ 5 %/aire 95 %) en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco). Se introdujeron pSLP111.1 que contienen el inserto mediante la técnica de cloruro de calcio en *L. jensenii*. Las bacterias *L. jensenii* transformadas se propagaron de forma rutinaria en medios líquidos que contienen 10 µg/ml de cloranfenicol.

Ensayos de motilidad y unión del espermatozoide:

55 Se aislaron espermatozoides de ratón de acuerdo con protocolos establecidos [Liu Z, et al., Journal of Biological Chemistry (2010) 285, 2758-2770.]. Se suspendieron 10⁶ espermatozoides en solución tampón de espermatozoides (F-10 de Jam suplementado con HEPES 21 mM; bicarbonato de sodio 4 mM; seroalbúmina humana al 0,6 %, 3,6 ml de lactato de sodio (solución madre al 60 %) y gentamicina: 10 microgramos/ml) en tubos cónicos, los espermatozoides se mantuvieron de tal manera que se facilitase su capacidad para nadar hasta la parte superior del tubo, donde se realizó la recolección de los espermatozoides móviles por eliminación de un volumen pequeño (unos pocos cientos de microlitros) de la solución tampón. Se verificó el recuento de los espermatozoides mediante un hematómetro y se incubaron en una relación de 1:1 o 1:2, espermatozoides:lactobacilos (ufc).

65 Se aislaron espermatozoides de ratón y se evaluó la unión del scFv a los espermatozoides mediante ensayos de unión utilizando scFv expresados en fagos. Un ensayo de nado como se describe arriba se utilizó para seleccionar los espermatozoides móviles, que se aislaron y colocaron en portaobjetos de cámara, se secaron al aire, y después

el fago que contiene los scFv de interés (10^8) se aplicaron a las cámaras, e incubaron durante 1 hora, se lavaron, después los espermatozoides se probaron con anticuerpo anti-cp8 unido a HRP (ENCO, Israel), en una dilución de 1:200, seguidamente las cámaras se lavaron y se desarrollaron con DAB y peróxido.

5 Resultados

La Figura 4B muestra los productos de digestión con NcoI y NotI del plásmido. Los plásmidos se cortaron con NcoI y NotI, a 37 °C durante tres horas.

10 Se observó que un scFv expresado, J102, tenía una alta afinidad de unión al antígeno de los espermatozoides altamente conservado. La secuenciación del clon dio un ADN completo y una secuencia de proteína mostrada en las Figuras 5A-5B (SEQ ID NO: 7-8).

15 El scFv J102, y otros, se probaron para valorar la unión tanto a los espermatozoides humanos como murinos. Aunque el scFv J102 es un fragmento derivado de humano, la alta conservación entre las especies del antígeno FA-1 dio como resultado la unión de J102 tanto a espermatozoides humanos como murinos, como se determina en los ensayos *in vitro*. La Figura 6A muestra un unión significativa de los lactobacilos que expresan scFv para los espermatozoides de ratón, donde casi cada espermatozoide evaluado mostraba una tinción significativa, mientras que los lactobacilos de control que expresan scFv para el antígeno no de espermatozoides no se unía de forma apreciable a los espermatozoides murinos (Figura 6B). Los estudios de unión a espermatozoides humanos fueron consistentes con los hallazgos de ratón (datos no mostrados).

20 Los estudios de motilidad se realizaron con espermatozoides humanos, como se describe en la sección de métodos anterior. Aunque los lactobacilos que expresan un control irrelevante muestran un efecto modesto sobre la motilidad de los espermatozoides *in vitro*, cuando se utilizan lactobacilos que expresan scFv unido a los espermatozoides, se observaba un efecto pronunciado que afectaba a la motilidad del espermatozoide, incluyendo los ensayos para probar el efecto de scFv J102, y se determinó que la motilidad disminuía un 50 % en comparación con los controles, lo que indica un potencial de los lactobacilos que expresan scFv unido a los espermatozoides de interferir con la función del espermatozoide.

30 Ejemplo 5

Actividad anti-espermatozoides de *L. jensenii* modificado

35 ***Inhibición de la fertilización:***

Se incubaron 10^5 espermatozoides de las especies respectivas durante la noche en frío en las soluciones de anticuerpo relevante y de control (diluido 1:50, 1:5 o 1:1), o construcciones que producen anticuerpo de control y relevante, y se añadieron óvulos, momento en el cual se permite que proceda durante una hora la unión del espermatozoide al óvulo. Los óvulos se lavan a continuación y se determina el número de los espermatozoides unidos por óvulo y se expresa como un porcentaje de tal unión a las muestras de control. Además, se evalúan las construcciones con mayor porcentaje de inhibición.

45 ***Estudios de inhibición de la fertilización in vivo:***

Se inyectan hembras (ratones, conejos) intravaginalmente con fragmentos de anticuerpo relevantes purificados, fragmentos de anticuerpo de control purificados, lactobacilos modificados que expresan los fragmentos de anticuerpo relevantes, y lactobacilos modificados que expresan los fragmentos de anticuerpo de control. Un macho y 2-4 hembras se alojan en múltiples puntos después de la administración intravaginal a las hembras de los agentes respectivos. Veinticuatro horas después de la agrupación, se comprueban visualmente las hembras diariamente para detectar la presencia de tapones vaginales. Las hembras se marcan para distinguirse entre las mismas (por ejemplo, con marcas sucesivas en las orejas) y, opcionalmente, dos semanas después del inicio del apareamiento, las hembras se sacan y se llevan a jaulas individuales. Después de tres semanas, se cuentan las hembras preñadas que tienen camadas y progenie. Las construcciones con la mayor actividad anticonceptiva luego pueden ser seleccionadas y evaluadas/optimizadas.

60 Los ensayos de inhibición de la fusión se llevan a cabo de la siguiente manera. Ratones hembra jóvenes (8-10 semanas de edad) se inyectan con 5 unidades de suero de yegua preñada (PMS) en NaCl 0,9 por vía intraperitoneal. Cuarenta y ocho horas más tarde, los ratones se inyectan IP con 5 unidades de hCG (gonadotropina coriónica humana) en NaCl al 0,9 % para desencadenar la súper ovulación. De 14 a 16 horas después de la inyección de hCG, los ovocitos ovulados se recogen y se tratan con hialuronidasa para eliminar las células del cúmulo. La zona pelúcida se elimina con una mezcla de proteasas. Los óvulos libres de zona pelúcida se incuban en medio de cultivo con péptido a una concentración especificada durante 30 minutos [Hogan, B., et al., *Manipulating The Mouse Embryo*, 91-101, (1986)]. Los espermatozoides recogidos del epidídimo de ratones machos se capacitan por incubación y el acrosoma se hace reaccionar como se describe en Fleming y Yanagimachi [*Gamete Res.* 4, 253-273 (1981)] y se añade a los óvulos, en presencia de anticuerpo de control y relevante, y las construcciones que

expresan los mismos, y se incuban durante 15 minutos. Los óvulos se transfieren a continuación a un medio de cultivo libre de espermatozoides y se incuban durante 1 hora y 45 minutos adicionales. Los óvulos se fijan después y se tiñen como se describe por Primakoff et al., [J. Cell. Biol. 104, 141 (1987)]. Seguidamente se cuenta el número total de cabezas de los espermatozoides hinchadas. Las cabezas de los espermatozoides hinchadas son una indicación de que el espermatozoide y el óvulo se han fusionado.

Basándose en estas observaciones, se calculan varios índices. El índice de fertilización (FI) se determina dividiendo el número total de cabezas hinchadas por el número total de óvulos. La tasa de fertilización (FR) es el porcentaje de óvulos fertilizados. El porcentaje de inhibición se determina dividiendo el índice de fertilización del péptido experimental por el índice de fertilización del péptido de control. Se seleccionan las construcciones con la mayor actividad.

Ejemplo 6

***L. jensenii* modificado como anticonceptivos efectivos**

Otras especies animales se probarán de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 4. Se pueden evaluar conejos, ratas, cobayas, mini-cerdos, monos y otras especies. En este contexto se evaluarán varias construcciones y se registrarán las diferencias entre las especies animales. Un porcentaje de eficacia se determinará para cada construcción, en cada línea animal.

Además, cada especie se someterá a AIF con semen obtenido de machos de fertilidad probada, haciéndose un recuento de los espermatozoides y evaluando la motilidad. Los lactobacilos que expresan fragmentos de anticuerpo relevante y de control se aplican intravaginalmente y la AIF se realiza varias veces después de la administración. En el momento de la inseminación artificial, la ovulación es inducida por una inyección de por ejemplo 100 UI de hCG. Después de la ovulación y la inseminación artificial, se permite a las hembras completar su preñez para evaluar los posibles efectos teratogénicos.

Las hembras a las que se les ha administrado lactobacilos de control y lactobacilos que expresan fragmentos del anticuerpo relevante se evaluarán para determinar la persistencia en el tracto genital.

Con este fin, se recogen las secreciones vaginales pipeteando repetidamente PBS estéril en la abertura vaginal. El fluido y el moco se mezclan centrifugando brevemente en una microcentrifuga, y el fluido sobrenadante se ensaya para determinar la presencia del scFv. Las titulaciones del fragmento de anticuerpo anti-espermatozoides en el suero y los lavados vaginales se determinan mediante un ELISA.

Se llevan a cabo estudios temporales. Las hembras a las que se les ha administrado lactobacilos se alojan repetidamente con machos y se evalúa la tasa de preñez/eficacia anticonceptiva, como una función del tiempo después de la administración.

Ejemplo 7

***L. jensenii* que expresan scFv unido al espermatozoide son anticonceptivos eficaces en ratones. Administración a ratones y estudios de apareamiento:**

Ratones ICR hembra se anestesiaron con 0,1 ml/g de peso de una solución de ketamina (conc. 100 mg/ml) 0,5 ml de xilazina (conc. 20 mg/ml) y 8,5 ml de solución salina normal al 0.9 %. A los ratones anestesiados se les administró intravaginalmente 10^8 *L. jensenii* modificado en fase semilogarítmica recién cultivadas (determinado por DO), línea J102 o J112 de control (N = 12 ratones por grupo). Después de la administración, las hembras se mantuvieron sobre el lomo, la pelvis inclinada hacia arriba durante 30-60 minutos. Los lactobacilos se administraron a las hembras diariamente durante 3 días y luego se aparearon con machos de línea ICR coincidentes en edad. Los machos realojaron con las hembras durante 7 días, rotaron cada dos días durante este período y luego se separaron. Las hembras luego se evaluaron visualmente para determinar la presencia de tapones, y se registró el número de ratones hembra preñadas y la progenie producida por jaula.

Estudios de colonización en ratón:

Entre 12 y 24 horas después de una primera administración intravaginal, se hizo un frotis o lavado vaginal de las hembras y la muestra/fluido recuperada se sembró en placas MRS que contenían cloranfenicol y se cultivó a 37 °C durante 24 horas. La presencia de céspedes bacterianos sirvió como indicador de ña colonización vaginal.

RESULTADOS:

Los estudios de colonización en ratón demuestran que hasta el 50 % de los fluidos de lavado proporciona céspedes que indican que la colonización ocurre en hasta el 50 % de los ratones, después de una administración intravaginal sencilla. Se observó la persistencia vaginal de los lactobacilos administrados hasta 5 días después de la

administración, en animales en los cuales la colonización se demostró por frotis.

5 Se llevaron a cabo dos experimentos individuales donde a las hembras se les administró el *L. jensenii* que expresa el scFv anti-espermatozoides o cepa de control, y en cada experimento, se demostró una anticoncepción eficaz (Figura 7A). Aunque el 92 % de las hembras de control estaban preñadas en cada experimento, las hembras tratadas con el *L. jensenii* que expresa el scFv anti-espermatozoides mostró una reducción significativa en la tasa de preñez (58 % o 50 %).

10 El número de progenie total, así como el número de progenie por jaula se redujo en comparación con los controles, como una consecuencia de la administración de un *L. jensenii* que expresa el scFv anti-espermatozoides (Figura 7B). Teniendo en cuenta estos hallazgos, el número de progenie por ratón también se redujo en las hembras tratadas en comparación con los controles.

15 **Ejemplo 8**

Seguridad de los anticonceptivos biológicos

20 Los lactobacilos modificados se evalúan para determinar su efecto sobre la irritabilidad vaginal. Los animales, tales como los ratones son tratados intravaginalmente con los lactobacilos, una vez al día durante 10-30 días consecutivos. Los animales son posteriormente sacrificados y el aparato reproductor se examina macroscópicamente y microscópicamente.

25 Los tejidos vaginales se examinan para determinar la ulceración epitelial, el edema, la infiltración de leucocitos y la congestión vascular, como una función de introducción de los lactobacilos, y los lactobacilos modificados que expresan anticuerpos de control y relevantes. Los animales tratados con lactobacilos modificados se comparan con aquellos aislados naturales administrados, así como con los animales no tratados. Dado el caso, se puede observar la mejora en la histología del tracto genital.

30 **Ejemplo 9**

Reversibilidad de los anticonceptivos

35 A los animales hembra que a pesar de apareamientos repetidos no quedan preñadas, como una función de la administración de lactobacilos, se les administrarán antibióticos y se aparearán. La preñez se evaluará como una medida de la reversibilidad de los lactobacilos modificados. De manera similar, los animales se evaluarán para determinar la persistencia de los lactobacilos en el tracto genital. En caso de población disminuida o ausente con los lactobacilos modificados, los animales se aparearán, y se determinará su preñez.

40 Una vez que los estudios de seguridad y eficacia se han realizado en modelos animales apropiados, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, entonces se contempla la realización de ensayos clínicos en seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria comensal genéticamente modificada del tracto genital femenino, en la que dicha bacteria genéticamente modificada es un *Lactobacillus* modificado para expresar un agente anti-espermatozoides, en el que dicho agente anti-espermatozoides es un anticuerpo anti-espermatozoides, o un fragmento del mismo, eficaz para evitar la motilidad de los espermatozoides, la fusión espermatozoide-óvulo o la penetración del espermatozoide en el óvulo, o una combinación de los mismos.
2. La bacteria modificada de la reivindicación 1, en la que dicho agente anti-espermatozoides es un fragmento de anticuerpo scFv anti-espermatozoides.
3. La bacteria modificada de la reivindicación 2, en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv anti-espermatozoides es humano o humanizado, en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv interactúa específicamente con el acrosoma o la membrana plasmática, en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv interactúa específicamente con la región del cuello del espermatozoide, en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv interactúa específicamente con un antígeno FA-1 de los espermatozoides o un fragmento del mismo, en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv interactúa específicamente con un péptido que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 2, en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv tiene una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 8 o en la que dicho fragmento de anticuerpo scFv está codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 7.
4. La bacteria modificada de la reivindicación 1, en la que dicha bacteria comensal es *L. jensenii*, *L. crispatus* o *L. caseii*.
5. Una composición que comprende la bacteria modificada de la reivindicación 1.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicha composición está en la forma de un supositorio, esponja, crema o espuma vaginal.
7. Uso de la composición de la reivindicación 5 en la anticoncepción femenina.
8. Uso de la composición de la reivindicación 5 en la reducción de la incidencia de embarazo en una población femenina o en la reducción de la incidencia de fertilización en una población femenina.
9. Un dispositivo insertable intravaginalmente que comprende la bacteria modificada de la reivindicación 1.
10. El dispositivo insertable intravaginalmente de la reivindicación 9, en la que dicho dispositivo es un anillo insertado intravaginalmente.

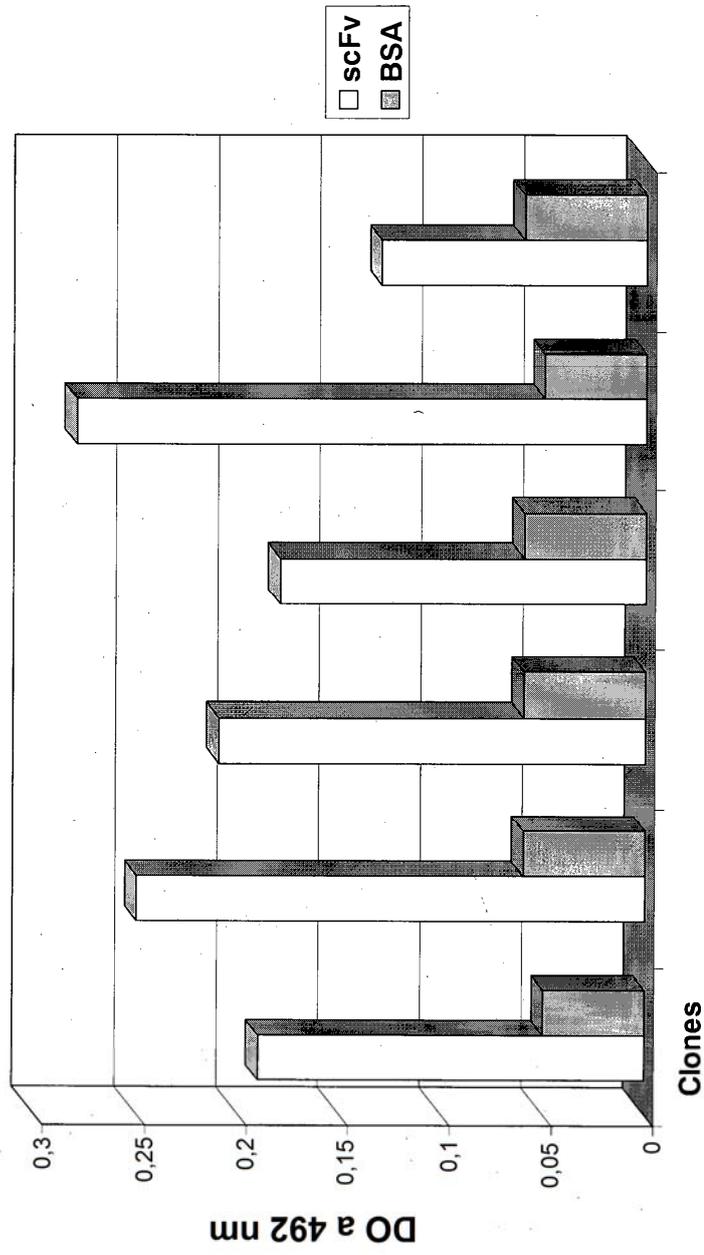


Figura 1

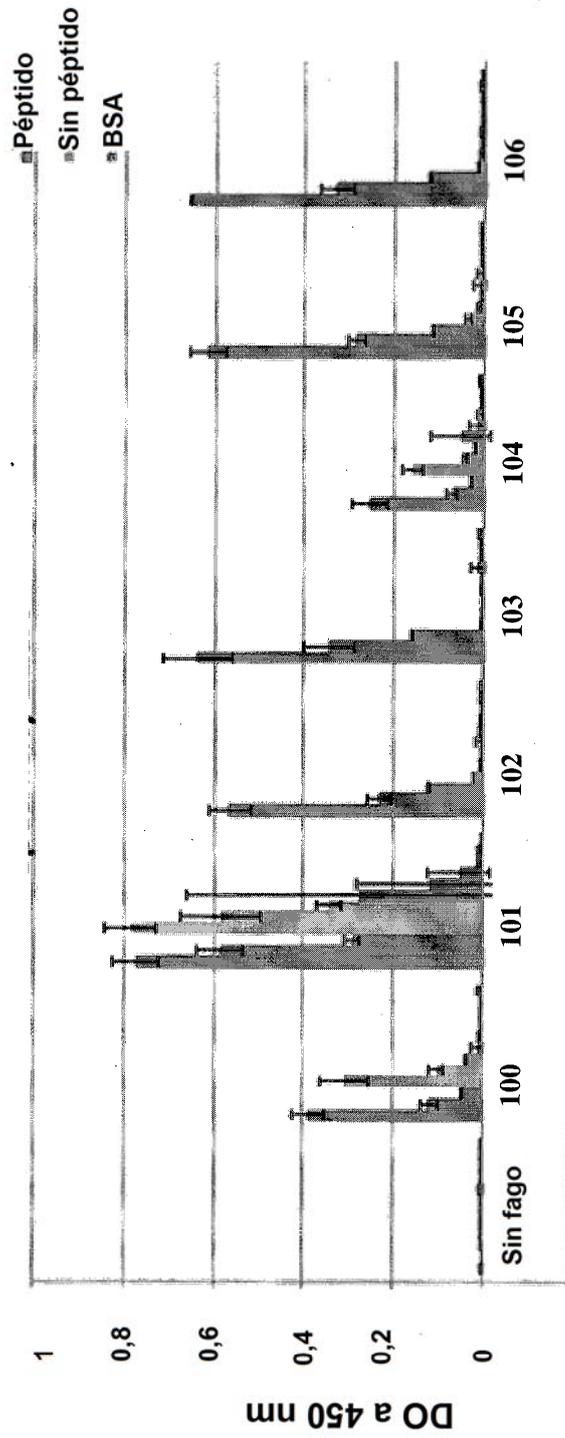


Figura 2

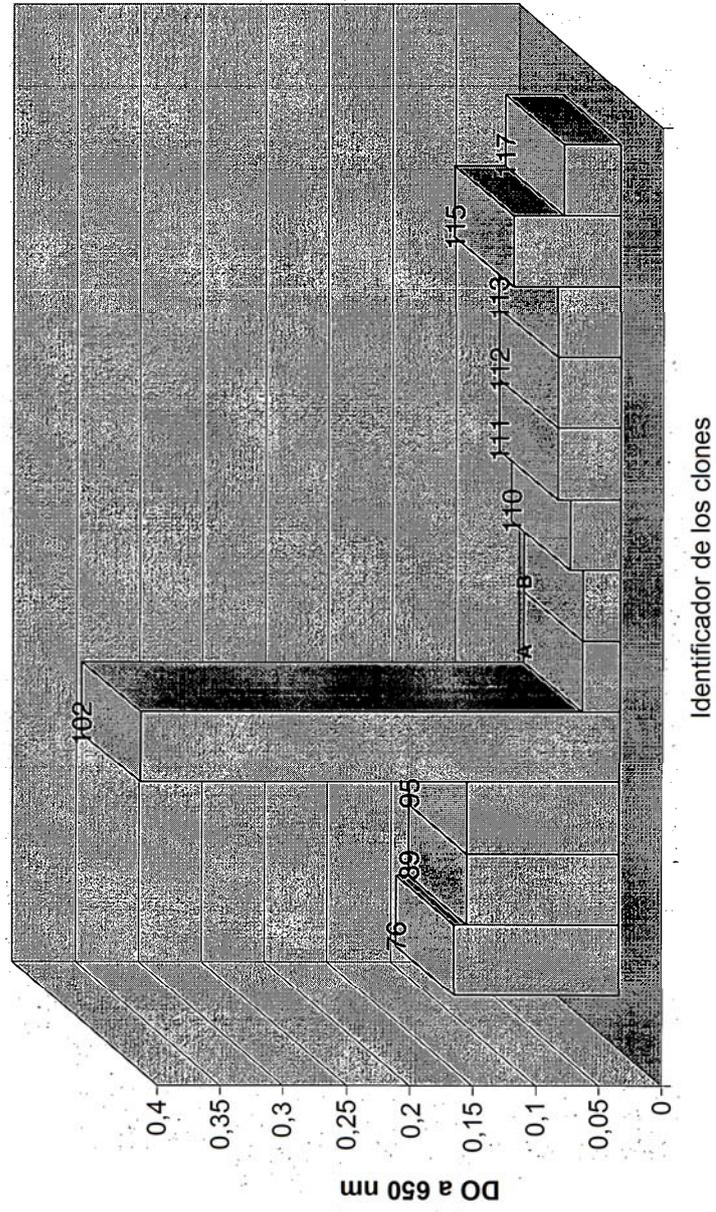


Figura 3

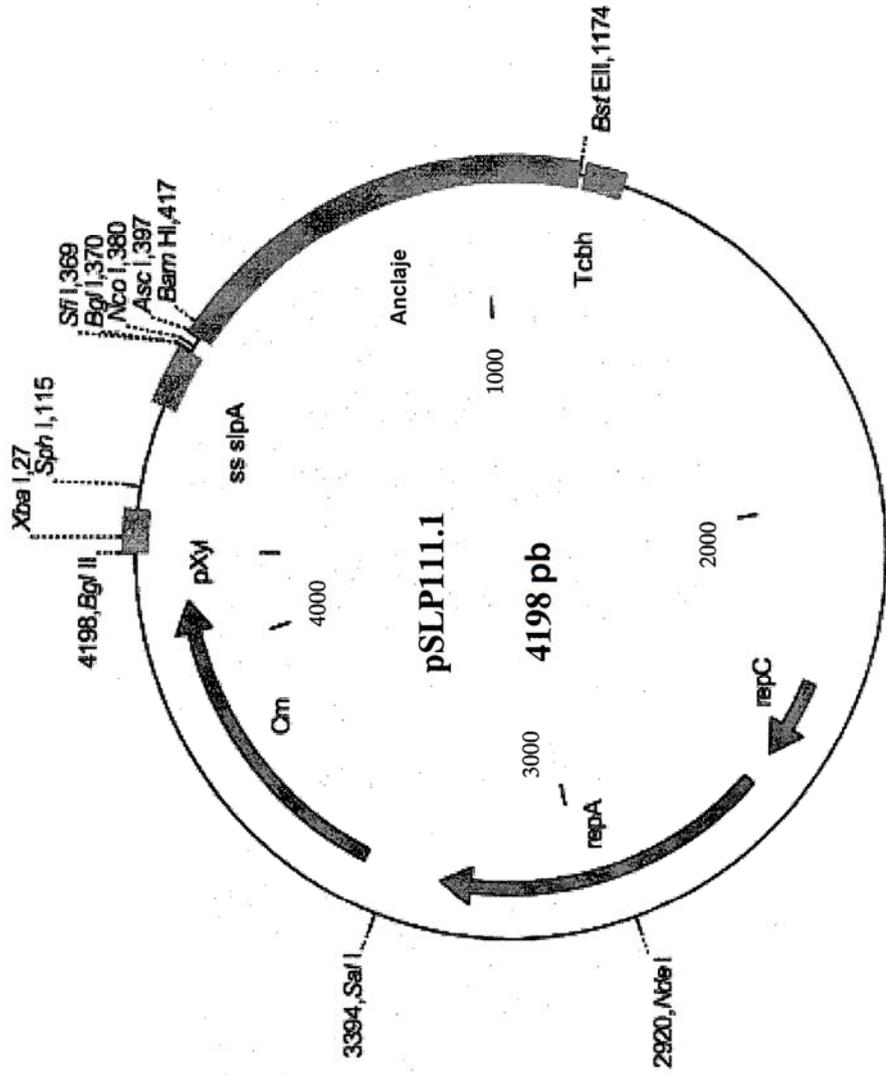
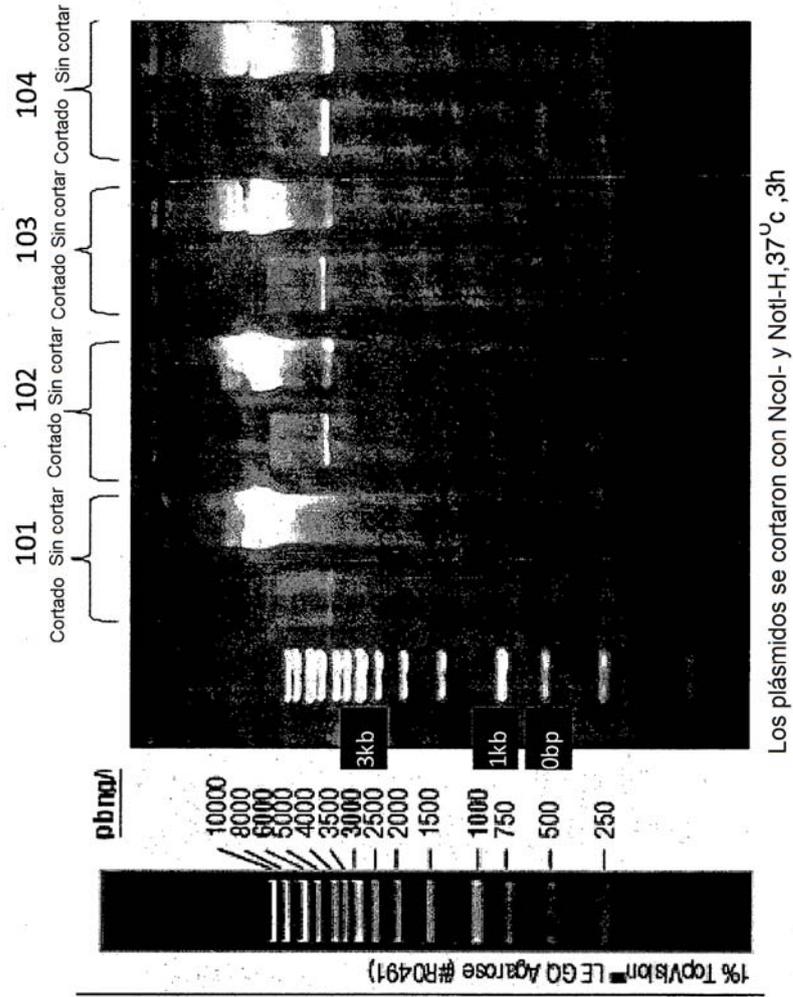


Figura 4A



Los plásmidos se cortaron con NcoI- y NotI-H, 37° c, 3h

Figura 4B

ES 2 671 345 T3

Marco directo 1:

```
1  M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L
1  ATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG

21  R L S C A A S G F T F S D H D M H W V R
61  AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCACTGACCACGACATGCACTGGGTCCGC

41  Q A P G K G L E W V S G I S W K S D S M
121 CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATCAGTTGGAAAAGTCACAGTATG

61  A Y R D S V K G R F T I S R D N S K N T
181 CCTATAGGGACTCTCTGAAGGGCCATTCCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACC

81  L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
241 CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTCCGAGA

101  D Q E H F D F D Y W G Q G T L V T V S S
301 GATCAGGAGCACTTCGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCTCA

121  G S A G G G S G G G S G G G S D I
361 GCCTCAGCAGGAGGAGGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGGCTCCGATATC

141  V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S C
421 GTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGCAGAGGGTCACCATCTCTGC

161  S G S S S N L G S N T V N W Y Q Q L P G
481 TCTGGAAGCAGCTCCAACCTCGGAAGTAATACTGTAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA

181  K A P K L L I Y D N N Q R P S G V P D R
541 AAAGCTCCCAAACCTCATTATGACAATAATCAACGACCCTCAGGGTCCCTGACCGG

201  F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E
601 TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTGCGGTCCGAG

221  D E A D Y Y C A A W D D S L S G L V F G
661 GATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGACTGGGCTGGTGTTCGGG

241  T G T K L T V L
721 ACCGGGACCAAACCTCACTGTGCTG
```

Figura 5A

VH **CDR1**
EVQLLESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTFS DHDMH WVRQAPGKGLEWVS
CDR2
GISWKSDSMAYRDSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
CDR3
DQEHDFDY WGQGLTVTVSS

V-Lambda **CDR1**
DIVLTOPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNLGSNTVN WYQQLPGKAPKLLIY
CDR2 **CDR3**
DNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYC AAWDDSLSGLV
FGTGTKLTVL

Figura 5B

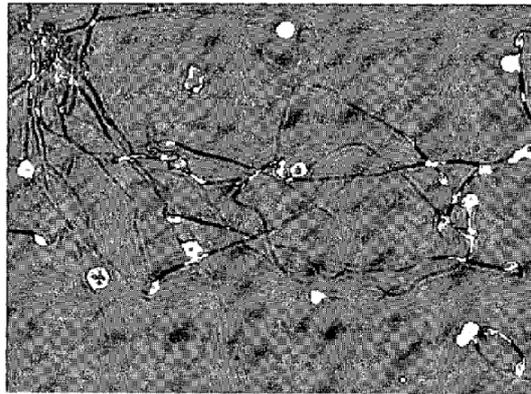


Figura 6A

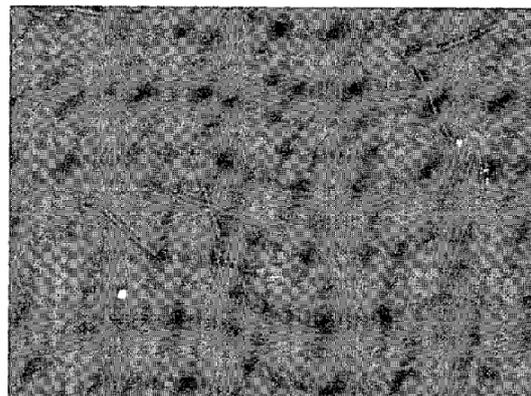


Figura 6B

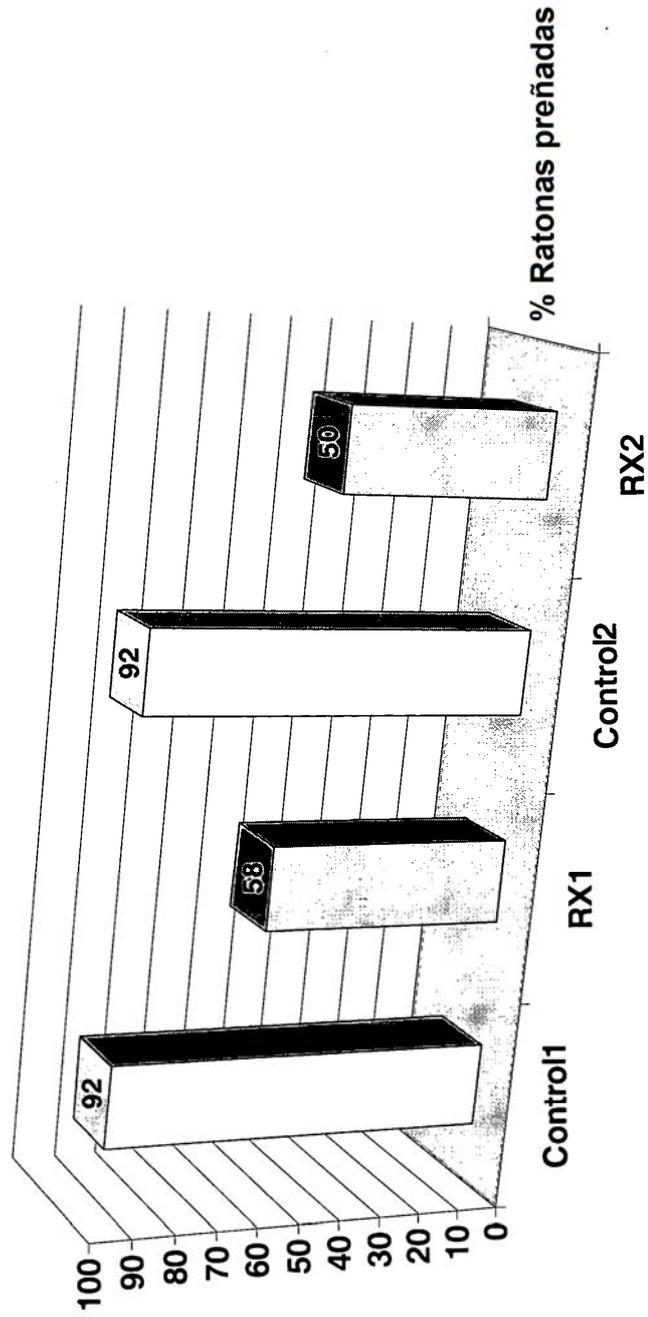


Figura 7A

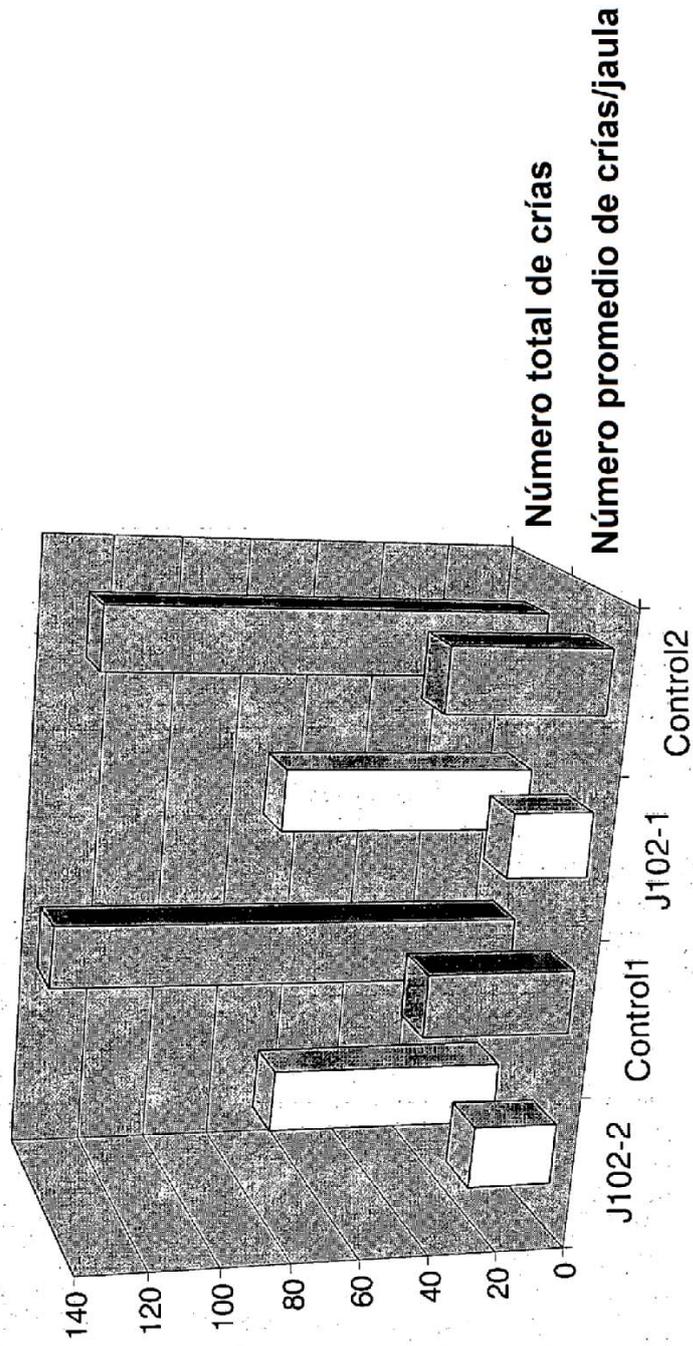


Figura 7B