

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 270**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12773253 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2758513**

54 Título: **Bacterias grampositivas modificadas y usos de éstas**

30 Prioridad:

23.09.2011 EP 11182643

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

18.07.2018

73 Titular/es:

**INTREXON ACTOBIOTICS NV (100.0%)
Industriepark Zwijnaarde 7 C building D
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**STEIDLER, LOTHAR;
VAN HUYNEM, KAROLIEN y
VANDENBROUCKE, KLAAS**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 676 270 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

Bacterias grampositivas modificadas y usos de éstas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a microorganismos, como bacterias grampositivas, con resistencia mejorada al estrés y características mejoradas de fabricación, procesamiento y almacenamiento. La invención en particular se refiere a bacterias grampositivas que acumulan trehalosa intracelular. La invención se refiere además al uso de estos microorganismos como un medicamento y un medicamento, aditivo alimenticio, composición probiótica, cultivo iniciador o producto alimenticio que comprende las bacterias grampositivas, y métodos para preparar estos productos.

Antecedentes de la invención

15 Las bacterias Grampositivas se clasifican colectivamente como teniendo una única membrana plasmática bicapa lipídica. Las bacterias grampositivas incluyen una multitud de géneros bacterianos bacilliformes y cocciformes, entre los que se encuentran las Bifidobacterias y un grupo de géneros conocidos colectivamente como bacterias del ácido láctico (LAB). Las LAB comprenden un clado de bacilos o cocos gramnegativos, bajos en GC, tolerantes a los ácidos, generalmente no esporulantes, que no respiran, que se asocian por sus características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas bacterias, que generalmente se encuentran en plantas (en descomposición) y productos lácteos, producen ácido láctico como el principal producto metabólico de la fermentación de carbohidratos. Este rasgo, a lo largo de la historia, ha vinculado LAB con fermentaciones de alimentos, ya que la acidificación inhibe el crecimiento de agentes de descomposición. Un prototipo LAB *Lactococcus lactis* es una bacteria de ácido láctico mesófila y microaerófila que fermenta. Mientras que la bacteria se usa ampliamente en fermentaciones alimenticias, especialmente en la industria láctea, hay un interés creciente por su uso en medicamentos y nutracéuticos, como medicamentos para tratar infecciones en cavidades corporales, como infecciones vaginales, o como transportador para la administración de moléculas activas biológicas. En todos esos casos, existe una necesidad de cultivos iniciadores altamente viables, o formulaciones farmacéuticas o nutracéuticas que comprendan una alta proporción de bacterias viables. *L. lactis*, sin embargo, tiende a perder viabilidad durante el almacenamiento, o durante el procesamiento (para la producción de una fórmula de polvo seco, la formación de comprimidos, etc.). La caída en la viabilidad es aún más pronunciada cuando la bacteria después de la liofilización se somete a un estrés adicional, como la alta acidez o la presencia de sales biliares.

Se han propuesto varios métodos para superar este problema. El uso de trehalosa es de particular interés. La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que se encuentra en una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta animales invertebrados. La trehalosa, a veces en combinación con dextrano, se usa a menudo como un crioprotector agregado externamente. Las funciones de trehalosa externamente agregadas como una matriz de sacáridos (Conrad *et al.*, 2000), y ejercen su efecto protector especialmente durante la liofilización, donde actúa como un formador de vidrio. Además, la trehalosa es bien reconocida como metabolito del estrés, y se ha estudiado ampliamente en hongos, especialmente en *Saccharomyces cerevisiae*. Las altas concentraciones de trehalosa interna mejoran la capacidad de almacenamiento y dan lugar a una mayor viabilidad con la criopreservación. Sin embargo, es importante señalar que trehalosa externamente agregada rara vez conduce a la acumulación interna de trehalosa en los microorganismos, ya sea porque no se absorbe o se metaboliza rápidamente después de la absorción.

45 Termont *et al.* (Appl Environ Microbiol 72: 7694; 2006) informaron que la trehalosa sintetizada de novo, a través de la expresión en exceso de plásmidos de *otsA* (trehalosa-6-fosfato sintasa) y *otsB* (trehalosa-6-fosfato fosfatasa) se acumula intracelularmente en *L. lactis*. La acumulación de trehalosa intracelular, pero no la trehalosa añadida exógenamente, protege a *L. lactis* de la lisis biliar y la muerte celular por liofilización. Como *L. lactis* es extremadamente sensible, la protección a la lisis biliar se puede utilizar como un excelente ensayo funcional de la acumulación intracelular de trehalosa.

50 Andersson *et al.* (J Biol Chem 276: 42707; 2001) han descrito una nueva ruta para la utilización de trehalosa en *L. lactis*. Esta vía emplea la actividad de trehalosa-6-fosfato fosforilasa (trePP), convirtiendo trehalosa-6-fosfato en β -glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato. Describen la inactivación por inserción de trePP en *L. lactis*, lo que resulta en la pérdida de capacidad para crecer en trehalosa.

55 Para la acumulación intracelular de trehalosa, Carvalho *et al.* (Appl Environ Microbiol 77: 4189; 2011) describen un método que hace uso de la sobreexpresión dirigida por plásmidos de *L. lactis* trePP y β -fosfoglucomutasa (p_gmB). Según lo indicado por estos autores, dado que las bacterias carecen de trehalosa 6-fosfato fosfatasa, el gen respectivo, *otsB*, del organismo de calidad alimentaria *P. freudenreichii* se utilizó para proporcionar la actividad requerida. Las células resultantes mostraron una resistencia mejorada al choque frío, al choque térmico y a la acidez. Sin embargo, los autores indicaron que al menos el 67% de la trehalosa producida se encontró en el medio de crecimiento. Por lo tanto, la trehalosa producida parece no retenerse o acumularse de manera eficiente intracelularmente.

65 Aunque estos procesos ciertamente conducen a una mejora en el almacenamiento, existe una necesidad adicional de métodos que puedan conducir a un almacenamiento mejorado de bacterias grampositivas, como LAB o Bifidobacteria, no solo en aquellos casos en los que la bacteria se utiliza para la administración, de compuestos biológicamente activos en aplicaciones médicas, sino también cuando la bacteria se usa en la industria alimentaria, como la industria láctea.

Lowes et al. 2006 (Oral Microbiol Immunol. 21 (1): 21-7) divulgan ciertos mutantes de la bacteria *Streptococcus mutans*, que denota como mutantes del componente IIC del sistema PTS (PtcC). *S. mutans* estudiado por Lowes es un patógeno causante de caries dental, y Lowes está finalmente interesado en investigar la variabilidad genómica de *S. mutans* en el contexto de su patogenicidad. La utilización de fuentes de carbohidrato beta-glucósido puede jugar un papel en la patogenicidad y la supervivencia de *S. mutans*, y PtcC se investiga desde esta perspectiva. Lowes no sugiere ningún papel de PtcC en la acumulación interna de trehalosa, ni en la mejora de la resistencia al estrés de las bacterias. Notablemente, Lowes et al. 2006 estudian el metabolismo de los beta-glucósidos, mientras que la trehalosa es un alfa-glucósido. Lowes no se refiere a mutantes de PtcC de bacterias no patógenas ni a ninguna utilidad de tales mutantes.

Resumen de la invención

La trehalosa intracelular puede proteger microorganismos tales como bacterias de ácido láctico (LAB), por ejemplo, células de *Lactococcus lactis*, de diversos agentes o condiciones perjudiciales. Los ejemplos son la lisis de ácidos biliares, experimentada por LAB vivos durante el tránsito intestinal, o el estrés por congelación y/o secado durante la congelación, secado, secado por pulverización, liofilización, como se usa para la preservación de LAB.

Solo hay un número limitado de enfoques disponibles que permiten la acumulación de trehalosa dentro de la célula. Estos hacen uso de la sobreexpresión dirigida por plásmidos de genes homólogos o heterólogos. Sin embargo, esta no es una configuración deseable para su uso en productos farmacéuticos o alimenticios.

Aquí se presenta un enfoque novedoso que permite la acumulación intracelular de trehalosa, basada simplemente en la ausencia de actividad del componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa (PtcC) en bacterias grampositivas, preferiblemente mediante la eliminación parcial o completa del gen que codifica PtcC endógeno, interrumpido o inactivado tal como ser incapaz de producir un producto funcional del gen PtcC. Los inventores han observado inesperadamente que con el tiempo la trehalosa acumulada se filtra en cierta medida fuera de las células a través de un puerto de salida de trehalosa no anticipado hasta ahora, por lo que la trehalosa puede detectarse en el sobrenadante. Sorprendentemente, descubrieron que la inactivación de PtcC evita la liberación de trehalosa. Estos hallazgos son aún más inesperados, porque PtcC hasta ahora nunca se ha asociado con el transporte de trehalosa, y no se ha sugerido como un puerto de salida de trehalosa responsable de la fuga de trehalosa y la liberación en el entorno. También sorprendentemente, los transportadores de trehalosa conocidos y caracterizados no parecen ser responsables de este mecanismo de fuga de trehalosa.

En un aspecto, la invención se refiere a una bacteria grampositiva, como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad del componente PTS sistema IIC específico para celobiosa (PtcC), en donde el gen que codifica PtcC endógeno ha sido parcial o completamente eliminado, interrumpido o inactivado tal como ser incapaz de producir un producto de gen de PtcC funcional, y en donde dicha bacteria grampositiva sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa.

Un aspecto adicional proporciona una bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa, para uso como medicamento. Dichos medicamentos pueden abarcar, por ejemplo, formulaciones farmacéuticas, nutracéuticos, alimentos médicos o alimentos funcionales, o probióticos.

En otro aspecto, la invención proporciona un medicamento, un cultivo iniciador, una composición probiótica o un aditivo alimenticio, más específicamente una composición probiótica no medicinal o un aditivo alimenticio, que comprende una bacteria grampositiva, tal como, en particular, una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa. Sin limitación, dicho aditivo alimenticio puede ser un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio. Por lo tanto, un aspecto relacionado proporciona un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende una bacteria grampositiva, como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC como medicamento, cultivo iniciador, probiótico y/o aditivo alimenticio, más específicamente como un cultivo iniciador no medicinal, probiótico o aditivo alimenticio. Sin limitación, dicho aditivo alimenticio puede ser un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio. Por lo tanto, un aspecto relacionado proporciona el uso de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC como cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, más particularmente en donde el producto alimenticio es un producto alimenticio no medicinal.

También se proporciona por un aspecto de la invención un método para preparar un producto alimenticio, que comprende mezclar una bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad PtcC, y que sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa, o dicho aditivo alimenticio o dicho cultivo iniciador con un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En realizaciones, dicho método puede comprender adicionalmente el paso de fermentar dicho material de sustrato. También se proporciona así un producto alimenticio que se puede obtener por cualquier método de este tipo. Un producto alimenticio puede abarcar sin limitación probióticos.

Otro aspecto proporciona un método para preparar un medicamento, tal como una formulación farmacéutica, nutracéutica, alimento médico o alimento funcional o probiótico, o para preparar una composición probiótica o aditivo alimenticio, más específicamente una composición probiótica no medicinal o aditivo alimenticio, o para preparar un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende los pasos de: i) propagar una bacteria grampositiva, tal como, en particular, una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa, en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, y ii) formular la bacteria grampositiva propagada, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, en, respectivamente, la composición de medicamento o probiótico o aditivo alimenticio o el cultivo iniciador. Por lo tanto, también está cubierto un medicamento, tal como formulación farmacéutica o nutracéutica, alimento médico o alimento funcional o probiótico, una composición probiótica o aditivo alimenticio, más específicamente una composición probiótica no medicinal o aditivo alimenticio, o un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende la dicha bacteria grampositiva.

Los inventores han encontrado que las bacterias grampositivas, tales como en particular las bacterias grampositivas no patógenas, tales como LAB o Bifidobacteria, como se describe en la presente memoria no solo son capaces de acumulación intracelular de trehalosa, incluso independiente de la fuente de carbono, sino también que las bacterias grampositivas muestran una resistencia mucho mayor a diversas condiciones asociadas con el estrés y el almacenamiento. Por ejemplo, las bacterias grampositivas son más resistentes a las manipulaciones asociadas al almacenamiento, tales como el secado, la congelación, el secado por pulverización o secado por congelación (liofilización). Las bacterias grampositivas también muestran una mayor supervivencia, independientemente de la alimentación o el estado de ayuno, en el sistema gastrointestinal, lo que indica una resistencia mejorada a la acidez y la lisis biliar. El desempeño de las bacterias grampositivas como se describe en la presente memoria ya sea en un entorno medicinal o en la industria alimenticia, es más reproducible que lo conocido previamente. Por lo tanto, las bacterias grampositivas que incorporan los principios de la invención proporcionan una mayor resistencia al medio ambiente y a la biorresistencia.

Se describe aquí un método para acumular internamente trehalosa en una bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que comprende propagar una bacteria gram positiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC, preferiblemente en la que el gen que codifica PtcC endógeno se ha eliminado parcial o completamente, interrumpido o inactivado tal como siendo incapaz de producir un producto del gen de PtcC funcional, en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria grampositiva.

También se describe aquí un método para mejorar la resistencia al estrés o las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento de una bacteria grampositiva, como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que comprende modificar la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como para carecer de actividad PtcC. Preferiblemente, las características de resistencia al estrés o fabricación, procesamiento y/o almacenamiento pueden ser una o más seleccionadas del grupo que comprende resistencia a las condiciones ácidas, resistencia a las sales biliares, resistencia al calor, resistencia a la sal, resistencia al secado, congelación, pulverización, secado o liofilización, y resistencia osmótica.

Preferiblemente, en la bacteria grampositiva mencionada anteriormente, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC, el gen que codifica PtcC endógeno se ha eliminado parcial o completamente, interrumpido o inactivado tal como ser incapaz de producir producto del gen de PtcC funcional. Se apreciará que dicha delección, interrupción o inactivación puede dirigirse, por ejemplo, a la secuencia codificante del gen PtcC y/o al promotor a partir del cual se expresa PtcC.

En realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carecen de actividad de PtcC y que sobreexpresan uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa, como se divulgó o empleo aquí, pueden carecer de actividad de trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP). Preferiblemente, en tal bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o

Bifidobacterium, que también carece de actividad de TrePP, el gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado parcial o completamente, interrumpido o inactivado tal como ser incapaz de producir producto genético de TrePP funcional. Se apreciará que dicha eliminación, interrupción o inactivación puede dirigirse, por ejemplo, a la secuencia codificante del gen trePP y/o al promotor a partir del cual se expresa trePP. Los inventores han encontrado sorprendentemente que la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de TrePP, acumula adicionalmente trehalosa intracelularmente. En contraste con el presente enfoque, los trabajos previos (documento WO 2006/018446) enseñaron a expresar la trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga tal como otsB para lograr la acumulación de trehalosa. Carvalho et al. 2011 (supra) incluso se le instruyó sobreexpresar TrePP para obtener la acumulación intracelular de trehalosa. Además, aunque LAB como *Lactococcus lactis* puede ser capaz de utilizar trehalosa, hasta ahora no se ha descrito ninguna cepa de *Lactococcus lactis* sintetizadora de trehalosa. No se han identificado genes trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa endógenos, que se creía que eran un requisito previo para la producción de trehalosa a partir de glucosa-6-fosfato, un metabolito presente en *L. lactis*.

En realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carecen de actividad PtcC como se describe o emplea aquí, pueden sobreexpresar uno o más transportadores de trehalosa, preferiblemente transportadores de trehalosa endógena, tales como uno o más genes del sistema fosfotransferasa comprendidos en el operón trehalosa. Los inventores han encontrado sorprendentemente que dicha sobreexpresión, en contraste con la expresión inducida por trehalosa nativa, aumenta adicionalmente la capacidad de la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, para acumular y/o retener la trehalosa intracelular.

En realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carecen de actividad de PtcC y que sobreexpresa uno o más genes que que codifican uno o más transportadores de trehalosa, como se emplea aquí, contienen trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional. Los inventores se han dado cuenta de que la expresión heteróloga de trehalosa 6-fosfato fosfatasa aumenta aún más la acumulación de trehalosa. En realizaciones preferidas, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa es otsB, preferiblemente otsB de *E. coli*.

Para recapitular, en algunas realizaciones la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalos, como se divulga o emplea aquí, puede mostrar adicionalmente cualquiera, cualquiera dos o las tres de las siguientes características: (a) la bacteria grampositiva contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional; (b) la bacteria grampositiva carece de actividad TrePP. En realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva puede desplegar la característica (b), o más preferiblemente puede adicionalmente desplegar las características (a) y (b).

En realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se divulga o emplea en la presente, puede contener adicionalmente uno o más productos génicos heterólogos. En algunas realizaciones preferidas, particularmente en las que la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, está destinada a un uso medicinal, tal producto (s) de gen puede ser producto (s) genético (s) o antígeno (s) profiláctico y/o terapéutico.

En ciertas realizaciones, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, o medicamento o aditivo alimenticio o cultivo iniciador o composición probiótica como se divulga o emplea aquí, puede secarse, secarse por aspersión, congelarse o secarse por congelación (liofilizarse). Por consiguiente, en algunas realizaciones, cualquiera de los métodos antes mencionados para preparar un medicamento, o para preparar un aditivo alimenticio, o para preparar un cultivo iniciador, o para preparar composiciones probióticas, o para acumular internamente trehalosa en una bacteria grampositiva, tal como en particular, una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, o para mejorar la resistencia al estrés o las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento de una bacteria grampositiva, como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, pueden comprender además secado, secado por pulverización, congelación o secado por congelación (liofilización) de la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, medicamento, aditivo alimenticio, composición probiótica o cultivo iniciador.

En ciertas realizaciones del método antes mencionado para preparar un medicamento, o para preparar un aditivo alimenticio, o para preparar un cultivo iniciador, o en ciertas realizaciones del método mencionado anteriormente para acumular internamente trehalosa en la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, el medio de cultivo puede comprender maltosa o glucosa o una combinación de maltosa y glucosa, como fuente de carbono, preferiblemente como fuente de carbono principal o incluso única. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo sustancialmente no contiene trehalosa añadida externamente (exógenamente). Los inventores han encontrado sorprendentemente que la bacteria grampositiva,

tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se divulga aquí, han adquirido la capacidad de utilizar fuentes de carbono tales como maltosa o glucosa para acumular trehalosa dentro de las células. De acuerdo con esto, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, y preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención se puede cultivar ventajosamente en, por ejemplo, maltosa como única fuente de carbono, que es más barato que la trehalosa, pero acumulará trehalosa intracelular. Sin embargo, debe apreciarse que, en ciertas realizaciones, el medio de cultivo puede contener trehalosa añadida externamente (exógenamente).

En ciertas realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, como se pretende en la presente memoria descriptiva, puede ser una bacteria de ácido láctico (LAB), más preferiblemente una bacteria de *Lactococcus sp.* o un *Lactobacillus sp.*

En ciertas otras realizaciones preferidas, la bacteria grampositiva, tal como en particular una bacteria grampositiva no patógena, como se pretende en la presente memoria descriptiva, puede ser una bacteria de Bifidobacterium sp.

Los aspectos anteriores y adicionales y las realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas. El objeto de las reivindicaciones adjuntas se incorpora específicamente en esta especificación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: la acumulación de trehalosa intracelular es posible después de la inactivación de trePP, siguiendo la expresión de otsB o una combinación de los mismos.

Figura 2: La acumulación de trehalosa exógena en células de *L. lactis* proporciona protección frente a la lisis biliar. (A) supervivencia; y (B) contenido de trehalosa

Figura 3: Acumulación y estabilidad de la trehalosa intracelular. (A) liberación de trehalosa a lo largo del tiempo; y (B) aumento de trehalosa en el sobrenadante

Figura 4: acumulación y liberación de trehalosa en diversas cepas descritas en la Tabla 2. Las cepas se suplementaron con trehalosa 100 mM (A) o 500 mM (B).

Figura 5: La inactivación de PtcC previene (en sales M9, panel A) o retrasos (en 0.5% de oxgal, panel B) la liberación de trehalosa intracelular.

Figura 6: La acumulación de trehalosa exógena en células de *L. lactis* proporciona protección frente a la lisis biliar. (A) liberación de trehalosa intracelular a lo largo del tiempo; y (B) supervivencia a lo largo del tiempo en 0.5% de oxgal

Figura 7: las cepas trePP KO (tanto PtcC wt como PtcC KO) son capaces de convertir glucosa o maltosa en trehalosa intracelular

Figura 8: Mayor supervivencia durante el tránsito intestinal a través del intestino porcino, tanto cuando los cerdos estaban en ayunas durante 24 horas (A) como durante la disponibilidad de alimento *ad libitum* (B).

Figura 9: acumulación de trehalosa después de la producción de biomasa.

Figura 10: Estimulación de la acumulación de trehalosa intracelular por maltosa.

Figura 11: Conversión de maltosa en trehalosa intracelular durante o después de la producción de biomasa.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen tanto referencias en singular como plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos “que comprende”, “comprende” y “comprendido por” como se usan en este documento son sinónimos de “incluir”, “incluye” o “que contiene”, “contiene”, y son inclusivos o abiertos y no excluyen, miembros, elementos o pasos de método adicionales, no citadas. Se apreciará que los términos “que comprende”, “comprende” o “comprendido por” tal como se utilizan en la presente memoria comprenden los términos “que consiste en”, “consiste” y “consiste en”, así como los términos “que consisten esencialmente en”, “Consiste esencialmente” y “consiste esencialmente en”.

La cita de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones subsumidos dentro de los rangos respectivos, así como los puntos finales enumerados.

El término “aproximado” o “aproximadamente” como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de +/- 20% o menos, preferiblemente +/-10% o menos, más preferiblemente +/- 5% o menos, y aún más preferiblemente +/- 1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para realizar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador “aproximado” o “aproximadamente” también se divulga en sí mismo específicamente, y preferiblemente.

Mientras que los términos “uno o más” o “al menos uno”, como uno o más o al menos un miembro (s) de un grupo de miembros, es claro *per se*, mediante una mayor ejemplificación, el término abarca, entre otras cosas una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a cualquiera de dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera de ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 etc. de dichos miembros, y hasta todos los dichos miembros.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Por medio de una guía adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención.

En los siguientes pasajes, diferentes aspectos de la invención se definen con más detalle. Cada aspecto así definido se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a “una realización” o “una realización” significa que una característica, estructura o característica particular descrita en conexión con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases “en una realización” o “en una realización” en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no necesariamente se refieren a la misma realización, pero pueden serlo. Además, las características, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada, como sería evidente para una persona experta en la técnica a partir de esta divulgación, en una o más realizaciones. Además, aunque algunas realizaciones descritas en este documento incluyen algunas, pero no otras características incluidas en otras realizaciones, se entiende que las combinaciones de características de diferentes realizaciones están dentro del alcance de la invención, y forman diferentes realizaciones, como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las realizaciones reivindicadas se puede usar en cualquier combinación.

En la siguiente descripción detallada de la invención, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma, y en los que se muestran a modo de ilustración únicamente realizaciones específicas en las que se puede poner en práctica la invención. Debe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones y pueden realizarse cambios estructurales o lógicos sin apartarse del alcance de la presente invención. La siguiente descripción detallada, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitativo, y el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante incluyen Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (“Ausubel et al., 1992”); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. General principles of microbiology are set forth, for example, in Davis, B. D. et al., Microbiology, 3rd edition, Harper & Row, publishers, Philadelphia, Pa. (1980).

Los inventores han descubierto que la trehalosa en cierta medida se filtra desde las células a través de un puerto de salida de trehalosa hasta ahora no identificado o no anticipado y puede recuperarse en el sobrenadante. Sorprendentemente, los inventores encontraron que la interrupción de PtcC evita la liberación de trehalosa.

Aquí se divulga una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa (PtcC) y que sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa.

En un aspecto, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, se usa como medicamento, es decir, para uso en el tratamiento. Un aspecto adicional proporciona un medicamento que comprende una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresan uno o más genes que codifican uno más transportadores de trehalosa. Se divulga también el uso de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC para la fabricación de un medicamento. Tal medicamento puede proporcionarse, por ejemplo, como una formulación farmacéutica, nutracéutica, probiótica, alimentación médica o funcional.

Otro aspecto proporciona el uso de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC como probiótico o aditivo alimenticio, más específicamente como un probiótico no medicinal o aditivo alimenticio. Un aspecto relacionado proporciona el uso de una bacteria grampositiva,

preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC como cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, más particularmente en donde el producto alimenticio es un producto alimenticio no medicinal, que comprende dicha bacteria grampositiva.

5 Un aspecto adicional proporciona así un probiótico o aditivo alimenticio, más específicamente un probiótico o aditivo alimenticio no medicinal, que comprende una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresan uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa. Un aspecto relacionado proporciona un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, más particularmente en donde el producto alimenticio es un producto alimenticio no medicinal, dicho cultivo iniciador comprende una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y que sobreexpresan uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa.

15 Como se usa en el presente documento, el término “bacteria grampositiva” tiene su significado común conocido en la técnica. Por medio de orientación adicional, una bacteria grampositiva se puede identificar mediante tinción de Gram como retención de tinción de cristal violeta.

20 En una realización preferida, la bacteria grampositiva de acuerdo con la invención no es patógena en el sentido de que no causa daño o no conduce a efectos perjudiciales cuando se administra a un sujeto deseado.

25 Como se usa en este documento, el término “bacteria de ácido láctico” de “LAB” se refiere a una bacteria grampositiva que no es patógena en el sentido de que no causa daño o no conduce a efectos perjudiciales cuando se administra a un sujeto pretendido, y que preferiblemente pertenece a los géneros bacterianos de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Más preferiblemente, el LAB puede ser una especie de *Lactococcus*, tal como, pero sin limitación, a *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*, y cualquier subespecie y cepa del mismo. Más preferiblemente, las especies de *Lactococcus* pueden ser *Lactococcus lactis*, y cualquier subespecie y cepa del mismo, tal como sin limitación *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. hordniae*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. bv. diacetyllactis*. Más preferiblemente, el *Lactococcus lactis* puede ser *Lactococcus lactis ssp. cremoris* o *Lactococcus lactis ssp. lactis*, más preferiblemente *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, y abarca cualquier cepa del mismo, tal como, por ejemplo, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* SK11, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363, o *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. También preferiblemente, el LAB puede ser un *Enterococcus* sp., Preferiblemente *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y cualquier subespecie y cepa del mismo, tal como, sin limitación, la cepa LMG15709 de *Enterococcus faecium*.

35 Bifidobacterium es un género de bacterias anaerobias grampositivas, no móviles, a menudo ramificadas. Las bifidobacterias como se usan en el presente documento pueden incluir *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. suis*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum*. Preferiblemente, la Bifidobacterium es *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*. Debe entenderse que todas las subespecies y cepas de Bifidobacteria también están incluidas.

45 El “componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa” o “PtcC” o “PtcC” como se usa en el presente documento se refiere a un componente del sistema fosfotransferasa. El sistema de fosfotransferasas participa en la catalización de la transferencia del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato a los sustratos de azúcar entrantes concomitantes con su translocación a través de la membrana celular. PtcC es el componente transmembrana de un sistema PTS específico para celobiosa. Hasta ahora, PtcC no ha estado implicado en el transporte de trehalosa, y mucho menos está involucrado en la pérdida de trehalosa de bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. Por medio de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico y proteína de PtcC de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363 está representada por SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente (correspondientes a los números de acceso de Genbank NC_009004.1 (región 430271-431608) y YP_001031790.1, respectivamente). En una realización, el PtcC como se usa en el presente documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 8.

55 En una realización adicional, el PtcC como se usa en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, como por ejemplo al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idénticos. En otra realización, el PtcC como se usa en el presente documento codifica una proteína que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 8, tal como, por ejemplo, al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntico. Se describe que, el PtcC como se usa en este documento se refiere a un gen que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es al menos 55% idéntica a SEQ ID NO: 7, tal como por ejemplo al menos 60%, 65%, 70% o más % idéntico. Alternativamente, el PtcC puede relacionarse con una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que es al menos un 45% idéntica a SEQ ID NO: 8, tal como por ejemplo al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o más % idénticos. También se describe que el PtcC como se usa en este documento codifica una proteína que es al menos un 45% idéntica a la SEQ ID NO: 8, tal como, por ejemplo, al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o más % idéntico. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican una proteína

PtcC funcional. En otra realización, el PtcC como se usa en este documento es un ortólogo de LAB de las SEQ ID NOs: 7 y 8. Preferiblemente, pero sin limitación, las identidades de secuencia individualizadas en este párrafo pueden aplicarse particularmente cuando la bacteria grampositiva es bacteria de ácido láctico (LAB), más preferiblemente un *Lactococcus* sp., Incluso más preferiblemente *Lactococcus lactis*.

Por medio de un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico y proteína de PtcC de *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 está representada por, respectivamente, los números de acceso de Genbank NC_014638.1 (región 2033198..2034538, complemento) y YP_003971775.1; de *Bifidobacterium longum subsp. longum* KACC 91563 por, respectivamente, los números de acceso Genbank NC_017221.1 (región 2316679..2317218) y YP_005588251.1; y de *Bifidobacterium breve* UCC2003 por, respectivamente, los números de acceso de Genbank CP000303.1 (región 2379064..2380443, complemento) y ABE96554.1.

En una realización adicional, el PtcC como se usa en la presente memoria se refiere a un gen o proteína que tiene una secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es idéntica al menos en un 75%, como por ejemplo al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95 % o más % idénticos, a la secuencia de ácido nucleico o proteína de PtcC de *Bifidobacterium bifidum* PRL2010, o *Bifidobacterium longum subsp. longum* KACC 91563, o *Bifidobacterium breve* UCC2003, como se define bajo los números de acceso Genbank arriba indicados, respectivamente. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican una proteína PtcC funcional. En otra realización, el PtcC como se usa en este documento es un ortólogo de Bifidobacterium de PtcC de dicha especie de Bifidobacterium. Preferiblemente, pero sin limitación, las identidades de secuencia individualizadas en este párrafo pueden aplicarse particularmente cuando la bacteria grampositiva es una Bifidobacterium.

Como será evidente para un experto, las secuencias del componente IIC del sistema pTS de muchas otras bacterias grampositivas se pueden recuperar fácilmente de la base de datos Genbank Nucleotide, por ejemplo, consultando la base de datos con la cadena de búsqueda "PTS system IIC component" o análogamente opcional en combinación con el género (por ejemplo., "*Lactococcus*", "*Lactobacillus*", "*Leuconostoc*", "*Enterococcus*", "*Bifidobacterium*", etc.) o especies (por ejemplo., "*Lactococcus lactis*", "*Lactococcus garvieae*", "*Lactococcus piscium*", "*Lactococcus plantarum*", "*Lactococcus raffinolactis*", "*Enterococcus faecalis*", "*Enterococcus faecium*", "*Bifidobacterium adolescentis*", "*Bifidobacterium bifidum*", "*Bifidobacterium breve*", "*Bifidobacterium lactis*", etc.) nombre de la bacteria grampositiva deseada, o mediante la consulta de las secuencias del genoma anotado completo de tales bacterias con la cadena "componente IIC del sistema PTS" o análoga. Cuando no (todavía) se incluyen en bases de datos públicas, tales secuencias pueden identificarse fácilmente mediante técnicas rutinarias de biología molecular basadas en la homología de secuencia.

Los métodos para comparar secuencias y determinar la identidad de secuencia son bien conocidos en la técnica. Por medio de un ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia se refiere a un porcentaje de ácidos nucleicos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias después del alineamiento de estas secuencias. Las alineaciones y los porcentajes de identidad se pueden realizar y calcular con diversos programas y algoritmos diferentes conocidos en la técnica. Los algoritmos de alineación preferidos incluyen BLAST (Altschul, 1990, disponible por ejemplo en el sitio web de NCBI) y Clustal (revisado en Chenna, 2003, disponible por ejemplo en el sitio web de EBI). Preferiblemente, BLAST se usa para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias, tal como el algoritmo de "secuencias Blast 2" descrito por Tatusova y Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250), por ejemplo, usando la configuración predeterminada publicada u otra configuración adecuada (como, por ejemplo, para el algoritmo BLASTN: coste para abrir un espacio = 5, coste para extender un espacio = 2, penalización para una no coincidencia = -2, recompensa para una coincidencia = 1, espacio x disminuir = 50, valor de expectativa = 10.0, tamaño de palabra = 28; o para el algoritmo BLASTP: matriz = Blosum62, coste para abrir un espacio = 11, coste para extender un espacio = 1, valor de expectativa = 10.0, tamaño de palabra = 3).

La actividad de PtcC puede, por ejemplo, determinarse indirectamente por medio de secuenciación de genes. De esta forma, pueden identificarse fácilmente deleciones parciales o completas, interrupciones o mutaciones inactivantes.

Como se usa en el presente documento, el término "que carece de actividad de PtcC" significa que no está presente o sustancialmente ninguna actividad de PtcC. Por medio de orientación adicional, la actividad de PtcC es menos del 20% de la actividad de PtcC de bacterias grampositivas de tipo silvestre, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. Por ejemplo, la actividad de PtcC es inferior al 15%, preferiblemente inferior al 10%, más preferiblemente inferior al 5%, incluso más preferiblemente inferior al 1% de la actividad de PtcC tipo silvestre. Como se indicó anteriormente, más preferiblemente, la actividad de PtcC es indetectable o está ausente de forma sustancial o completa.

Como se usa en el presente documento, el término "medicamento" también abarca los términos "fármaco", "terapéutico" y otros términos que se usan en el campo de la medicina para indicar una preparación con efecto terapéutico o profiláctico.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, tal como se usan en la presente memoria también incluyen la mejora o eliminación de una enfermedad o afección desarrollada una vez que se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de dicha enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, estos términos también abarcan, dependiendo de la condición del paciente, prevenir la aparición de una enfermedad o afección o de

5 síntomas asociados con una enfermedad o afección, incluida la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección o síntomas asociados con ella antes de la afección con dicha enfermedad o condición. Dicha prevención o reducción antes de la afección se refiere a la administración del compuesto o composición de la invención a un paciente que no está en el momento de la administración afectado por la enfermedad o afección. La “prevención” también abarca la prevención de la recurrencia o la prevención de recaídas de una enfermedad o afección o de los síntomas asociados a la misma, por ejemplo, después de un período de mejora.

10 Tal como se usa en el presente documento, los “nutracéuticos” generalmente abarcan alimentos o productos alimenticios que proporcionan beneficios médicos y de salud. Los nutracéuticos son comestibles y pueden ser consumidos directamente por humanos, pero preferiblemente se proporcionan a los humanos en forma de aditivos o suplementos nutricionales, por ejemplo, en forma de tabletas del tipo que se venden en tiendas naturistas, o como ingredientes en sólidos comestibles, más preferiblemente productos alimenticios procesados tales como cereales, panes, tofu, galletas, helados, pasteles, papas fritas, galletas saladas, queso, etc., y en líquidos bebibles, por ejemplo, bebidas tales como leche, gaseosas, bebidas deportivas y jugos de frutas. Los procesos especialmente preferidos para producir nutracéuticos implican solo disolventes derivados naturalmente. Los nutracéuticos pueden contener preferiblemente niveles relativamente altos de sustancias potenciadoras de la salud. Los nutracéuticos pueden entremezclarse entre sí para aumentar sus efectos potenciadores de la salud.

20 A diferencia de los nutracéuticos, los llamados “alimentos médicos” no están destinados a ser utilizados por el público en general y no están disponibles en tiendas o supermercados. Los alimentos médicos no son aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta saludable para disminuir el riesgo de enfermedades, como los alimentos bajos en grasa o bajos en sodio, ni tampoco son productos para perder peso. Un médico prescribe un alimento médico cuando un paciente tiene necesidades nutricionales especiales para controlar una enfermedad o estado de salud, y el paciente está bajo la atención continua del médico. La etiqueta indica que el producto está destinado a ser utilizado para manejar un trastorno o condición médica específica. Un ejemplo de un alimento médico es un alimento médico nutricionalmente diverso diseñado para proporcionar apoyo nutricional específico para pacientes con afecciones inflamatorias crónicas. Los compuestos activos de este producto son, por ejemplo, uno o más de los compuestos descritos en este documento. Los alimentos funcionales pueden incluir aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta saludable para disminuir el riesgo de enfermedades, como alimentos bajos en grasa o bajos en sodio, o productos para perder peso.

30 Como se usa en el presente documento, el término “probióticos” se refiere a bacterias que ayudan a mantener el equilibrio natural de microorganismos (microflora) en la cámara intestinal. Además, el tracto digestivo humano normal contiene bacterias probióticas que reducen el crecimiento de bacterias dañinas y promueven un sistema digestivo saludable. El grupo más grande de bacterias probióticas en el intestino es LAB. Como se usa en el presente documento, una “composición probiótica” es una composición, preferiblemente una composición comestible, que comprende un probiótico. El término “composición probiótica” como se usa en el presente documento se puede usar indistintamente con “suplemento dietético”. La composición probiótica tal como se define en la presente memoria puede usarse como complemento de alimentos y bebidas, y como formulaciones farmacéuticas para aplicación enteral o parenteral que pueden ser formulaciones sólidas tales como cápsulas o comprimidos, o formulaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones. Dichas formulaciones pueden incluir, sin limitación, bebidas (p. Actimel®, Yakult®, DanActive®...), yogures de beber, yogur, queso fresco, crema, crema agria, etc. Por lo tanto, debe apreciarse que un probiótico o composición probiótica puede ser para aplicaciones medicinales o no medicinales.

45 El término “cultivo inicial” se refiere a una cultura microbiológica que en realidad realiza la fermentación. Estos iniciadores generalmente consisten en un medio de cultivo, como granos, semillas o líquidos nutritivos que han sido bien colonizados por los microorganismos utilizados para la fermentación. Como se usa en el presente documento, el término cultivo iniciador preferiblemente se refiere a un cultivo iniciador de alta densidad. Por consiguiente, un cultivo iniciador puede referirse a una composición que comprende microorganismos vivos que son capaces de iniciar o efectuar la fermentación de material orgánico, opcionalmente después de cultivarse en un medio iniciador separado para obtener un cultivo de alta densidad. Alternativamente, el cultivo iniciador puede secarse, secarse por aspersión, congelarse o liofilizarse.

50 Como se indicó anteriormente, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la ausencia de trePP aumenta la acumulación intracelular de trehalosa en bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En contraste con esto, se ha pensado previamente que la presencia de una trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga y/o una trehalosa 6-fosfato sintasa heteróloga, tal como otsB y otsA, respectivamente, es esencial para la acumulación intracelular de trehalosa.

60 Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en la presente memoria, que carece de actividad de trehalosa 6-fosfato fosforilasa y que sobreexpresan uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa.

65 Como se usa en este documento, el término “trehalosa 6-fosfato fosforilasa”, “trePP”, o “TrePP” se refiere a una enzima que fosforila trehalosa 6-fosfato, preferiblemente una enzima que cataliza la reacción, preferiblemente la reacción reversible, de α , α -trehalosa-6-fosfato con fosfato para producir glucosa-6-fosfato y β -D-glucosa-1-fosfato, o *viceversa*. Los sinónimos de trePP son, por ejemplo, trehalosa-6-fosfato: fosfato β -D-glucosiltransferasa y α , α -trehalosa-6-fosfato: fosfato β -D-glucosiltransferasa. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico y proteína de trePP de *Lactococcus lactis*

ssp. cremoris MG1363 está representada por SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente (correspondientes a los números de acceso Genbank NC-009004.1 (región 449195-451504) y YP_001031805.1, respectivamente). En una realización, el trePP como se usa en el presente documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2. En una realización adicional, el trePP como se usa en la presente memoria se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente, como por ejemplo al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idénticos. En otra realización, el trePP como se usa en este documento codifica una proteína que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 2, tal como, por ejemplo, al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican una proteína trePP funcional. En otra realización, el trePP como se usa en este documento es una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*, ortólogo de SEQ ID NOs: 1 y 2.

La actividad de trePP puede medirse directa o indirectamente. Una forma de determinar indirectamente la actividad es por medio de la secuencia genética. De esta forma, pueden identificarse fácilmente deleciones parciales o completas, interrupciones o mutaciones inactivantes. Una forma directa de determinar la actividad puede basarse, por ejemplo, en ensayos con extractos celulares en los que se mide el consumo de sustrato o la formación del producto de reacción (por ejemplo, el sustrato trehalosa 6-fosfato o los productos de reacción glucosa-6-fosfato y β -D-glucosa-1-fosfato), posiblemente combinado con un etiquetado metabólico previo. El sustrato y los productos también se pueden determinar fácilmente, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC), como se describe, por ejemplo, en Andersson et al., 2001 (supra). Como se usa en el presente documento, el término "que carece de actividad de TrePP" significa que no está presente o sustancialmente no hay actividad de TrePP. Por medio de orientación adicional, la actividad de TrePP es menos del 20% de la actividad de TrePP de la bacteria grampositiva de tipo silvestre, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*. Por ejemplo, la actividad de TrePP es menor que 15%, preferiblemente menor que 10%, más preferiblemente menor que 5%, incluso más preferiblemente menor que 1% de la actividad de TrePP de tipo silvestre: Como se indicó anteriormente, lo más preferible es que la actividad de TrePP sea indetectable o sustancialmente o completamente ausente.

Los inventores han encontrado que la presencia de trehalosa 6-fosfato sintasa heteróloga y/o trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga puede aumentar adicionalmente la acumulación intracelular de trehalosa. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*, como se describe en la presente memoria, que contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional. En una realización adicional, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*, como se describe en este documento, contiene una trehalosa 6-fosfato sintasa funcional heteróloga. En otra realización más, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*, como se describe en la presente memoria, contiene una trehalosa 6-fosfato sintetasa heteróloga funcional heteróloga y contiene una trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional. En una realización preferida, la trehalosa 6-fosfato sintasa es *otsA*, preferiblemente *otsA* de *E. coli*. En otra realización preferida, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa es *otsB*, preferiblemente *otsB* de *E. coli*.

Particularmente preferido es una integración genómica de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa y/o sintasa, en donde la integración es preferiblemente como se describe en las solicitudes de patente europeas con los números de solicitud 11168495.7 y 11173588.2. Estas solicitudes se refieren a sistemas de expresión dobles de cistrón. La posición preferida de trehalosa 6-fosfato fosfatasa, preferiblemente *otsB*, y/o trehalosa 6-fosfato sintasa, preferiblemente *otsA* como se usa aquí, es como un segundo cistrón detrás del gen endógeno *usp45*.

Como se usa en este documento, el término "contiene" preferiblemente se refiere a bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*, que expresan un producto génico particular, es decir, se produce una proteína funcional o activa en dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria del ácido láctico (LAB) o *Bifidobacterium*.

Como se usa en el presente documento, el término "trehalosa 6-fosfato fosfatasa" se refiere a una enzima que defosforila trehalosa 6-fosfato, preferiblemente una enzima que cataliza la reacción de trehalosa-6-fosfato para producir fosfato y trehalosa. Trehalosa 6-fosfato fosfatasa pertenece a la familia de Hidrolasas monoéster fosfóricas. Los sinónimos de trehalosa 6-fosfato fosfatasa son, por ejemplo, α , α -trehalosa-6-fosfato fosfohidrolasa, trehalosa-6-fosfato fosfohidrolasa y trehalosa 6-fosfatasa. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico y proteína de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa de *E. coli* (es decir, *otsB*) está representada por las SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente (correspondientes a los números de acceso de Genbank X69160.1 (posiciones de nucleótidos). 675-1475) y P31678.2, respectivamente). En una realización, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se usa en el presente documento se refiere a un gen o proteína que tiene el ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 4. En una realización adicional, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se usa en la presente memoria se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es al menos un 75% idéntica a las SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente, como por ejemplo al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se usa en este documento codifica una proteína que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 4, tal como por ejemplo al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntico. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a, o codifican, una proteína de trehalosa 6-fosfato fosfatasa funcional. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se usa en el presente documento es una

bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, ortólogo de SEQ ID NOs: 3 y 4.

Como se usa en este documento, el término "trehalosa 6-fosfato sintasa" se refiere a una enzima que defosforila trehalosa 6-fosfato, preferiblemente una enzima que cataliza la reacción de glucosa 6-fosfato con UDP-glucosa para producir trehalosa 6-fosfato. La trehalosa 6-fosfato sintasa pertenece a la familia de las glicosiltransferasas. Los sinónimos de trehalosa 6-fosfato sintasa son, por ejemplo, trehalosa fosfato-uridina difosfato glucosiltransferasa, fosfotrehalosa-uridina difosfato transglucosilasa, uridina difosfoglucosa fosfato glucosiltransferasa y α , α -trehalosa-6-fosfato sintasa. A modo de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico y proteína de la trehalosa 6-fosfato sintasa de *E. coli* (es decir, *otsA*) está representada por las SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente (correspondientes a los números de acceso de Genbank X69160.1 (posiciones de nucleótidos 1450). -2874) y P31677.3, respectivamente). En una realización, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se usa en el presente documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 6. En una realización adicional, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se usa en la presente memoria se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente, como por ejemplo al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idénticos. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se usa en el presente documento codifica una proteína que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 6, tal como por ejemplo al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntico. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a, o codifican, una proteína trehalosa 6-fosfato sintasa funcional. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se usa en este documento es una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, ortólogo de SEQ ID NOs: 5 y 6.

La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad de PtcC y/o TrePP y que contiene opcionalmente genes heterólogos o productos génicos, tales como trehalosa 6-fosfato sintasa o fosfatasa o genes profilácticos y/o terapéuticos heterólogos o los productos génicos de acuerdo con la invención pueden obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica, ya sea usando metodología de biología molecular u obtenido mediante selección de alto rendimiento de variantes naturales o variantes obtenidas a partir de mutagénesis aleatoria química o de irradiación. (El cribado de alto rendimiento para trePP KO puede realizarse mediante un método que utiliza la ausencia de crecimiento en trehalosa de la cepa defectuosa trePP o mediante secuenciación de alto rendimiento y análisis bioinformático de ortólogos trePP u otros métodos). (para antecedentes relacionados con técnicas recombinantes y manipulación genética de LAB véase, por ejemplo, "Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria", eds. Gasson & de Vos, Blackie Academic & Professional, 1994 y "Genetics of Lactic Acid Bacteria", eds. Wood y Warner, Springer, 2003). En una realización, en la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención, el gen que codifica PtcC endógeno y/o TrePP y/o los promotores de los cuales trePP y/o se expresan PtcC se han eliminado parcial o completamente, interrumpido o inactivado tal como ser incapaz de producir productos de gen de PtcC y/o trePP funcionales. Las técnicas para la disrupción génica son generalmente conocidas en la técnica. Por medio de un ejemplo, el gen de la PtcC y/o trePP endógeno se puede inactivar mediante la eliminación completa o parcial de la región codificante (inactivado) o, alternativamente la eliminación completa o parcial o la mutagénesis de la región promotora. Alternativamente, el gen de PtcC y/o trePP puede inactivarse insercionalmente (inactivar-in), interrumpiendo así la secuencia de codificación endógena. Por ejemplo, pueden introducirse codones de parada prematuros o mutaciones de desplazamiento de marco. El gen de la PtcC y/o trePP también puede mutagenizarse mediante la introducción de una o más mutaciones con cambio de sentido o sin sentido, siempre que ya no se pueda producir ninguna o sustancialmente ninguna proteína funcional de PtcC y/o TrePP, es decir, la actividad de PtcC y/o trePP está (sustancialmente) ausente. Debe entenderse que las mutaciones espontáneas también están cubiertas.

Los inventores han encontrado además que la sobreexpresión de uno o más transportadores de trehalosa aumenta adicionalmente la acumulación y/o retención de trehalosa intracelular en bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí, que sobreexpresa, preferiblemente sobreexpresa constitutivamente, uno o más genes que codifican un transportador de trehalosa. En una realización preferida, dichos transportadores de trehalosa son transportadores de trehalosa endógenos de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En una realización preferida adicional, los transportadores de trehalosa son transportadores de trehalosa endógenos localizados en el operón de trehalosa de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En otra realización más, los transportadores de trehalosa son transportadores de trehalosa endógenos del sistema de fosfotransferasas (PTS) localizados dentro del operón de trehalosa de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En una realización preferida, la sobreexpresión de uno o más transportadores de trehalosa como se describe en la presente memoria se lleva a cabo mediante la inserción de un promotor 5' en uno o más transportadores de manera que el promotor se une operativamente a la (s) secuencia (s) transportadora (s). Unido operativamente se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia promotora "operativamente ligada" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia promotora. En una realización, dicho promotor es un promotor fuerte. En una realización adicional, dicho promotor es un promotor constitutivo. En otra realización más, dicho promotor es una bacteria grampositiva endógena, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o un promotor de Bifidobacterium. Los promotores adecuados pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento WO 2008/084115, que se incorpora aquí en

su totalidad. En particular, los promotores enumerados en la Tabla 12 del documento WO 2008/084115 son particularmente adecuados para sobreexpresar los transportadores como se describe en este documento. Más preferiblemente, el promotor es PhIIA (es decir, el promotor de la proteína de unión a ADN de tipo HU). Por consiguiente, en una realización preferida, el promotor de PhIIA se inserta corriente arriba de las regiones codificantes del transportador o los transportadores de trehalosa endógenos localizados en el operón de trehalosa de una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En una realización, el promotor PhIIA tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13, correspondiente al promotor PhIIA de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363. En otra realización, el promotor PhIIA tiene una secuencia que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 13, tal como al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a la SEQ ID NO: 13. En una realización adicional, la PhIIA es una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, ortóloga de SEQ ID NO: 13.

Por medio de un ejemplo, los transportadores de trehalosa mencionados en este documento están representados por *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* el ácido nucleico de MG1363 y la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente (correspondientes a los números de acceso de Genbank NC_009004.1 (región 446937-447422) y YP_001031803.1, respectivamente), y/o SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente (correspondientes a los números de acceso Genbank NC_009004.1 (región 447563-449128) y YP_001031804.1, respectivamente). En una realización, el o los transportadores sobreexpresados como se usan en la presente memoria se refieren a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de SEQ ID NOs: 9 y 10, respectivamente, y/o SEQ ID NOs: 11 y 12, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 12. En una realización adicional, el o los transportadores sobreexpresados como se usan en la presente memoria se refieren a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es idéntica al menos en un 75% a las SEQ ID NOs: 9 y 10, respectivamente, y/o SEQ ID NOs: 11 y 12, respectivamente, tales como, por ejemplo, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idénticos. En otra realización, el o los transportadores sobreexpresados tal como se usan en la presente memoria codifican una proteína que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 10 y/o la SEQ ID NO: 12, tal como, por ejemplo, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idénticos. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican (a) proteína (s) transportadora (s) que sobreexpresa (n) de manera funcional, que sobreexpresan constitutivamente de manera preferida. En otra realización, el(los) transportador(es) sobreexpresado(s) (constitutivamente) como se usa en la presente memoria es(son) una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, ortólogo(s) de SEQ ID NOs: 9 y 10 y/o SEQ ID NOs: 11 y 12.

La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en la presente memoria muestra una tolerancia incrementada a diversos ofensas o estrés ambientales y de almacenamiento, tales como un mayor secado, secado por pulverización, congelación o resistencia a la liofilización, así como una mayor resistencia a las duras condiciones en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, ácidos y sales biliares). La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención, por lo tanto, es particularmente adecuada para ser administrada a un sujeto mientras que muestra una tasa de supervivencia aumentada en el tracto gastrointestinal. Estas bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, por lo tanto, también se pueden aplicar para administrar proteínas a un sujeto. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en la presente memoria, que contiene uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos y/o antígeno. La administración de polipéptidos biológicamente activos se ha descrito, por ejemplo, en los documentos WO 97/14806, WO 00/23471, WO 01/02570, WO 02/090551, WO 2005/111194, WO 2007/025977, WO 2007/063075, WO 2007/128757, WO 2008/071751, WO 2008/090223, WO 2004/046346 y WO 2010/034844. Preferiblemente, los genes heterólogos como se describen en este documento están integrados en el genoma bacteriano. Una estrategia de integración particularmente preferida se describe en las solicitudes de patentes europeas con los números de solicitud 11168495.7 y 11173588.2. En particular, los genes heterólogos se pueden insertar policistricamente (por ejemplo, bi-, tri- o multiscistricamente) como un segundo gen (o adicional) en un locus nativo (endógeno), preferiblemente un operón. De esta forma, el gen heterólogo se expresa bajo el control de un promotor nativo (endógeno).

Como se usa en este documento, el término "antígeno" generalmente se refiere a una sustancia que evoca una respuesta inmune, que incluye inmunidad humoral y/o respuesta de inmunidad celular, y que es capaz de unirse a un producto, por ejemplo, un anticuerpo o una célula T de la respuesta inmune. Un antígeno como se pretende en la presente memoria puede ser, en una alternativa, tal que induzca inmunotolerancia, por ejemplo, puede ser un autoantígeno (que incluye auto y aloantígenos) o puede ser un alérgeno. Por lo tanto, en un ejemplo preferido, un antígeno requiere un sistema inmune funcional de un sujeto al que se administra para provocar una respuesta fisiológica de dicho sujeto. El "antígeno" como se pretende aquí también abarca "autoantígenos" que no provocan una respuesta inmune en un individuo sano, pero lo haría en una persona que padece una enfermedad autoinmune, es decir, la falla de un organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (por debajo de los niveles submoleculares) como "auto", que da como resultado una respuesta inmune contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que resulte de una respuesta inmune tan aberrante se denomina enfermedad autoinmune. De acuerdo con esto, el "antígeno" como se pretende aquí también abarca una proteína (fisiológicamente activa) que no provocaría una respuesta inmune en un individuo sano, sino que lo haría en una persona genéticamente deficiente en dicha proteína. Además, el "antígeno" tal como se pretende aquí también abarca un alérgeno que no provocaría una respuesta inmune en un individuo sano, pero lo haría en una persona que padece una enfermedad alérgica.

Un antígeno como se pretende en la presente memoria puede derivarse de cualquier polipéptido al que una respuesta inmune en un sujeto humano o animal sea terapéuticamente útil, por ejemplo, de un patógeno, por ejemplo, de un patógeno viral, procariótico (por ejemplo, bacteriano) o eucariótico, de una proteína no fisiológica (por ejemplo, una proteína derivada de tejido canceroso), de alérgeno (por ejemplo, para provocar tolerancia inmune), etc. Un antígeno también podría ser un metabolito de una proteína. Como ejemplo, el antígeno podría ser un polisacárido, un lípido u otro. Los promotores fuertes como se describen aquí podrían dirigir la expresión de las enzimas necesarias para sintetizar o ensamblar dicho polisacárido, lípido u otro.

El término "un producto genético o terapéutico profiláctico", polipéptido o proteína se refiere generalmente a un péptido, polipéptido o proteína que, en un sujeto humano o animal al que se administra, no provoca una respuesta inmune contra sí mismo (es decir, no vacunogénico) y puede lograr un efecto profiláctico y/o terapéutico. Por lo tanto, se esperaría que el efecto profiláctico y/o terapéutico de dicho péptido, polipéptido o proteína esté directamente relacionado con su propia función biológica natural por lo que puede lograr efectos particulares en un cuerpo de un sujeto; en lugar de producir un efecto profiláctico y/o terapéutico al actuar como un antígeno inmunogénico y/o inmunoprotector en el sujeto. Por lo tanto, el péptido, polipéptido o proteína profilácticamente y/o terapéuticamente activo no vacunogénico debería ser biológicamente activo en su forma expresada o, al menos, debe convertirse en la forma biológicamente activa una vez liberado de la célula huésped que expresa. Preferiblemente, dicha forma biológicamente activa de dicho péptido, polipéptido o proteína puede mostrar una conformación secundaria y preferiblemente también terciaria que es la misma o muy similar a su configuración nativa.

Preferiblemente, el producto, polipéptido o proteína del gen profiláctico y/o terapéutico también es no tóxico y no patógeno. En una realización preferida, el producto, polipéptido o proteína del gen profiláctico y/o terapéutico puede derivar de un ser humano o animal, y preferiblemente puede corresponder al mismo taxón que el sujeto humano o animal al que se va a administrar.

Ejemplos no limitativos de productos de genes, polipéptidos o proteínas genéticos adecuados y/o terapéuticamente adecuados incluyen los que son capaces de funcionar local o sistémicamente, por ejemplo, son capaces de ejercer actividades endocrinas que afectan el metabolismo local o de todo el cuerpo y/o son capaces de regular las actividades de las células que pertenecen al sistema inmunohepatopoyético y/o son capaces de afectar la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de una variedad de células normales o neoplásicas en el cuerpo o que afectan la regulación inmune o la inducción de respuestas inflamatorias de fase aguda a la lesión e infección y/o son capaces de potenciar o inducir resistencia a la infección de células y tejidos mediados por quimiocinas que actúan sobre sus receptores de células diana, o la proliferación de células epiteliales o la promoción de curación de heridas y/o es/son capaces de modular la expresión o producción de sustancias por las células del cuerpo. Los ejemplos específicos de tales péptidos, polipéptidos y proteínas incluyen, sin limitación, insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroide, somatostatina, hormona estimulante de la tiroides, polipéptido intestinal vasoactivo, citoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, cualquiera de IL-14 a IL-32, en particular IL-27, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN, EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL, la familia de citoquinas TNF, por ejemplo, ligandos TNF α , TNF α , CD40, CD27 o FAS, Familia de citoquinas IL-1, familia de factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento transformantes y factores de crecimiento nervioso, la familia de citoquinas relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico, las citoquinas relacionadas con la insulina, etc. Alternativamente, el polipéptido profiláctico y/o terapéuticamente activo puede ser un receptor o antagonista para los polipéptidos profilácticamente y/o terapéuticamente activos como se definió anteriormente. Alternativamente, el polipéptido profiláctico y/o terapéuticamente activo puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo neutralizante, o sus equivalentes. Se enumeran ejemplos específicos adicionales de tales polipéptidos adecuados, por ejemplo, en el documento WO 96/11277, página 14, líneas 1-30, incorporadas aquí como referencia; en WO 97/14806, página 12, línea 1 a página 13, línea 27; o la patente de los EE. UU. No. 5,559,007, col. 8, línea 31 a col. 9, línea 9. En un ejemplo, dicho péptido, polipéptido o proteína profilácticamente y/o terapéuticamente activo no vacunogénico puede ser IL-10, más preferiblemente hIL-10, péptido-1 similar a glucagón (GLP-1), más preferiblemente hGLP-1, péptido-2 similar a glucagón (GLP-2), más preferiblemente hGLP-2, factores trébol (TFF, por ejemplo, TFF1, 2 y/o 3), o PYY, más preferiblemente hPYY.

Como se menciona, en realizaciones el polipéptido profiláctico y/o terapéuticamente activo puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo neutralizante, o sus equivalentes. El anticuerpo como se describe en este documento puede ser un anticuerpo de tamaño completo o un fragmento funcional del mismo tal como Fab, una proteína de fusión o una proteína multimérica. En una realización preferida, el uno o más genes heterólogos codifican un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional. Como se usa en este documento, el término "funcional" se refiere a un fragmento de anticuerpo, que aún puede ejercer su función prevista, es decir, unión a antígeno. El término anticuerpo, como se usa aquí, incluye, pero no se limita a anticuerpos convencionales, anticuerpos quiméricos, dAb, anticuerpo biespecífico, anticuerpo triespecífico, anticuerpo multispecífico, anticuerpo bivalente, anticuerpo trivalente, anticuerpo multivalente, VHH, nanocuerpo, Fab, Fab', F (ab')₂ scFv, Fv, dAb, Fd, diacuerpo, triacuerpo, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo de dominio simple, dominio variable de anticuerpo simple.

En el presente contexto, el término "anticuerpo" se usa para describir una inmunoglobulina ya sea natural o parcial o totalmente modificada por ingeniería. Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier molécula de unión específica o sustancia que tiene un dominio de unión con

la especificidad de unión requerida para el otro miembro del par de moléculas, es decir, la molécula objetivo como se define supra. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, así como anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos bifuncionales, anticuerpos bivalentes, VHH, nanoanticuerpos, Fab, Fab', F (ab')₂, scFv, Fv, dAb, Fd, diacuerpos, triacuerpos y anticuerpos de camélidos, que incluyen cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o completa o parcialmente modificado por ingeniería. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión a anticuerpo, por ejemplo, que imite un anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotípicas, que incluyen IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4), IgA, IgD, IgM e IgE. La persona en la técnica apreciará así que la presente invención también se refiere a fragmentos de anticuerpos, que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como VHH, nanocuerpos Fab, scFv, Fv, dAb, Fd, diacuerpos y triacuerpos. En una realización, la invención se refiere a una bacteria grampositiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en la presente memoria, en la que un gen exógeno codifica la cadena ligera (V_L) de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, y otro gen exógeno codifica cadena pesada (V_H) del anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, más preferiblemente en donde el fragmento funcional es Fab. En una realización, el gen exógeno que codifica V_L o su fragmento funcional se acopla transcripcionalmente al extremo 3' del gen exógeno que codifica V_H o fragmento funcional del mismo.

En una realización, el anticuerpo (neutralizante) como se describe en este documento bloquea, inhibe o neutraliza, al menos parcial o totalmente, una actividad biológica de una molécula diana, tal como una citoquina o quimioquina o una toxina. Como se usa en el presente documento, la expresión "neutraliza" o "neutralización" significa la inhibición o reducción de una actividad biológica de una citoquina o toxina medida in vivo o in vitro, mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, detallado en los ejemplos. En particular, la inhibición o reducción se puede medir determinando la puntuación colítica o determinando la molécula diana en un tejido o muestra de sangre. Como se usa en este documento, la expresión "neutraliza" o "neutralización" significa la inhibición o reducción de una actividad biológica de una citoquina o toxina medida in vivo o in vitro, en al menos 10% o más, preferiblemente en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y aún más preferiblemente en 100%.

Preferiblemente, dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo inhibe el efecto biológico de las citoquinas elegidas de la lista de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12 (o sus subunidades IL-12p35 e IL12p40), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23 (o su subunidad IL-23p19), IL-27, IL-32 (y sus variantes de empalme), IFN (α, β, γ) y TNFα. Alternativamente, estas citoquinas pueden ser inhibidas por moléculas de unión que no son anticuerpos. Preferiblemente, dichas moléculas de unión son receptores de citoquinas solubles tales como gp130, o se unen a los receptores de dichas citoquinas, por ejemplo, IL-2R (CD25, CD122, CD132), IL-12R (beta1, beta2), IL15R, IL-17R, IL-23R o IL-6R, sin desencadenar una señal inflamatoria. Preferiblemente, dichas moléculas de unión son quimioquinas neutralizantes elegidas de la lista de MIF, MIP-1α, MCP-1, RANTES y Eotaxina. Preferiblemente, dichas moléculas de unión resuelven el bloqueo de la activación inmune mediante la unión a moléculas coestimulantes de la lista de CD3/CD28, HVEM, B7.1/B7.2, CD40/CD40L (CD154), ICOS/ICOSL, OX40/X40L, CD27/CD27L (CD70), CD30/CD30L (CD153) y 41BB/41BBL. Preferiblemente, dichas moléculas de unión resuelven el bloqueo de la inflamación mediante la unión a moléculas de adhesión de la lista I-CAM1, integrina α4 e integrina α4β7. Preferiblemente, dichas moléculas de unión tienen un efecto coestimulante y agonista sobre CD3, CTLA4 y/o PD1. Preferiblemente, dichas moléculas de unión son células T neutralizantes o actividad de células B al dirigirse a CD25, CD20, CD52, CD95, BAFF, APRIL y/o IgE. Preferiblemente, dichas moléculas de unión resuelven el bloqueo de la inflamación mediante la unión a enzimas de la familia MMP. Preferiblemente, dichas moléculas de unión afirman un efecto antiangiogénico, tal como la neutralización de la actividad de αvβ3/α5β1 e IL-8. En una realización preferida adicional, dicha molécula de unión o anticuerpo (o fragmento funcional) es capaz de neutralizar el efecto biológico de TNFα, IL-12, IFNγ, IL-23 o IL-17.

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos o moléculas de unión que pueden usarse como genes heterólogos en la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí incluyen:

- un anticuerpo anti-TNFα, fragmento de anticuerpo anti-TNFα, dominio variable de anticuerpo único anti-TNFα, receptor de TNF soluble o variante negativa dominante de TNFα;
- anticuerpo anti-IL-12, fragmento de anticuerpo anti-IL-12, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12, receptor de IL-12 soluble, variante negativa dominante de IL-12 o dAb de IL-12;
- anticuerpo anti-IL-12p35, fragmento de anticuerpo anti-IL-12p35, dominio variable de anticuerpo individual anti-IL-12p35, receptor soluble de IL-12p35, variante negativa dominante de IL-12p35 o dAb de IL-12p35;
- anticuerpo anti-IL-12p40, fragmento de anticuerpo anti-IL-12p40, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12p40, receptor de IL-12p40 soluble, variante negativa dominante de IL-12p40 o dAb de IL-12p40;
- anticuerpo anti-IL-23, fragmento de anticuerpo anti-IL-23, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-23, receptor de IL-23 soluble, variante negativa dominante de IL-23 o dAb de IL-23;

-anticuerpo anti-IL-23p19, fragmento de anticuerpo anti-IL-23p19, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-23p19, receptor soluble de IL-23p19, variante negativa dominante de IL-23p19 o dAb de IL-23p19;

5 - un anticuerpo anti-IFN γ , fragmento de anticuerpo anti-IFN γ , dominio variable de anticuerpo único anti-IFN γ , receptor de IFN γ soluble o variante negativa dominante de IFN γ ;

- anticuerpo anti-IL-17, fragmento de anticuerpo anti-IL-17, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-17, receptor de IL-17 soluble, variante negativa dominante de IL-17 o dAb de IL-17; y

10 - anticuerpo anti-MCP-1, fragmento de anticuerpo anti-MCP-1, dominio variable de anticuerpo único anti-MCP-1, receptor de IL-17 soluble, variante negativa dominante de MCP-1 o dAb de MCP-1.

15 En una realización preferida, dicho anticuerpo es un fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno). Los fragmentos Fab son bien conocidos en la técnica. Por medio de orientación adicional, un fragmento Fab es una región en un anticuerpo que se une a antígenos. Está compuesto por un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera.

20 En una realización, el Fab es cA2 anti-TNF Fab (del cual las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas del dominio variable de la cadena pesada y la cadena ligera se divulgan en el documento US No. 6,790,444 como SEQ ID NO: 4 y 5 (cadena pesada) y SEQ ID NO: 2 y 3 (cadena ligera), respectivamente) o CDP870 Fab anti-TNF (cuyas secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de la cadena pesada y la cadena ligera se divulgan en el documento WO 01/94585 como SEQ ID NO: 114 y 115 (cadena pesada) y SEQ ID NO: 112 y 113 (cadena ligera), respectivamente).

25 El experto en la materia apreciará que los anticuerpos, como los fragmentos funcionales de anticuerpos, y en particular los fragmentos Fab, están compuestos por diferentes polipéptidos individuales que pueden unirse covalentemente mediante puentes disulfuro. En particular, la cadena pesada y la cadena ligera están codificadas por secuencias de codificación individuales separadas.

30 Por consiguiente, en una realización, el gen heterólogo divulgado en la presente memoria codifica un antígeno y/o un anticuerpo (neutralizante) o fragmento funcional o variante del mismo y/o un péptido, polipéptido o proteína profiláctica y/o terapéuticamente activa, en donde dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmune, preferiblemente respuesta inmune protectora o respuesta de tolerancia inmune, en un sujeto humano o animal, y/o dicho producto, polipéptido o proteína del gen profiláctico y/o terapéutico es capaz de producir un efecto profiláctico y/o terapéutico en un sujeto humano o animal.

35 En una realización, la invención se refiere a bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, o la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, para uso como se describe aquí que son formuladas para el almacenamiento. En una realización, la invención se refiere a una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en la presente memoria, que se congelan, se secan, se liofilizan, se secan por pulverización o se almacenan en medio.

40 Como se explicó anteriormente, la invención también se refiere a una composición que comprende la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí o que comprende la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, para uso como se describe aquí. Dicha composición puede ser una composición farmacéutica. En una realización adicional, la invención se refiere a una composición o una composición farmacéutica para uso en tratamiento o para uso como medicamento, un producto nutracéutico, un alimento médico, un alimento funcional, una composición probiótica, un aditivo alimenticio o un cultivo iniciador. En otra realización más, la invención se refiere al uso de dicha composición o composición farmacéutica como medicamento, nutracéutico, alimento médico, alimento funcional, probiótico, aditivo alimenticio, cultivo iniciador, o para la preparación de un medicamento nutracéutico, alimento médico, alimento funcional, composición probiótica, aditivo alimenticio, cultivo iniciador.

55 Como se usa en este documento, las composiciones medicinales como se describen en la presente memoria, tales como formulación farmacéutica, nutracéutica, alimento médico o funcional o probiótico, preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias y/o aditivos de vehículo farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, tampones, vehículos, excipientes, estabilizantes, etc. El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria es consistente con la técnica y significa que es compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no es perjudicial para el receptor de la misma.

60 La composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en este documento. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una sustancia o composición terapéutica eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, por ejemplo, humano o animal, es decir, para obtener un efecto y rendimiento local o sistémico deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de bacterias puede comprender al menos 1 bacteria, o al menos 10 bacterias, o al menos 10² bacterias, o al menos 10³ bacterias, o al menos 10⁴ bacterias, o al menos 10⁵ bacterias, o al menos 10⁶ bacterias, o al menos 10⁷ bacterias, o al menos 10⁸ bacterias, o al menos 10⁹,

o al menos 10^{10} , o al menos 10^{11} , o al menos 10^{12} , o al menos 10^{13} , o al menos 10^{14} , o al menos 10^{15} , o más células huésped, por ejemplo, bacterias, por ejemplo, en una dosis única o repetida. La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de la presente invención se puede administrar sola o en combinación con uno o más compuestos activos. Este último se puede administrar antes, después o simultáneamente con la administración de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.

Preferiblemente, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí o composición que comprende estas bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, se proporciona en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido, cápsula, enema o dosis de aerosol medida, de modo que se administre una única dosis al sujeto, por ejemplo, un paciente humano o animal.

Los ingredientes activos pueden administrarse de 1 a 6 veces al día, suficientes para exhibir la actividad deseada. Estas dosis diarias pueden administrarse como una sola dosis una vez al día, o pueden administrarse como dos o más dosis más pequeñas a la misma o diferentes horas del día, que en total dan la dosis diaria especificada. Preferiblemente, el ingrediente activo se administra una o dos veces al día. Por ejemplo, una dosis puede tomarse por la mañana y una más tarde en el día.

En todos los aspectos de la invención, la dosis diaria de mantenimiento puede administrarse durante un período clínicamente deseable en el paciente, por ejemplo, desde 1 día hasta varios años (por ejemplo, durante toda la vida restante del mamífero); por ejemplo, de aproximadamente (2 o 3 o 5 días, 1 o 2 semanas, o 1 mes) al alza y/o por ejemplo hasta aproximadamente (5 años, 1 año, 6 meses, 1 mes, 1 semana o 3 o 5 días). La administración de la dosis de mantenimiento diaria durante aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días o durante aproximadamente 1 semana a aproximadamente 1 año es típica. Otros constituyentes de las formulaciones líquidas pueden incluir conservantes, sales inorgánicas, ácidos, bases, tampones, nutrientes, vitaminas u otros productos farmacéuticos.

Los sujetos humanos o animales que se enseñan aquí pueden referirse a humanos o animales que necesitan terapia o tratamiento, que comprenden administrar a dicho ser humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se enseña aquí. El animal puede ser preferiblemente un animal de sangre caliente, más preferiblemente un vertebrado, incluso más preferiblemente un mamífero, tal como, por ejemplo, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico, animales de deporte, mascotas y animales de experimentación tales como perros, gatos, conejillos de india, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos como gatos, leones y tigres; equinos como caballos, burros y cebras; animales de alimento tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y conejillos de Indias; y así. Generalmente, el término "sujeto" o "paciente" puede usarse indistintamente y se refiere particularmente a animales, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente vertebrados, incluso más preferiblemente mamíferos, aún más preferiblemente primates, y específicamente incluye pacientes humanos y no humanos. animales, mamíferos y primates. Los pacientes preferidos pueden ser sujetos humanos.

Otros ejemplos no limitantes de los tipos de enfermedades tratables en humanos o animales mediante el suministro de bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí, que expresan opcionalmente péptidos, polipéptidos o proteínas profilácticos y/o terapéuticos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino que incluyen enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa (tratables con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10 o IL-27 o péptidos trébol); enfermedades autoinmunes, que incluyen, pero no se limitan a, diabetes de tipo 1, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso (tratable con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10 o IL-27 o el autoantígeno relevante); enfermedades alérgicas que incluyen, pero no se limitan a, asma, alergias alimentarias (tratables con el alérgeno relevante); enfermedad celíaca (tratable con alérgenos de gluten y/o IL-27); trastornos neurológicos que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (tratable con, por ejemplo, factor neurotrópico de vaciado de cerebro y factor neurotrópico ciliar); cáncer (tratable con, por ejemplo, IL-1, factores estimulantes de colonias o interferón-W); osteoporosis (tratable con, por ejemplo, factor de crecimiento transformante f3); diabetes (tratable con, por ejemplo, insulina); enfermedad cardiovascular (tratable con, por ejemplo, activador del plasminógeno tisular); aterosclerosis (tratable con, por ejemplo, citoquinas y antagonistas de citoquinas); hemofilia (tratable con, por ejemplo, factores de coagulación); enfermedad hepática degenerativa (tratable con, por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos o interferón a); enfermedades pulmonares tales como fibrosis quística (tratable con, por ejemplo, alfa antitripsina); obesidad; infecciones por patógenos, por ejemplo, infecciones víricas o bacterianas (tratables con cualquier número de las composiciones o antígenos mencionados anteriormente); etc.

La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención también se puede usar para tratar enfermedades infecciosas. En una realización, inmunización pasiva contra enfermedad asociada a Clostridium, preferiblemente enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (CDAD), con anticuerpos neutralizantes de toxina producidos localmente y secretados a través de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención puede ser obtenida. CDAD está mediado por dos exotoxinas, toxina A (enterotoxina, ver por ejemplo Genbank NC_009089.1, región: 795843..803975 para secuencia de ADN o YP_001087137.1 para secuencia de proteína) y toxina B (citotoxina, ver por ejemplo Genbank NC_009089.1, región: 787393..794493 para secuencia de ADN o YP_001087135.1 para secuencia de proteína). Ambas

son proteínas de alta masa molecular que se unen a la superficie de las células epiteliales intestinales, donde se internalizan y catalizan la glucosilación de las proteínas rho citoplásmicas, lo que lleva a la muerte celular, la inflamación y la diarrea. También han sido implicados en la promoción de la virulencia, colonización y quimiotaxis y activación de *C. difficile*. La bacteria en sí no es invasiva y no causa daño tisular. Al neutralizar las toxinas de *C. difficile* con anticuerpos, se bloquea el mecanismo patogénico del patógeno, se puede disminuir su capacidad para prosperar en el intestino y se puede minimizar el impacto sobre la ecología microbiana, permitiendo la recuperación de la microflora normal. La ventaja médica de este enfoque podría incluir una recuperación más rápida, menos recaídas y alivio de la presión selectiva para la resistencia a los antibióticos en la flora intestinal normal. Por consiguiente, en una realización preferida, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en la presente memoria adicional contiene, expresa, produce y/o secreta anticuerpos neutralizantes contra *Clostridium*, preferiblemente *Clostridium difficile*, toxina A y/o la toxina B, en la que cada una de estas toxinas tiene preferiblemente la secuencia indicada anteriormente. El lector experto comprenderá que, además de los anticuerpos de longitud completa, se pueden usar diversos fragmentos funcionales o anticuerpos modificados o variantes, como se describe en este documento en otra parte.

El lector experto apreciará que las enfermedades aquí citadas específicamente son solo ejemplares y su cita no pretende de ninguna manera limitar el uso de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se enseña aquí, a estas particulares enfermedades. En cambio, un lector experto entiende que la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, divulgada aquí puede usarse para expresar en principio cualquier producto de expresión, preferiblemente polipéptidos, de interés, que puede ser de relevancia terapéutica en no solamente aquellos citados sino también en otras diversas enfermedades o condiciones de humanos y animales. En consecuencia, una vez que un producto de expresión adecuado, preferiblemente un polipéptido, por ejemplo, un antígeno y/o un producto génico profiláctico y/o terapéutico, polipéptido o proteína, se ha elegido o determinado para una dolencia determinada, una persona experta sería capaz de lograr su expresión, aislamiento y/o entrega utilizando los presentes reactivos.

La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de la invención se puede suspender en una formulación farmacéutica para administración al humano o animal que tiene la enfermedad a tratar. Dichas formulaciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, células huésped vivas y un medio adecuado para la administración. Las células huésped recombinantes pueden liofilizarse en presencia de excipientes comunes tales como lactosa, otros azúcares, estearato alcalino y/o alcalinotérreo, carbonato y/o sulfato (por ejemplo, estearato de magnesio, carbonato de sodio y sulfato de sodio), caolín, sílice, sabores y aromas.

La bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención así liofilizada, se puede preparar en forma de cápsulas, tabletas, granulados y polvos, cada uno de los cuales puede administrarse por vía oral.

Alternativamente, algunas bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, pueden prepararse como suspensiones acuosas en medios adecuados, o las bacterias liofilizadas pueden suspenderse en un medio adecuado justo antes del uso, incluyendo dicho medio los excipientes a los que se hace referencia en la presente y otros excipientes tales como glucosa, glicina y sacarinato de sodio.

Para la administración oral, pueden formularse formas de dosificación oral gastroresistentes, formas de dosificación que pueden incluir también compuestos que proporcionan una liberación controlada de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, y de ese modo proporcionan liberación controlada de la proteína deseada codificada en la misma. Por ejemplo, la forma de dosificación oral (incluyendo tabletas, gránulos, granulados, polvos) puede recubrirse con una capa delgada de excipiente (generalmente polímeros, derivados celulósicos y/o materiales lipofílicos) que resiste la disolución o alteración en el estómago, pero no en el intestino, lo que permite el tránsito a través del estómago a favor de la desintegración, disolución y absorción en el intestino.

La forma de dosificación oral puede diseñarse para permitir la liberación lenta de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium (y opcionalmente del producto del gen terapéutico y/o de profiláctico del mismo), por ejemplo, como liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, comprimidos de acción sostenida o cápsulas. Estas formas de dosificación contienen habitualmente excipientes convencionales y bien conocidos, tales como excipientes hinchables lipófilos, poliméricos, celulósicos, insolubles. Las formulaciones de liberación controlada también se pueden usar para cualquier otro sitio de administración que incluya suministro intestinal, de colon, bioadhesión o sublingual (es decir, suministro a la mucosa dental) y administración bronquial. Cuando las composiciones de la invención se van a administrar por vía rectal o vaginal, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir supositorios y cremas. En este caso, las células huésped se suspenden en una mezcla de excipientes comunes que también incluyen lípidos. Cada una de las formulaciones mencionadas anteriormente son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Hansel et al. (1990, Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 5th edition, William and Wilkins); Chien 1992, Novel drug delivery system, 2nd edition, M. Dekker); Prescott et al. (1989, Novel drug delivery, J. Wiley & Sons); Cazzaniga et al., (1994, Oral delayed release system for colonic specific delivery, Int. J. Pharm. 108:7).

Preferiblemente, se puede usar una formulación de enema para administración rectal. El término "enema" se usa para cubrir preparaciones líquidas destinadas para uso rectal. El enema puede suministrarse generalmente en envases de dosis única y contiene una o más sustancias activas disueltas o dispersas en agua, glicerol o macrogoles u otros disolventes adecuados.

5 Una realización preferida de la invención proporciona una cápsula recubierta entérica que comprende bacterias grampositivas viables liofilizadas, secas o secadas por pulverización, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en la presente memoria caracterizado porque la bacteria grampositiva viable, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, se estabilizan usando un agente no higroscópico. Como se usa en la presente memoria, un agente no higroscópico incluye cualquier excipiente típicamente usado en la formulación de una composición farmacéutica y en donde dicho agente exhibe una absorción de humedad en equilibrio a 40% HR ambiente de no más de aproximadamente 8% en peso, preferiblemente no más de aproximadamente 7% en peso, y más preferiblemente no más de aproximadamente 6% en peso, por ejemplo aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 5% en peso, más en particular menos o igual a 2% en peso. El agente no higroscópico puede ser un poliol tal como, por ejemplo, manitol, maltitol, isomalt (azúcar de poliol) o una sal de fosfato tal como, por ejemplo, fosfato de calcio dibásico fosfato dibásico anhidro, hidrogeno fosfato de calcio o, por ejemplo, un azúcar tal como sacarosa.

20 La cápsula usada en la formulación mencionada anteriormente se selecciona típicamente del grupo que consiste en una cápsula de gelatina, una cápsula de almidón, una cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y similares; en particular, una cápsula HPMC. Para el suministro intestinal de bacterias viables, las cápsulas con recubrimiento entérico de la presente invención deberían ser estables a pH bajo (hasta pH 5.5) y tener un perfil de disolución acelerado a un pH superior (por encima de pH 5.5). La liberación óptima se realiza cuando las cápsulas se desintegran a un pH de aproximadamente 6.8 en 1 hora. De este modo, en una realización adicional de la presente invención, las cápsulas se recubren con un polímero entérico para proporcionar una cápsula con recubrimiento entérico que es estable a un pH de hasta 5.5 y que es soluble a un pH superior a 5.5; en particular a un pH superior a 6.0; más en particular con un perfil de disolución rápida a un pH de aproximadamente 6.8.

30 El polímero entérico utilizado para el recubrimiento entérico consiste típicamente en una sustancia polimérica formadora de película, que es soluble a un pH superior a 5.5, en particular a un pH superior a 6.0. Los polímeros formables por película útiles en las diferentes realizaciones de la presente invención se seleccionan habitualmente del grupo que consiste en un derivado de celulosa, un copolímero acrílico, un copolímero maleico, un derivado de polivinilo, goma laca y similares; en particular un copolímero acrílico seleccionado del grupo que consiste en copolímero de estireno-ácido acrílico, copolímero de acrilato de metilo-ácido acrílico, copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico, copolímero de acrilato de butilo-estireno-ácido acrílico, copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo tal como Eudragit L100, Eudragit S o Eudragit S100 (cada uno de ellos es un nombre comercial, disponible comercialmente de Röhm Pharma, Alemania), copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo como Eudragit L100-55 (nombre comercial, disponible comercialmente de Röhm Pharma, Alemania), copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico-acrilato de octilo, y similares; más en particular, el polímero conformable en película consiste en copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo.

40 También se agrega una combinación de diferentes compuestos estabilizantes (crioprotectores) a la biomasa bacteriana antes del secado, secado por pulverización o liofilización. Esta combinación de compuestos estabilizantes, que comprende un hidrolizado de almidón y una sal de ácido glutámico y/o un poliol, da como resultado una supervivencia y estabilidad mejoradas de bacterias grampositivas secas, secadas por pulverización o liofilizadas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.

Las formulaciones y cápsulas que se describen en este documento se pueden usar como un medicamento, nutracéutico, aditivo alimenticio, alimento funcional, alimento médico, cultivo iniciador y/o composición probiótica.

50 Así, de acuerdo con la invención, en una realización preferida, bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí, o el medicamento que comprende esta bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, se puede administrar al animal o al humano a través de la mucosa, por ejemplo, una vía oral, nasal, rectal, vaginal o bronquial mediante cualquiera de las formulaciones del estado de la técnica aplicables a la ruta específica. Las dosis de bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, para administración variarán dependiendo de cualquier cantidad de factores, incluyendo el tipo de bacteria y el gen codificado por el mismo, el tipo y la gravedad de la enfermedad a tratar y la ruta de administración a ser utilizada. Por lo tanto, las dosificaciones precisas no se pueden definir para todas y cada una de las realizaciones de la invención, sino serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia una vez que estén armadas con la presente invención. La dosificación podría determinarse de todos modos caso por caso midiendo las concentraciones a nivel del suero de la proteína terapéutica y/o profiláctica después de la administración de números predeterminados de células, usando métodos bien conocidos, tales como los conocidos como ELISA o Biacore (Ver ejemplos). El análisis del perfil cinético y la vida media de la proteína recombinante suministrada proporciona información suficiente para permitir la determinación de un intervalo de dosificación efectivo para la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.

- En una realización, cuando la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, expresa un antígeno, la invención también puede proporcionar una vacuna. Preferiblemente, el antígeno puede ser capaz de provocar una respuesta inmune y usarse como vacuna en un humano o animal. El término “vacuna” identifica una composición farmacéuticamente aceptable que, cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto animal o humano es capaz de inducir anticuerpos contra un inmunógeno comprendido en la vacuna y/o provoca inmunidad protectora en el sujeto. La vacuna de la invención comprendería la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en este documento, opcionalmente transformada con los ácidos nucleicos o vectores que codifican el antígeno y además opcionalmente un excipiente. Dichas vacunas también pueden comprender un adyuvante, es decir, un compuesto o composición que mejora la respuesta inmune a un antígeno. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, y adyuvantes humanos potencialmente útiles farmacéuticamente aceptables tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum.
- Se describe aquí un método para el tratamiento o a una terapia, que comprende administrar la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, o composiciones, preferiblemente una composición farmacéutica terapéutica y/o profiláctica a un individuo en necesidad de eso.
- Como se describió anteriormente, la composición que comprende la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención puede ser un cultivo iniciador, una composición probiótica o un aditivo alimenticio. Por consiguiente, la invención en un aspecto se refiere a un cultivo iniciador, una composición probiótica, o un aditivo alimenticio que comprende la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí.
- Un cultivo iniciador puede ser, por ejemplo, un cultivo líquido, un cultivo prensado en líquido, una forma congelada o seca, que incluye, por ejemplo, una forma seca, secada por congelamiento, y una forma secada por rociado/ lecho fluido, o congelado o concentrado liofilizado. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador tal como se describe en la presente memoria, que se seca, se seca por pulverización, se congela o se liofiliza. El cultivo se puede empacar al vacío, o en una atmósfera de, por ejemplo, N₂, CO₂ y similares. Por ejemplo, un cultivo iniciador puede producirse y distribuirse en recintos sellados, preferiblemente no pirogénicos, que pueden estar hechos de un plástico u otro material rígido, no flexible o flexible adecuado, al lugar de la fermentación y pueden agregarse al material orgánico que se va a fermentar, u opcionalmente se cultiva primero en un medio iniciador separado para obtener un cultivo de alta densidad.
- Un cultivo iniciador también puede contener, además de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención, agentes tamponantes y nutrientes estimuladores del crecimiento (por ejemplo, un carbohidrato asimilable o una fuente de nitrógeno), o conservantes (por ejemplo, compuestos crioprotectores) u otros vehículos, si se desea, tales como leche en polvo o azúcares.
- Un cultivo iniciador puede ser un cultivo puro, es decir, puede contener una biomasa de un solo aislado de bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención, es decir, un clon que se origina en principio de una célula. En otra realización, un cultivo iniciador puede ser un cocultivo, es decir, puede comprender más de una cepa de bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de la invención, que comprende adicionalmente microorganismos adicionales tales como bacterias o levaduras
- Se puede preferir que un cultivo iniciador o un cultivo de alta densidad contenga al menos 10² unidades formadoras de colonias (UFC) de una o más bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de la invención, tales como al menos 10³ UFC/g, al menos 10⁴ UFC/g, por ejemplo, al menos 10⁵ UFC/g, al menos 10⁶ UFC/g, por ejemplo, al menos 10⁷ UFC/g, al menos 10⁸ UFC/g, por ejemplo, al menos 10⁹ UFC/g, al menos 10¹⁰ UFC/g, por ejemplo, al menos 10¹¹ UFC/g, en al menos 10¹² UFC/g, o al menos 10¹³ UFC/g.
- Típicamente, se puede añadir un cultivo iniciador o un cultivo de alta densidad a un medio iniciador o a un material orgánico o sustrato fermentable en una concentración de células viables de una o más cepas bacterianas (y opcionalmente de una o más cepas de levadura) que es al menos 10² (UFC) de una o más cepas bacterianas (y opcionalmente de una o más cepas de levadura) de la invención, tal como al menos 10³ UFC/g, al menos 10⁴ UFC/g, por ejemplo, al menos 10⁵ UFC/g, al menos 10⁶ UFC/g, por ejemplo, al menos 10⁷ UFC/g, al menos 10⁸ UFC/g, por ejemplo, al menos 10⁹ UFC/g, al menos 10¹⁰ UFC/g, por ejemplo, al menos 10¹¹ UFC/g, al menos 10¹² UFC/g, o al menos 10¹³ UFC/g del material orgánico, medio o sustrato.
- En una realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador como se define aquí para la preparación de un producto alimenticio o se refiere a un aditivo alimenticio o una composición probiótica, o un medicamento, que comprende una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que carece de actividad del componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa (PtcC). En una realización preferida, el gen que codifica PtcC endógeno se ha eliminado parcial o completamente, se ha roto o se ha inactivado, por ejemplo, es incapaz de producir un producto de gen de PtcC funcional, como se describe en este documento en otro lugar. En una realización adicional,

la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, en el cultivo iniciador o el aditivo alimenticio o la composición probiótica o el medicamento contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional (por ejemplo, otsB) y/o una trehalosa 6-fosfato sintasa heteróloga funcional (por ejemplo, otsA), como se describe en este documento en otra parte.

5 En otra realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador o aditivo alimenticio o una composición probiótica o un medicamento como se define aquí, en donde la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, carece de actividad trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP). En una realización preferida, el gen que codifica el TrePP endógeno se ha eliminado parcial o completamente, se ha roto o se ha inactivado, por ejemplo, es incapaz de producir un producto del gen TrePP funcional, como se describe en este documento en otra parte.

10 En una realización adicional, la invención se refiere a un cultivo iniciador o aditivo alimenticio, composición probiótica o medicamento como se describe aquí, en donde la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, sobreexpresa, preferiblemente sobreexpresa constitutivamente, uno o más genes que codifican un transportador de trehalosa, preferiblemente un transportador de trehalosa endógeno, como se describe en este documento en otra parte.

15 En otra realización más, la invención se refiere a un cultivo iniciador, composición probiótica o aditivo alimenticio o medicamento como se describe en la presente memoria, en donde la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, expresa uno o más productos génicos heterólogos preferiblemente uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos, como se describe aquí en otra parte.

20 En una realización, el cultivo iniciador, la composición probiótica o el aditivo alimenticio tal como se describe en la presente memoria se seca, se congela o se seca por pulverización, se seca o se liofiliza.

25 Como se indicó anteriormente, en un aspecto, la invención se refiere al uso de la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí para la preparación de una composición probiótica, cultivo iniciador, preferiblemente para uso como un aditivo alimenticio o para uso en la preparación de un producto alimenticio o para la preparación de un medicamento. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un cultivo iniciador o una composición probiótica como un aditivo alimenticio o para la preparación de un producto alimenticio.

30 Como se usa en el presente documento, el término "aditivo alimenticio" se refiere a bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, preferiblemente formulada en una composición, que puede agregarse a un alimento o alimento humano o animal, adecuado para el consumo sin modificación adicional o alternativamente después de modificaciones adicionales, tales como la fermentación completa o parcial de la comida o alimento o la fermentación completa o parcial de uno o más componentes de la comida o alimento. Por ejemplo, y sin limitación, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención, o las composiciones de acuerdo con la invención, tales como los cultivos iniciadores descritos en este documento, pueden usarse en la industria láctea, en particular para la preparación de productos lácteos fermentados, también conocidos como alimentos lácteos cultivados, productos lácteos cultivados o productos de leche cultivados. El proceso de fermentación aumenta la vida útil del producto, además de aumentar el sabor y mejorar la digestibilidad de la leche. Los ejemplos de productos alimenticios a los que se hace referencia en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a queso, yogur, crema agria, suero de leche, leche acidófila, ...

45 En un aspecto, la invención también se refiere a un método para preparar un medicamento, un aditivo alimenticio, una composición probiótica o un cultivo iniciador como se define aquí, en donde dicho cultivo iniciador es preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende pasos de:

50 i) propagar bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se define aquí en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, y

55 ii) formulación de la bacteria grampositiva así propagada, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como un medicamento, aditivo alimenticio, una composición probiótica o cultivo iniciador, respectivamente.

60 Los métodos para propagar bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, así como medios y sustratos capaces de ser fermentados por bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, son bien conocidos en la técnica. En una realización, la formulación como medicamento, aditivo alimenticio, una composición probiótica o cultivo iniciador comprende formular como un cultivo líquido, cultivo prensado líquido, forma congelada o seca, que incluye, por ejemplo, forma seca liofilizada y lecho de pulverización/fluido forma seca, o congelada o liofilizada concentrada. Preferiblemente, la formulación comprende secado, secado por pulverización, congelación o liofilización.

65

Un método para preparar un producto alimenticio, que comprende los pasos de mezclar la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se define aquí, el aditivo alimenticio como se define aquí, la composición probiótica como se define aquí, o el cultivo iniciador como se define aquí con un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. El material de sustrato es típicamente una fuente de carbono, preferiblemente un carbohidrato o azúcar. Los carbohidratos que pueden fermentarse por bacterias grampositivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos o disacáridos tales como glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, En una realización, el método para preparar un producto alimenticio comprende los pasos de:

i) proporcionar la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, aditivo alimenticio, composición probiótica o el cultivo iniciador como se describe en este documento;

ii) proporcionar un material de sustrato o una composición, preferiblemente una composición no tóxica o comestible, que comprende un material de sustrato que puede fermentarse mediante dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium;

iii) mezclar la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se define aquí, aditivo alimenticio como se define aquí, la composición probiótica como se define aquí, o el cultivo iniciador como se define aquí con el material sustrato o composición

iv) propagar opcionalmente dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, y/o fermentando dicho material de sustrato o composición con dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.

En un aspecto, la invención también se refiere a un producto alimenticio que comprende dicha bacteria grampositiva. Como se describió anteriormente, la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención acumula ventajosamente trehalosa intracelularmente. Por consiguiente, en un aspecto, la invención también se refiere a un método para acumular internamente trehalosa en una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, tal como trehalosa presente en el medio de crecimiento, o trehalosa externa o exógenamente añadida, que comprende el paso de propagar bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En una realización, el método para acumular internamente trehalosa en una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, comprende los pasos de:

i) proporcionar la bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, o el cultivo iniciador como se describe aquí;

ii) proporcionar un material de sustrato o una composición, preferiblemente una composición no tóxica o comestible, que comprende un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium;

iii) mezclar el LAB tal como se define en la presente memoria, o el cultivo iniciador tal como se define en la presente con el material del sustrato o la composición

iv) opcionalmente propagar dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, y/o fermentar dicho material de sustrato o composición con dicha bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.

La bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención, muestra ventajosamente una resistencia mejorada al estrés, así como características mejoradas de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento. Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un método para mejorar la resistencia al estrés o las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento de una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que comprende modificar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como para carecer de actividad de PtcC. En una realización, el gen que codifica la PtcC endógena se ha eliminado parcial o completamente, se ha roto o se ha inactivado, por ejemplo, es incapaz de producir un producto del gen de la PtcC funcional.

Preferiblemente, las características de resistencia al estrés o fabricación, procesamiento y/o almacenamiento son una o más características de resistencia al estrés o fabricación, procesamiento y/o almacenamiento seleccionadas del grupo que comprende resistencia a las condiciones ácidas, resistencia a las sales biliares, resistencia al calor, resistencia a la sal, resistencia al secado, secado por pulverización, congelación o secado por congelamiento y resistencia osmótica.

En una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en los que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, contiene trehalosa 6-fosfato

fosfatasa heteróloga funcional (por ejemplo, otsB) y/o una trehalosa 6-fosfato sintasa heteróloga funcional (por ejemplo, otsA), como se describe en este documento en otra parte.

5 En otra realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en los que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, carece de actividad de trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP). En una realización preferida, el gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado parcial o completamente, se ha roto o se ha inactivado, por ejemplo, es incapaz de producir un producto del gen TrePP funcional, como se describe en este documento en otra parte.

10 La bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, sobreexpresa, preferiblemente sobreexpresa constitutivamente, uno o más genes que codifican un transportador de trehalosa, preferiblemente un transportador de trehalosa endógeno, como se describe en este documento en otra parte.

15 En otra realización más, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en los que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, expresa uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente uno o más profilácticos y/o producto génico terapéutico, como se describe en este documento en otra parte.

20 En una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, que comprende además la etapa de secado, congelación, secado por pulverización o secado por congelamiento de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, medicamento, aditivo alimenticio, composición probiótica o cultivo iniciador.

25 Los inventores han descubierto sorprendentemente que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención, es capaz de acumular intracelularmente trehalosa sin la adición de trehalosa añadida externamente. Ventajosamente, la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención se puede propagar en medio opcionalmente incluso sin trehalosa añadida externamente, pero aún acumular trehalosa internamente. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a los métodos descritos aquí, que comprenden la etapa de mantener o propagar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe en este documento en un medio que carece o sustancialmente carece de trehalosa, o un medio que carece o que sustancialmente carece de trehalosa externa o agregada exógenamente. Ventajosamente, dicho medio puede comprender otra fuente de carbono fermentable, tal como, pero sin limitación, maltosa y/o glucosa.

35 De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en los que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención se mantiene o se propaga en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, en donde dicho material de sustrato comprende menos (tal como subóptimo), no comprende o sustancialmente no comprende trehalosa. Alternativamente, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos aquí, en los que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención se mantiene o se propaga en un medio que comprende un material de sustrato capaz de fermentarse por dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, en donde dicho material de sustrato comprende maltosa. En una realización preferida, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en los que la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, según la invención se mantiene o se propaga en un medio que comprende un sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, donde dicho material de sustrato comprende maltosa y en donde dicho material de sustrato comprende menos (tal como subóptimo), no comprende o sustancialmente no comprende trehalosa.

50 Como se usa en el presente documento, un medio que comprende no o sustancialmente no trehalosa o sin trehalosa externamente añadida o exógena se refiere a un medio que no contiene trehalosa o que solo contiene pequeñas cantidades de trehalosa. Preferiblemente, la cantidad o concentración de trehalosa en dicho medio es demasiado baja para permitir que la bacteria se pueda usar como única fuente de carbono. En una realización, el medio contiene menos de 100 mM, preferiblemente menos de 50 mM, más preferiblemente menos de 25 mM, tal como menos de 15 mM, menos de 10 mM, menos de 5 mM, menos de 2 mM o menos de 1 mM. En una realización adicional, el medio contiene menos del 2% p/p o menos del 2% v/p de trehalosa. preferiblemente menos del 1% p/p o menos del 1% v/p de trehalosa, más preferiblemente menos de 0.5% p/p o menos de 0.5% v/p de trehalosa. tal como menos de 0.3, menos de 0.2, menos de 0.1, menos de 0.05 o menos de 0.01% p/p, o % v/p de trehalosa. En otra realización, el medio contiene menos de 20% de trehalosa de la cantidad total de fuente de carbono o carbohidrato fermentable, preferiblemente menos de 10%, más preferiblemente menos de 5%, tal como menos de 3%, menos de 2% o menos del 1%.

65 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí para acumular trehalosa intracelular en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. En una realización preferida, la invención se refiere al uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como

se describe aquí para acumular trehalosa intracelular en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, en ausencia o ausencia sustancial de trehalosa. En otra realización, la invención se refiere al uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí para acumular trehalosa intracelular en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bífido bacteria, cuando se mantiene o propaga en maltosa, preferiblemente como la única o sustancialmente exclusiva fuente de carbono.

Como se describió anteriormente, la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, de acuerdo con la invención muestra una resistencia mejorada a una variedad de tensiones ambientales, así como características mejoradas de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento. Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere al uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, como se describe aquí para mejorar la resistencia al estrés o mejorar las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium. El método mejora la resistencia al estrés o mejora las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento en bacterias gram positivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium, que comprende generar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.

La resistencia al estrés se puede seleccionar del grupo que comprende resistencia a condiciones ácidas, resistencia a sales biliares, resistencia al calor, resistencia a la sal, resistencia al frío, resistencia osmótica, preferiblemente seleccionada de condiciones ácidas o sales biliares, más preferiblemente resistencia a las sales biliares. Las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento se pueden seleccionar del grupo que comprende secado, congelación, secado por congelamiento, secado por pulverización o almacenamiento en medio, preferiblemente congelación o secado por congelamiento, más preferiblemente secado por congelamiento.

Los aspectos y las realizaciones de la invención se apoyan adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

La Tabla 1 proporciona una visión general de las modificaciones genéticas en las cepas descritas en este documento, a excepción de las cepas utilizadas en la Figura 4 que se dan en la Tabla 2.

Tabla 1

Cepa	a) operón trehalosa		b) PtcC	c) otsB	d) thyA	e) Carga
	trehalosa PTS I/II	TrePP				
sAGX0037	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	-	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hIL-10 (locus thyA)
sAGX0085	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	-	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hTFF1 (locus thyA)
sAGX0137	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	usp45>>otsB mutante	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hIL-10 (locus thyA)
sAGX0139	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	usp45>>otsB	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hIL-10 (locus thyA)
sAGX0147	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	usp45>>otsB mutante	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hIL-10 (locus thyA)
sAGX0148	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	usp45>>otsB	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hIL-10 (locus thyA)
sAGX0167	PhIIA>>PTS	KO	wt	usp45>>otsB	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hIL-10 (locus thyA)
sAGX0169	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	-	KO (reemplazo de gen)	PhIIA>>hTFF-1 (locus thyA)

sAGX0248	wt (Ptre>>PTS)	KO	KO (codón de parada)	-	wt	-
sAGX0272	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	-	wt	-
sAGX0309	PhIIA>>PTS	KO	wt	-	KO (eliminación de gen)	usp45>>CDP870 anti-TNF
sAGX0319	KO	KO	wt	-	KO (eliminación de gen)	usp45>>CDP870 anti-TNF
sAGX0346	PhIIA>>PTS	KO	KO (codón de parada)	usp45>>otsB	KO (eliminación de gen)	-
sAGX0347	PhIIA>>PTS	KO	KO (eliminación de gen)	usp45>>otsB	KO (eliminación de gen)	-
sAGX0354	PhIIA>>PTS	KO	KO (codón de parada)	usp45>>otsB	KO (eliminación de gen)	gapB>>CDP870 anti-TNF

5 Descripción general de las modificaciones genéticas en las cepas descritas en este documento. Se indica a) la estructura del operón trehalosa: si el promotor nativo del operón trehalosa (Ptre) precede a los transportadores PTS de trehalosa (Ptre >> PTS) y si trePP se eliminó (KO) o no (tipo silvestre; wt); b) estructura del gen PtcC: tipo silvestre (wt), inactivado (KO) por inserción de un codón de terminación o eliminación de genes; c) ausencia (-) o presencia de otsB funcionalmente inactiva (mutante) u otsB de tipo silvestre, bien insertada en el locus thyA siguiendo al promotor thyA (PthyA >> otsB) o insertada como un segundo cistrón siguiendo el gen usp45 (usp45 >> otsB); d) estructura del gen thyA: tipo silvestre (wt) o inactivado (KO) por eliminación génica o inserción de un gen de carga (reemplazo génico); e) ausencia (-) o naturaleza y estructura de los genes de carga uidA, hLL-10 o anti-TNF CDP870, insertados en el locus thyA bajo el control del promotor hIIA (PhIIA >>) o insertados corriente abajo de los genes usp45 o gapB (usp45 >>; gapB >>). Todas las cepas se derivan de *L. lactis* MG1363.

Tabla 2

Cepa	Gen Inactivado	ID de Gene Inactivado	Producto proteico inactivado
sAGX0241	pmrB	4799106	bomba de eflujo de resistencia multifármaco
sAGX0242	celB	4796591	componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa
sAGX0245	araJ	4796972	Permeasa de eflujo de arabinosa putativo
sAGX0246	ptcB	4797109	componente IIB del sistema PTS específico para celobiosa
sAGX0247	ptcA	4798642	componente IIA del sistema PTS específico para celobiosa
sAGX0248	PtcC	4796893	componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa
sAGX0249	mSmK	4797024	proteína de unión a ATP de transporte de unión a azúcar múltiple
sAGX0250	llmg_0453	4797778	enzima PTS IIABC específica de sacarosa (operón tre)
sAGX0251	llmg_0454	4797093	componente IIABC del sistema PTS específico de beta-glucósido (operón tre)
sAGX0252	llmg_0489	4796717	proteína permeasa de sistema de transporte de azúcar
sAGX0253	llmg_0490	4796719	proteína permeasa de sistema de transporte de azúcar
sAGX0255	malG	4798664	proteína malG permeasa de transportador ABC maltosa

sAGX0256	malF	4798442	proteína malF permeasa de sistema de transporte de maltosa
sAGX0257	malE	4798313	proteína de unión al sustrato transportador de maltosa ABC
sAGX0258	lplB	4798767	proteína de unión al sustrato del transportador ABC de azúcar
sAGX0259	lplC	4796680	Permeasa de transportador ABC de azúcar
sAGX0260	lplA	4797636	proteína de unión de sustrato del transportador ABC de azúcar
sAGX0261	bgIP	4797495	Sistema PTS, enzima IIABC específica de beta-glucósidos
sAGX0262	llmg_1104	4798113	proteína de exportación de fármaco
sAGX0265	tagG	4798685	proteína permeasa de transportador ABC de ácido teicoico

Resumen de las cepas construidas para identificar el puerto de salida de trehalosa. Se construyeron cepas que son deficientes en trePP para permitir la acumulación de trehalosa y en las que una selección de genes, tomadas de las categorías funcionales COG de *L. lactis*, "Carbohydrate transport and metabolism" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/cogtik.cgi?gi=20494&cog=G> (de la cual se tomó la nomenclatura de genes y proteínas) están inactivados. Se indica la ID del gen de los genes inactivados, así como el producto proteico inactivado.

La inactivación del gen se realizó por recombinación dirigida por oligonucleótidos, introduciendo los codones de terminación en el marco en los respectivos genes objetivo. Todas las cepas se derivan de *L. lactis* MG1363

Ejemplo 1: acumulación de trehalosa intracelular después de la inactivación de trePP

Experimental

Las cepas se cultivaron durante la noche (A) o durante 24 horas (B) en 50 ml de trehalosa GM17T + 500 mM a 30 °C, las células se recogieron por centrifugación y se determinó el contenido de trehalosa: se lavaron 3 veces cultivos equivalentes de 10 ml con tampón de carbonato 0.25 M donde se determinó después el peso del sedimento celular (peso húmedo). Las células se lisaron en 1 ml de tampón carbonato 0.25 M usando la matriz B de lisis y el dispositivo MP Fasprep-24 a 6 m/s durante 40 segundos (MP Biomedicals). El sobrenadante de las células lisadas se separó por centrifugación y se calentó durante 30 minutos a 99 °C. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se ensayó para determinar la concentración de trehalosa utilizando un kit de ensayo de trehalosa (K-TREH 010/10, Megazyme, Irlanda). Brevemente, la trehalosa en las muestras se hidroliza a D-glucosa por trehalasa, y la D-glucosa liberada se fosforila mediante la enzima hexoquinasa y adenosina-5'-trifosfato (ATP) a glucosa-6-fosfato con la formación simultánea de adenosina-5'-difosfato (ADP). En presencia de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la glucosa-6-fosfato se oxida con nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP +) a gluconato-6-fosfato con la formación de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). La cantidad de NADPH formada en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa y, por lo tanto, con la cantidad de trehalosa. Es el NADPH el que se mide por el aumento en la absorbancia a 340 nm (en comparación con el OD340 antes de la adición de la trehalosa). Los valores de trehalosa se calcularon mediante el uso de una dilución en serie de un estándar de trehalosa y se expresaron en mg/g de peso del sedimento celular húmedo (ww)

Resultados

La acumulación de trehalosa intracelular es posible después de la inactivación de trePP, siguiendo la expresión de otsB o una combinación de los mismos, como se indica en la figura 1. La figura 1 (A) representa cepas de tipo silvestre TrePP (sAGX0037 y sAGX0137) no acumulan trehalosa. La inactivación de trePP en sAGX0137 (que contiene un otsB mutante no funcional), que conduce a sAGX0147, permite la acumulación de trehalosa. La inserción de otsB tipo silvestre sAGX0037, que conduce a sAGX0139, permite la acumulación de trehalosa. La combinación de otsB y trePP KO conduce a un aumento moderado en la acumulación de trehalosa (sAGX0148) que se potencia en gran medida mediante la inserción del fuerte promotor constitutivo PhIIA (que se describe en WO 2008/084115) frente a ambos genes del sistema fosfotransferasa (PTS) del operón *L. lactis* trehalosa (sAGX0167). La Figura 1 (B) muestra que la cepa de tipo silvestre TrePP sAGX0085 no puede acumular trehalosa. La inactivación de trePP KO (sAGX0169) solo permite la acumulación de trehalosa.

De la Figura 1, está claro que las cepas de tipo silvestre TrePP no acumulan trehalosa. La alteración génica (eliminación del gen, pero también mutación puntual) de trePP permite la acumulación intracelular de trehalosa exógena. En la cepa sAGX0147 está presente un gen mutante no funcional de otsB, mientras que las cepas sAGX0169, sAGX0309 y

sAGX0319 no tienen genes *otsB*. La cepa sAGX0169 lleva, a excepción del gen de carga hTFF1 presente en el locus *thyA*, ninguna otra alteración genética que la alteración de *trePP*. La acumulación de trehalosa en una cepa *trePP* KO es inesperada ya que, según la técnica anterior, se consideraría que es críticamente dependiente de una trehalosa-6-fosfato fosfatasa (*OTB* o análogo). Tal función no se ha descrito en *L. lactis* y no se esperaría que estuviera presente, ya que

5 contrarrestaría el metabolismo de la trehalosa por *L. lactis* convirtiendo la trehalosa-6-fosfato en la trehalosa intracelular inerte. Aquí observamos que, inesperadamente, esta función está presente en *L. lactis*. *TrePP* KO puede realizarse por eliminación de genes, como se hizo aquí o mediante el establecimiento de un codón de parada o una mutación de cambio de marco o una mutación de promotor o la identificación de un mutante *trePP* espontáneo no funcional. La acumulación

10 de trehalosa es posible cuando *otsB* está presente como tal (sAGX0139) o combinado con *trePP* KO (sAGX0148) o incluso más combinado con una inserción del promotor constitutivo fuerte *PhIIA* posicionado delante de ambos genes del sistema fosfotransferasa (*PTS*) (*PhIIA* >> *trePTC*) del operón de *L. lactis* trehalosa (sAGX0167). La posición preferida de *otsB*, como se usa aquí, es como un segundo cistrón detrás del gen *usp45* indígena en una configuración como las solicitudes de patente europea descritas con los números de solicitud 11168495.7 y 11173588.2 (*usp45* >> *rpmD* >> *otsB*, donde *rpmD* es la región intergénica que precede a *rpmD*).

15 Ejemplo 2: la acumulación de trehalosa exógena proporciona protección frente a la lisis biliar

Experimental

20 Las cepas se cultivaron durante la noche en 50 ml de trehalosa GM17T o GM17T + 500 mM a 30 °C, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 25 ml de NaCl al 0,9%. Se tomaron muestras y se determinaron las CFU colocando en placas las diluciones apropiadas (iniciales). En T0, se añadieron 25 ml de oxgal al 1% en NaCl al 0,9% y las suspensiones celulares se incubaron durante 8 h a 37 °C. Las muestras se tomaron en T0, 1, 2, 4, 6 y 8 h. Las CFU se determinaron mediante el recubrimiento de las diluciones apropiadas (Figura 2 A), se determinó el contenido de

25 trehalosa (Figura 2 B) esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

30 La trehalosa intracelular protege contra la lisis biliar y la pérdida de trehalosa intracelular coincide con una resistencia disminuida a la lisis biliar. Por lo tanto, la pérdida de trehalosa es problemática para la estabilidad a largo plazo en la bilis.

Indicado en la Figura 2 es que la acumulación de trehalosa exógena en células de *L. lactis* proporciona protección frente a la lisis biliar. La liberación de trehalosa intracelular limita el efecto protector de la trehalosa en el tiempo. Las células de *L. lactis* que acumularon trehalosa (sAGX0167 + trehalosa, sAGX0309 + trehalosa y sAGX0319 + trehalosa), es decir,

35 cultivadas en trehalosa 500 mM como se describe en (Figura 2 B) muestran una protección sustancial en el tiempo contra la lisis biliar, proporcional a la concentración de trehalosa intracelular en comparación con células de *L. lactis* sin trehalosa intracelular (sAGX0167, precultivadas sin trehalosa). La disminución de la supervivencia en 0,5% de oxgal (Figura 2 A) coincide con la liberación de trehalosa intracelular (Figura 2 B).

40 Ejemplo 3: La acumulación de trehalosa exógena proporciona protección para la lisis biliar

Experimental

45 Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una solución de sales 1xM9. Se tomaron muestras y se determinaron las concentraciones de trehalosa a T0, 1, 2 y 4 horas, esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Los datos son ejemplares para todas las cepas de *ptc* wt.

Resultados

50 Después de la acumulación, la trehalosa en cierta medida se filtra desde las células a través de un puerto de salida de trehalosa hasta ahora no identificado o no anticipado y puede recuperarse en el sobrenadante.

La Figura 3A indica que la trehalosa se puede acumular intracelular por síntesis de novo así como después de la absorción del medio de crecimiento (sAGX0167 crecido en trehalosa 500 mM, como se describe en la Figura 1). Tanto la trehalosa sintetizada de novo como la exógenamente acumulada se liberan de las células. La Figura 3B indica que la pérdida de trehalosa intracelular da como resultado un aumento de la trehalosa presente en el sobrenadante del cultivo (expresado aquí en mg de trehalosa/10 ml de cultivo para permitir la comparación entre la concentración de trehalosa intracelular y extracelular).

60 Ejemplo 4: acumulación y liberación de trehalosa en diversas cepas descritas en la tabla 2

Experimental

65 Las cepas descritas en la Tabla 2 se cultivaron en GM17 complementado con 100 mM (Figura 4 A) o 500 mM (Figura 4 B) trehalosa. Las células se recogieron y se resuspendieron en tampón M9 (Difco). El contenido de trehalosa intracelular

se determinó a T0, 2, 4 y 8 h, esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Excepto por sAGX0248 (PtcC KO), todas las cepas muestran una liberación similar de trehalosa como se describe en la Figura 3.

Resultados

Se seleccionaron 20 transportadores de oligosacáridos *L. lactis* MG1363 de la base de datos COG (sección transporte y metabolismo de carbohidratos) y sus genes se rompieron mediante recombinación dirigida por oligonucleótidos en un fondo trePP KO (sAGX0272, requerido para la acumulación de trehalosa) (Tabla 2; Figura 4) Solo la alteración de PtcC evita la liberación de trehalosa.

Uno no puede predecir cuál de los genes enumerados en la Tabla 2 está implicado en la liberación de trehalosa. La interrupción de cualquiera de los genes transportadores de PTS presentes en el operón de trehalosa (llmg_0453; llmg_0454) no tiene ningún efecto sobre la absorción o liberación de trehalosa. La alteración del gen PtcC (que codifica el componente ITS del sistema PTS específico para celobiosa) resuelve la fuga de trehalosa acumulada, por lo tanto, el PtcC es el puerto de salida de trehalosa y esta proteína provoca una fuga de trehalosa. La alteración de celB (componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa) no tiene ningún efecto sobre la absorción o liberación de trehalosa. La interrupción de PtcC en el fondo trePP KO previene toda liberación de trehalosa.

Ejemplo 5: acumulación y liberación de trehalosa en diversas cepas descritas en la tabla 2

Experimental

Las cepas se cultivaron durante la noche en GM17T + trehalosa 500 mM a 30 °C, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen igual 1 x M9 (Figura 5 A) o 0,5% de Oxgal en NaCl al 0,9% (Figura 5 B) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las muestras se tomaron en T0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. El contenido de trehalosa intracelular se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

La combinación de PtcC KO (inserción de codón de parada, así como eliminación de genes) y PhIIA >> trePTC (alta expresión constitutiva del transportador de trehalosa) permite una alta importación de trehalosa y retención intracelular completa.

La Figura 5 indica que la inactivación de PtcC previene (en sales de M9, panel A) o retrasa (en 0.5% de oxgal, panel B) la liberación de trehalosa intracelular. La presencia del fuerte promotor constitutivo de PhIIA (como se divulga en el documento WO 2008/084115) frente a ambos genes PTS del operón de *L. lactis* trehalosa restaura la capacidad de acumular trehalosa exógena a la de una cepa de referencia (véase también la Figura 4).

Ejemplo 6: La acumulación de trehalosa exógena proporciona protección frente a la lisis biliar.

Experimental

Las cepas se cultivaron durante la noche en GM17T + trehalosa 500 mM a 30 °C, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio volumen de NaCl al 0.9%. Se tomaron muestras y se determinaron las CFU colocando en placas las diluciones apropiadas (iniciales). En T0, se añadió medio volumen de oxalo al 1% en NaCl al 0.9% y se incubó durante 8 h a 37 °C. Las muestras se tomaron a T0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Se determinó el contenido de trehalosa (Figura 6A, esencialmente como en el Ejemplo 1) y las CFU se determinaron mediante placas (0-8 horas solamente) de diluciones apropiadas y se representaron gráficamente como% de los valores iniciales de T0 (Figura 6 B).

Resultados

La capacidad potenciada para retener la trehalosa intracelular conduce a una resistencia biliar mejorada.

La Figura 6 indica que la acumulación de trehalosa exógena en células de *L. lactis* proporciona protección frente a la lisis biliar. La liberación de trehalosa intracelular (A) coincide con una supervivencia decreciente en 0.5% de oxgal (B). La inactivación de PtcC extiende la presencia en el tiempo de la trehalosa intracelular y, en consecuencia, también mejora la resistencia en el tiempo hacia oxgal.

Ejemplo 7: las cepas TrePP KO son capaces de convertir glucosa o maltosa en trehalosa intracelular. La maltosa estimula la absorción de trehalosa por las cepas trePP KO.

Experimental

Las cepas se cultivaron durante la noche en los medios indicados. La trehalosa se determinó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

Las cepas TrePP KO han adquirido la capacidad de utilizar fuentes de carbono tales como glucosa o maltosa para acumular trehalosa. Esto no se describe en la técnica anterior ya que la trehalosa puede acumularse dentro de las células en MM17T, es decir, con maltosa como la única fuente de carbono.

La Figura 7 indica que las cepas TrePP KO (tanto PtcC wt como PtcC KO) son capaces de convertir glucosa o maltosa en trehalosa intracelular (columnas 1 y 2, columnas 5 - 8). La maltosa potencia la absorción y la acumulación de trehalosa extracelular del medio de crecimiento en las cepas trePP KO (columnas 9 y 10).

Las cepas TrePP KO acumulan trehalosa cuando se cultivan:

1. Con glucosa como fuente de carbono (GM17T, columnas 1 y 2)
2. Con glucosa como fuente de carbono y trehalosa extracelular (GM17T + trehalosa 500 mM, columnas 3 y 4)
3. Con maltosa como fuente de carbono (MM17T, columnas 5 y 6)
4. Con glucosa y maltosa como fuente de carbono (GM M17T, columnas 7 y 8)
5. Con maltosa como fuente de carbono y trehalosa extracelular (MM17T + trehalosa 500 mM, columnas 9 y 10)

Ejemplo 8: Supervivencia después de la liofilización

Experimental

Tabla 3 A: cultivo de 200L optimizado para el crecimiento (medio de fermentación libre de proteína animal) se concentró 10 veces mediante ultrafiltración y diafiltración y resuspensión en una mezcla crioprotectora concentrada (como se describe en el documento WO 2010/124855). El conteo de CFU por ml se determinó para la suspensión bacteriana. La suspensión se rellenó en bandejas analíticas y en volumen, las bandejas se pesaron y se liofilizaron. Para la evaluación de viabilidad, se reconstituyeron porciones de peso apropiadas liofilizadas con volúmenes apropiados de agua purificada y se determinó el recuento de CFU por ml. El % de viabilidad se determinó a partir de la relación de CFU antes y después de la liofilización.

Tabla 3 B: Cultivo durante la noche de 20 l (GM17T + trehalosa 500 mM) se concentró 100 veces mediante centrifugación y resuspensión en una mezcla crioprotectora concentrada (como se describe en el documento WO 2010/124855). El conteo de CFU por ml se determinó para la suspensión bacteriana. La suspensión se liofilizó en volumen y en viales (volumen de llenado de 2,5 ml). Para la evaluación de la viabilidad, se reconstituyeron viales de 2,5 ml liofilizados con 2,5 ml de agua purificada y se determinó el recuento de CFU por ml. El % de viabilidad se determinó a partir de la relación de CFU antes y después de la liofilización. 2 lotes de producción independientes (sAGX0167 y sAGX0309) producen > 100% de supervivencia después de la liofilización.

Ambos polvos (A) y (B) liofilizados se formularon adicionalmente con excipientes adecuados para estandarizar CFU/g. sAGX0037, sAGX0167 y sAGX0309 se rellenaron en cápsulas de HPMC a un mínimo de $1,2 \times 10^{11}$ UCU/cápsula. Las cápsulas se unieron con una película de celulosa y se recubrieron con ácido metacrílico - copolímeros de etilacrilato como una película de revestimiento entérico, para la administración dirigida al intestino delgado y al colon.

La trehalosa se determinó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

Como se indica en la Tabla 3, las cepas que pueden acumular trehalosa muestran una resistencia muy mejorada al estrés de secado experimentada durante el secado por congelamiento

Tabla 3

Cepa		biomasa formulada CFU/ml	Torta seca por congelamiento CFU/ml	Contenido de Trehalosa	supervivencia
sAGX0037 exp. 1	A	1.60×10^{11}	1.26×10^{11}	n/a	79 %
sAGX0037 exp. 2		1.50×10^{11}	1.47×10^{11}	n/a	98 %
sAGX0037 exp. 3		1.40×10^{11}	1.02×10^{11}	n/a	73 %
sAGX0037 exp. 4		1.50×10^{11}	1.26×10^{11}	n/a	84 %
sAGX0085 exp. 1		2.00×10^{11}	1.40×10^{11}	n/a	70 %
sAGX0085 exp. 2		1.60×10^{11}	1.42×10^{11}	n/a	89 %

sAGX0167 exp. 1	B	1.14 x 10 ¹¹	1.21 x 10 ¹¹	16.29 mg/g ww	106 %
sAGX0309 exp. 1		1.21 x 10 ¹¹	1.45 x 10 ¹¹	16.72 mg/g ww	120 %

Ejemplo 9: Supervivencia durante el paso intestinal a través del intestino porcino

Experimental

5

Las cerdas (> 150 kg) se equiparon quirúrgicamente con cánulas en el duodeno proximal y en el colon proximal. En la cánula duodenal, se insertaron sAGX0037 y sAGX0167 encapsulados y secados por congelamiento. Se tomaron muestras de contenido colónico de la cánula de colon a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas después de la administración. El % de viabilidad se determinó como la relación entre *L. lactis* en vivo (recuento de CFU) y total (vivo y muerto, análisis Q-PCR) en las muestras. Los números se dan en la Tabla 4.

10

Resultados

15

Las cepas que pueden acumular trehalosa muestran una supervivencia muy mejorada, independientemente de la alimentación o el estado de ayuno, en un sistema intestinal grande (cerdo).

20

La Tabla 4 y la Figura 8 indican que cuando se compara con sAGX0037 encapsulado y secado por congelamiento (Tabla 4 A), sAGX0167 encapsulado y secado por congelamiento (desarrollado para la acumulación de trehalosa intracelular; Tabla 4 B) aumenta la supervivencia durante el paso por el intestino porcino, tanto cuando los cerdos que ayunaron durante 24 horas (Figura 8 A) como durante la disponibilidad de alimento ad libitum (Figura 8 B).

Tabla 4

	Punto de tiempo	sAGX0037	sAGX0167	Valor p
En ayuno	T0	-	-	
	T2	8.5%	45.1%	0.033
	T4	3.0%	30.9%	0.001
	T6	4.5%	24.8%	0.044
	T8	1.9%	10.7%	0.176
	T10	0.0%	13.2%	
Alimentado	T0	-	-	
	T2	-	-	
	T4	0.0%	89%	0.001
	T6	0.0%	66%	0.173
	T8	0.0%	25%	0.203

25 Ejemplo 10: la trehalosa puede acumularse después de la producción de biomasa.

Experimental

30

Las cepas indicadas se cultivaron durante la noche en GM17T (16 horas a 30 °C) y se recogieron mediante centrifugación (15 min a 4000 rpm). Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en GM17T fresca + trehalosa 500 mM y se incubaron. El contenido de trehalosa intracelular se determinó a T = 0, 1, 2 y 4 horas como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

35

Como se indica en la Figura 9, la trehalosa se puede acumular después de la producción de biomasa, cuando las bacterias se incuban a lo largo del tiempo. Como se indica en la figura 9B, esto solo puede lograrse en cepas trePP KO (sAGX0090 frente a otras) y no requiere inserción o eliminación adicional de genes (sAGX0169). La presencia adicional de *otsB* (sAGX0167, sAGX0346, sAGX0354, sAGX0360) estimula la acumulación de trehalosa.

Ejemplo 11: La maltosa puede estimular la acumulación de trehalosa intracelular

Experimental

5 Las cepas indicadas se cultivaron durante la noche (ON; 16 horas a 30 °C) en GM17T, +/- 500mM de trehalosa, GM17T + 0.5% de maltosa (GMM17T) + trehalosa 500 mM o M17T + 0.5% de maltosa (MM17T) + Trehalosa 500 mM y se recogieron por centrifugación (15 min a 4000 rpm). El contenido de trehalosa intracelular se determinó como se describió en el Ejemplo 1.

10 Resultados

Como se indica en la Figura 10, la maltosa estimula la acumulación de trehalosa intracelular en cultivos crecidos durante la noche.

15 Ejemplo 12: la maltosa puede convertirse en trehalosa intracelular durante o después de la producción de biomasa

Experimental

20 Las cepas indicadas se cultivaron durante la noche (ON, 16 horas a 30 °C) en GM17T, las células se recogieron por centrifugación (15 min a 4000 rpm), resuspendido en M17T + 0.5% maltosa (MM17T e incubado durante 8 horas (> 8h MM17T). Alternativamente, las cepas indicadas se cultivaron ON en MM17T. El contenido de trehalosa intracelular se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

25 Resultados

Como se indica en la Figura 11, la maltosa puede convertirse en trehalosa intracelular durante o después de la producción de biomasa.

30 Abreviaturas

ADP	difosfato adenosina-5'
anti-TNF	Anticuerpo que reconoce el factor de necrosis tumoral
ATP	trifosfato adenosina-5'
celB	componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa
CFU	Unidad de formación de Colonia
COGs	Grupos de conjuntos de proteínas ortólogas
eno	gene enolasa (hidratasa fosfopiruvato) (ID de gen: 4797432)
gapB	gen gliceraldehído-3fosfato deshidrogenasa (ID de gen: 4797877)
Gene ID	Identificador de gen
GM17	Oxoid M17 + glucosa a 0.5 %
GM17T	Oxoid M17 + glucosa a 0.5 % + timidina at 0.2 mM
GMM17T	Oxoid M17 + glucosa a 0,5 % + maltosa a 0.5 % + timidina a 0.2 mM
hIL-10	interleuquina-10 humana
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
hTFF-1	Factor-1 trébol humano
KO	Inactivado; eliminación de genes, reemplazo de genes, interrupción de genes
M	Maltosa en 0.5 %
M17	Oxoid M17

ES 2 676 270 T3

M9	Sales M9 (Difco)
MM17	Oxoid M17 + maltosa en 0.5 %
MM17T	Oxoid M17 + maltosa en 0.5 % + timidina en 0.2 mM
n/a	no aplica
NADP ⁺	fosfato de dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADPH	fosfato reducido de dinucleótido de nicotinamida-adenina
OD _x	Densidad óptica en longitud de onda de x nm
otsA	Síntesis A de trehalosa osmoreguladora de <i>Escherichia coli</i> ; sintasa de trehalosa-6-fosfato
otsB	Síntesis B de trehalosa osmoreguladora de <i>Escherichia coli</i> ; trehalosa-6-fosfato fosfatasa
otsBA	Unidad de expresión acoplada para otsB y otsA
pgmB	3-fosfoglucomutasa (ID de gen: 4797271)
PhIIA	Promotor del gen de proteína de unión de ADN tipo HU (ID de gen: 4797353)
PtcC	Componente IIC del Sistema PTS específico para celobiosa
Ptre	promotor del operón de trehalosa
PTS	Sistema fosfotransferasa
rpmD	región Intergénica que precede el gen L30 de proteína ribosómica 50 S
T	Timidina en 0.2 mM
thyA	Gene sintasa de Timidilato (ID de gen: 4798358)
TNF	Factor de necrosis de tumor
trePP	Fosforilasa de trehalosa-6-fosfato (ID de gen: 4797140)
trePTC	Genes de fosfotransferasa putativa en el operón de trehalosa de <i>L. lactis</i> (llmg_0453 y llmg_0454; ID de gen: 4797778 e ID de gen: 4797093 respectivamente)
TX	Punto de tiempo X horas
uidA	Gen de beta-D-glucuronidasa de <i>Escherichia coli</i>
usp45	Gen de proteína 45-kDasecretada no identificada (ID de gen: 4797218)
wt	Tipo silvestre
ww	Peso de sedimento celular en húmedo

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Actogenix N.V.
 <120> Bacterias gram positivas y usos de los mismos
 <130> AGX-032-PCT
- <150> 11182643.4
 <151> 2011-09-23
 10 <160> 13
- <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 2310

ES 2 676 270 T3

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 1

atgactgata aagattggat gatccaatat gacaaacaag aagtagggaa gcgttcttat 60
 gggcaagaat ctttaatgtc attgggaaat ggttatntag ggcttcgtgg ggcgcctttg 120
 tgggcaactt gttcggataa tcattatccg ggactctatg tcgcaggggt ctttaatcac 180
 acaagtacag aagttgcagg tcatgatggt atcaacgaag atatggtcaa ttggccaaat 240
 ccacaattga ttaaggttta tattgataat gaattggttg acttcgagggc agcaattgag 300
 aaaaattctt cgattgattt caaaaatgga ttgcaaattg agagctataa tgtcagttta 360
 gccaaaggag gtttgacttt agtgaccaca aaatttggtg atcccatcca ttttcacgat 420
 tttgggttcg ttggagaaat catcgctgat ttttctggaa aattgcgaat agaaactttt 480
 attgatggtt cggatttgaa tcaaaatggt gaacgctatc gggcttttga cagcaaagaa 540
 tttgaagtga ctcaaattgc tgatggactt ttggtggcaa aaactagaac gacggacata 600
 gaattagcag ttgcgactaa aacttattta aatggtcagc cattgaaaaa agtagaatct 660
 ggaaattctg aaatttttaa agaatccatt gaagttgatt tactaaaaaa ccaagaagtt 720
 cagtttgaaa aatcgattgt tattgctagt tcttatgaaa ccaaaaacc tgttgaattt 780
 gtgctgacag aactggcagc aacttctgtc agtaaaattc aggaaaataa tgcaaattat 840
 tgggagaaag tatggcagga tggcgatatt gtcacgaat ctgatcatgc ggatttgcaa 900
 agaatggtgc gaatgaatat tttccatatt cgccaagcgg cacaacacgg tgctaatacag 960
 tttttagatg cgtccgtagg ttcgcgtgga ttgactggtg aaggttatcg aggacatatt 1020
 ttctgggatg aaatttttgt tctaccttat tatgcggcga atgaaccaga aacagcgcgt 1080
 gatttgcttt tgtaccgaat caatcgattg actgctgcac aggaaaatgc aaaggttgat 1140
 ggagaaatag gggcaatggt tccttggcaa tccggcttaa ttggggatga acaggcacia 1200
 tttgttcatt tgaatacagt aaataatgaa tgggaaccag ataatagtcg ccgtcaaaga 1260

ES 2 676 270 T3

catgtcagct tagctattgt ttacaatctg tggatttact tacagctgac agatgatgaa 1320
 agtattttga ctgacggtgg actggatttg ctcgttgaaa ccacgaagtt ttggttaaac 1380
 aaagcagaat tgggaagtga tagccgctat catatcgctg gtgtcatggg tcctgatgaa 1440
 tatcatgagg cttatccagg gcaagaaggt ggtatttgcg ataatgctta tacgaatttg 1500
 atgctgactt ggcagttaaa ttggctgaca gagctgtcag tgaaaggttt tgaaattcca 1560
 gcagatttgc ttgaagagtc acaaaagggt cgggaaaatc tttatttaga tattgatgag 1620
 aatggtgtga ttgcccaata tgctaagtat tttgagctta aagaagttga ttttgcagct 1680
 tatgaagcaa aatatggcga tattcatcgg attgaccgtt tgatgaaggc tgaggggaatt 1740
 tcgcctgacg aatatcaagt ggctaaacaa gctgatacct tgatgttaat gtacaatttg 1800
 ggtcatgaac atgtgatcaa attggtcaaa caattaggtt atgagctacc caaaaattgg 1860
 ttgaaagtta atcgtgatta ttatcttgca cgaactgtcc atggttcaac gacatctcgt 1920
 ccagtttttg ctgggattga tgtcaaattg ggtgattttg atgaagcgct tgacttttta 1980
 atcactgcga ttggaagtga ttactatgat attcaaggcg gaaccacggc cgaaggggtt 2040
 cacattgggg tcatgggaga aacacttgaa gtgattcaaa atgaatttgc cggtttgaca 2100
 ctacgcgatg gatacttttc aattgctccg catttaccaa aaagttggac caaattgaaa 2160
 ttcagtcaaa ttttcaaagg ttgtcaagtg gaaattttga ttgaaaaagg tcaattatta 2220
 ctgacagctt catcagactt gctgattaaa gtttatgatg aggaagttca gttaaaagca 2280
 ggagtacaag ctaattttga tttaaaataa 2310

<210> 2

<211> 769

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 2

5

ES 2 676 270 T3

Met Thr Asp Lys Asp Trp Met Ile Gln Tyr Asp Lys Gln Glu Val Gly
 1 5 10 15

Lys Arg Ser Tyr Gly Gln Glu Ser Leu Met Ser Leu Gly Asn Gly Tyr
 20 25 30

Leu Gly Leu Arg Gly Ala Pro Leu Trp Ala Thr Cys Ser Asp Asn His
 35 40 45

Tyr Pro Gly Leu Tyr Val Ala Gly Val Phe Asn His Thr Ser Thr Glu
 50 55 60

Val Ala Gly His Asp Val Ile Asn Glu Asp Met Val Asn Trp Pro Asn
 65 70 75 80

ES 2 676 270 T3

Pro Gln Leu Ile Lys Val Tyr Ile Asp Asn Glu Leu Val Asp Phe Glu
85 90 95

Ala Ala Ile Glu Lys Asn Ser Ser Ile Asp Phe Lys Asn Gly Leu Gln
100 105 110

Ile Glu Ser Tyr Asn Val Ser Leu Ala Lys Gly Gly Leu Thr Leu Val
115 120 125

Thr Thr Lys Phe Val Asp Pro Ile His Phe His Asp Phe Gly Phe Val
130 135 140

Gly Glu Ile Ile Ala Asp Phe Ser Gly Lys Leu Arg Ile Glu Thr Phe
145 150 155 160

Ile Asp Gly Ser Val Leu Asn Gln Asn Val Glu Arg Tyr Arg Ala Phe
165 170 175

Asp Ser Lys Glu Phe Glu Val Thr Gln Ile Ala Asp Gly Leu Leu Val
180 185 190

Ala Lys Thr Arg Thr Thr Asp Ile Glu Leu Ala Val Ala Thr Lys Thr
195 200 205

Tyr Leu Asn Gly Gln Pro Leu Lys Lys Val Glu Ser Gly Asn Ser Glu
210 215 220

Ile Phe Lys Glu Ser Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gln Glu Val
225 230 235 240

Gln Phe Glu Lys Ser Ile Val Ile Ala Ser Ser Tyr Glu Thr Lys Asn
245 250 255

Pro Val Glu Phe Val Leu Thr Glu Leu Ala Ala Thr Ser Val Ser Lys
260 265 270

Ile Gln Glu Asn Asn Ala Asn Tyr Trp Glu Lys Val Trp Gln Asp Gly
275 280 285

Asp Ile Val Ile Glu Ser Asp His Ala Asp Leu Gln Arg Met Val Arg
290 295 300

Met Asn Ile Phe His Ile Arg Gln Ala Ala Gln His Gly Ala Asn Gln
305 310 315 320

Phe Leu Asp Ala Ser Val Gly Ser Arg Gly Leu Thr Gly Glu Gly Tyr
325 330 335

ES 2 676 270 T3

Arg Gly His Ile Phe Trp Asp Glu Ile Phe Val Leu Pro Tyr Tyr Ala
 340 345 350

Ala Asn Glu Pro Glu Thr Ala Arg Asp Leu Leu Leu Tyr Arg Ile Asn
 355 360 365

Arg Leu Thr Ala Ala Gln Glu Asn Ala Lys Val Asp Gly Glu Ile Gly
 370 375 380

Ala Met Phe Pro Trp Gln Ser Gly Leu Ile Gly Asp Glu Gln Ala Gln
 385 390 395 400

Phe Val His Leu Asn Thr Val Asn Asn Glu Trp Glu Pro Asp Asn Ser
 405 410 415

Arg Arg Gln Arg His Val Ser Leu Ala Ile Val Tyr Asn Leu Trp Ile
 420 425 430

Tyr Leu Gln Leu Thr Asp Asp Glu Ser Ile Leu Thr Asp Gly Gly Leu
 435 440 445

Asp Leu Leu Val Glu Thr Thr Lys Phe Trp Leu Asn Lys Ala Glu Leu
 450 455 460

Gly Ser Asp Ser Arg Tyr His Ile Ala Gly Val Met Gly Pro Asp Glu
 465 470 475 480

Tyr His Glu Ala Tyr Pro Gly Gln Glu Gly Gly Ile Cys Asp Asn Ala
 485 490 495

Tyr Thr Asn Leu Met Leu Thr Trp Gln Leu Asn Trp Leu Thr Glu Leu
 500 505 510

Ser Val Lys Gly Phe Glu Ile Pro Ala Asp Leu Leu Glu Glu Ser Gln
 515 520 525

Lys Val Arg Glu Asn Leu Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Asn Gly Val Ile
 530 535 540

Ala Gln Tyr Ala Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Glu Val Asp Phe Ala Ala
 545 550 555 560

Tyr Glu Ala Lys Tyr Gly Asp Ile His Arg Ile Asp Arg Leu Met Lys
 565 570 575

Ala Glu Gly Ile Ser Pro Asp Glu Tyr Gln Val Ala Lys Gln Ala Asp

ES 2 676 270 T3

	580		585		590														
Thr	Leu	Met	Leu	Met	Tyr	Asn	Leu	Gly	His	Glu	His	Val	Ile	Lys	Leu				
		595					600					605							
Val	Lys	Gln	Leu	Gly	Tyr	Glu	Leu	Pro	Lys	Asn	Trp	Leu	Lys	Val	Asn				
	610					615					620								
Arg	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Thr	Val	His	Gly	Ser	Thr	Thr	Ser	Arg				
625					630					635					640				
Pro	Val	Phe	Ala	Gly	Ile	Asp	Val	Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Asp	Glu	Ala				
				645					650					655					
Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	Ala	Ile	Gly	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Gln				
			660					665					670						
Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Glu	Gly	Val	His	Ile	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Thr				
		675					680					685							
Leu	Glu	Val	Ile	Gln	Asn	Glu	Phe	Ala	Gly	Leu	Thr	Leu	Arg	Asp	Gly				
	690					695					700								
Tyr	Phe	Ser	Ile	Ala	Pro	His	Leu	Pro	Lys	Ser	Trp	Thr	Lys	Leu	Lys				
705					710					715					720				
Phe	Ser	Gln	Ile	Phe	Lys	Gly	Cys	Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Ile	Glu	Lys				
				725					730					735					
Gly	Gln	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Lys	Val	Tyr				
		740						745					750						
Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Ala	Asn	Phe	Asp	Leu				
	755						760					765							

Lys

- <210> 3
- <211> 801
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- <400> 3

ES 2 676 270 T3

```

gtgacagaac cgtaaccga aaccocctgaa ctatcogcga aatatgcctg gttttttgat    60
cttgatggaa cgotggogga aatcaaacog catccogate aggtcgtcgt gcttgacaat    120
attctgcaag gactacagct actggcaaac gcaagtgatg gtgcattggc attgatatca    180

gggcgctcaa tgggtggagct tgaocgactg gcaaaacctt atcgttccc gttagcgggc    240
gtgcatgggg cggagcgccg tgacatcaat ggtaaacac atatcgttca tctgcgggat    300
gcgattgcgc gtgatattag cgtgcaactg catacagtca tcgctcagta tcccggcgcg    360
gagctggagg cgaaagggat ggcttttgog ctgcattatc gtcaggctcc gcagcatgaa    420
gaocgattaa tgacattagc gcaacgtatt actcagatct ggccacaaat ggcgttacag    480
cagggaaagt gtgttgtoga gatcaaacog agaggtacca gtaaaggatga ggcaattgca    540
gcttttatgc aggaagctcc ctttatoggg cgaaocgocog tatttctggg cgatgattta    600
accgatgaat ctggcttcgc agtcgttaac cgactgggog gaatgtcagt aaaaattggc    660
acaggtgcaa ctcaggcatc atggcgactg gcgggtgtgc cggatgtctg gagctggctt    720
gaaatgataa ccacgcatt acaacaaaaa agagaaaata acaggagtga tgactatgag    780
tcgtttagtc gtagtatcta a                                          801

```

<210> 4

5 <211> 266

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

10

ES 2 676 270 T3

Met Thr Glu Pro Leu Thr Glu Thr Pro Glu Leu Ser Ala Lys Tyr Ala
 1 5 10 15

Trp Phe Phe Asp Leu Asp Gly Thr Leu Ala Glu Ile Lys Pro His Pro
 20 25 30

Asp Gln Val Val Val Pro Asp Asn Ile Leu Gln Gly Leu Gln Leu Leu
 35 40 45

Ala Thr Ala Ser Asp Gly Ala Leu Ala Leu Ile Ser Gly Arg Ser Met
 50 55 60

Val Glu Leu Asp Ala Leu Ala Lys Pro Tyr Arg Phe Pro Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Val His Gly Ala Glu Arg Arg Asp Ile Asn Gly Lys Thr His Ile Val
 85 90 95

His Leu Pro Asp Ala Ile Ala Arg Asp Ile Ser Val Gln Leu His Thr
 100 105 110

Val Ile Ala Gln Tyr Pro Gly Ala Glu Leu Glu Ala Lys Gly Met Ala
 115 120 125

Phe Ala Leu His Tyr Arg Gln Ala Pro Gln His Glu Asp Ala Leu Met

ES 2 676 270 T3

130						135						140			
Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Thr	Gln	Ile	Trp	Pro	Gln	Met	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160
Gln	Gly	Lys	Cys	Val	Val	Glu	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Thr	Ser	Lys	Gly
			165					170						175	
Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Phe	Met	Gln	Glu	Ala	Pro	Phe	Ile	Gly	Arg	Thr
			180					185					190		
Pro	Val	Phe	Leu	Gly	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Phe	Ala	Val
		195					200					205			
Val	Asn	Arg	Leu	Gly	Gly	Met	Ser	Val	Lys	Ile	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr
	210					215					220				
Gln	Ala	Ser	Trp	Arg	Leu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp	Val	Trp	Ser	Trp	Leu
225					230					235					240
Glu	Met	Ile	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Gln	Lys	Arg	Glu	Asn	Asn	Arg	Ser
				245					250					255	
Asp	Asp	Tyr	Glu	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	Ile						
			260					265							

<210> 5
 <211> 1425
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 5

5

ES 2 676 270 T3

```

atgagtcggt tagtcgtagt atctaaccgg attgcaccac cagacgagca cgccgccagt      60
gcoggtggcc ttgocgttgg catactgggg gcaactgaaag cogcaggcgg actgtggttt      120
ggctggagtg gtgaaacagg gaatgaggat cagcgcctaa aaaaggtgaa aaaaggtaac      180
attacgtggg cctcttttaa cctcagcgaa caggaccttg acgaatacta caaccaattc      240
tccaatgcog ttctctggcc ogcttttcat tatcggctcg atctggtgca atttcagcgt      300
cctgcctggg acggctatct acgogtaaat gogttgctgg cagataaatt actgcogctg      360
ttgcaagacg atgacattat ctggatccac gattatcacc tgttgccatt tgogcatgaa      420
ttaogcaaac ggggagtgaa taatogcatt ggtttctttc tgcataattc tttccogaca      480
coggaaatct tcaacogcgt gcogacatat gacaccttgc ttgaacagct ttgtgattat      540
gatttgctgg gtttccagac agaaaacgat cgtctggcgt tectggattg tctttctaac      600
ctgaccocgg tcacgacacg tagcgcaaaa agccatacag cctggggcaa agcatttcga      660
acagaagtct acccgatcgg cattgaaccg aaagaaatag ccaaacaggc tgccgggcca      720
ctgccgccaa aactggcgca acttaaagcg gaactgaaaa acgtacaaaa tatcttttct      780
gtogaaocgc tggattatct caaaggtttg ccagagcgtt ttctogccta tgaagcgttg      840
ctggaaaaat atccgcagca tcatggtaaa attcgttata cccagattgc accaacgtcg      900
cgtggtgatg tgcaagccta tcaggatatt cgtcatcagc togaaaatga agctggacga      960
attaatggtg aatacgggca attaggctgg acgcgccttt attatttgaa tcagcatttt     1020
gaocgtaaat tactgatgaa aatattcogc tactctgacg tgggcttagt gacgccactg     1080
cgtgacggga tgaacctggt agcaaaagag tatgttgctg ctcaggaccc agccaatcog     1140
ggogttcttg ttctttogca atttgocggg gggcaaaocg agttaacgtc ggcgtaatt     1200
gttaacccct acgatcgtga ogaagttgca gctgocctgg atcgtgcatt gactatgtcg     1260
ctggcggaac gtatttcccg tcatgcagaa atgctggacg ttatcgtgaa aaacgatatt     1320
aaccactggc aggagtgcct cattagcgac ctaaagcaga tagttccgcg aagcgcggaa     1380
agccagcagc gcgataaagt tgctaccttt ccaaagcttg cgtag                          1425

```

<210> 6
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 6

ES 2 676 270 T3

Met Ser Arg Leu Val Val Val Ser Asn Arg Ile Ala Pro Pro Asp Glu
 1 5 10 15

His Ala Ala Ser Ala Gly Gly Leu Ala Val Gly Ile Leu Gly Ala Leu
 20 25 30

Lys Ala Ala Gly Gly Leu Trp Phe Gly Trp Ser Gly Glu Thr Gly Asn
 35 40 45

Glu Asp Gln Pro Leu Lys Lys Val Lys Lys Gly Asn Ile Thr Trp Ala
 50 55 60

Ser Phe Asn Leu Ser Glu Gln Asp Leu Asp Glu Tyr Tyr Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Asn Ala Val Leu Trp Pro Ala Phe His Tyr Arg Leu Asp Leu Val
 85 90 95

Gln Phe Gln Arg Pro Ala Trp Asp Gly Tyr Leu Arg Val Asn Ala Leu
 100 105 110

Leu Ala Asp Lys Leu Leu Pro Leu Leu Gln Asp Asp Asp Ile Ile Trp

ES 2 676 270 T3

115		120		125											
Ile	His	Asp	Tyr	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	His	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg
130						135					140				
Gly	Val	Asn	Asn	Arg	Ile	Gly	Phe	Phe	Leu	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Thr
145					150					155					160
Pro	Glu	Ile	Phe	Asn	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Leu	Glu	Gln
				165					170					175	
Leu	Cys	Asp	Tyr	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Gln	Thr	Glu	Asn	Asp	Arg	Leu
			180					185					190		
Ala	Phe	Leu	Asp	Cys	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Arg	Val	Thr	Thr	Arg	Ser
		195					200					205			
Ala	Lys	Ser	His	Thr	Ala	Trp	Gly	Lys	Ala	Phe	Arg	Thr	Glu	Val	Tyr
	210					215					220				
Pro	Ile	Gly	Ile	Glu	Pro	Lys	Glu	Ile	Ala	Lys	Gln	Ala	Ala	Gly	Pro
225					230					235					240
Leu	Pro	Pro	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Lys	Asn	Val	Gln
				245					250					255	
Asn	Ile	Phe	Ser	Val	Glu	Arg	Leu	Asp	Tyr	Ser	Lys	Gly	Leu	Pro	Glu
			260					265					270		
Arg	Phe	Leu	Ala	Tyr	Glu	Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Gln	His	His
		275					280					285			
Gly	Lys	Ile	Arg	Tyr	Thr	Gln	Ile	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Asp	Val
	290					295					300				
Gln	Ala	Tyr	Gln	Asp	Ile	Arg	His	Gln	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg
305					310					315					320
Ile	Asn	Gly	Lys	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gly	Trp	Thr	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Leu
				325					330					335	
Asn	Gln	His	Phe	Asp	Arg	Lys	Leu	Leu	Met	Lys	Ile	Phe	Arg	Tyr	Ser
			340					345					350		
Asp	Val	Gly	Leu	Val	Thr	Pro	Leu	Arg	Asp	Gly	Met	Asn	Leu	Val	Ala
		355					360					365			

ES 2 676 270 T3

Lys Glu Tyr Val Ala Ala Gln Asp Pro Ala Asn Pro Gly Val Leu Val
370 375 380

Leu Ser Gln Phe Ala Gly Ala Ala Asn Glu Leu Thr Ser Ala Leu Ile
385 390 395 400

Val Asn Pro Tyr Asp Arg Asp Glu Val Ala Ala Ala Leu Asp Arg Ala
405 410 415

Leu Thr Met Ser Leu Ala Glu Arg Ile Ser Arg His Ala Glu Met Leu
420 425 430

Asp Val Ile Val Lys Asn Asp Ile Asn His Trp Gln Glu Cys Phe Ile
435 440 445

Ser Asp Leu Lys Gln Ile Val Pro Arg Ser Ala Glu Ser Gln Gln Arg
450 455 460

Asp Lys Val Ala Thr Phe Pro Lys Leu Ala
465 470

<210> 7

<211> 1338

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

5

<400> 7

ES 2 676 270 T3

atgaacaatt	ttattcaaaa	caaaatcatg	octocaatga	tgaattttt	gaataccogt	60
gcagtcacgg	caatcaaaaa	tggtatgatt	tatocatatc	catttatcat	tattggttca	120
gtattcttga	ttcttggtea	actgccatte	caagcaggac	aagacttcat	gaacaaaatc	180
aaattgggoc	cactcttttt	acaaattaat	aatgcttcat	ttggtattat	ggctttgctt	240
gcogtggtcg	gtattgctta	cgcttggggt	cgagatgcag	gttatgaagg	agtaccogct	300
ggtttaacag	gtgtcattgt	tcacatcttg	ttgcaaccag	acacaatcca	tcaagtaaca	360
agtgttactg	acccaactaa	aacatcaaca	gcatttcaag	taggtggtgt	cattgaccga	420
gcttggttag	gtgggaaagg	gatggttctc	tcaatcatcg	ttggactctt	agtaggttgg	480
atttacactg	gctttatgog	toggaacatc	acaatcaaaa	tgccagaaca	agttccagaa	540
aaogttgocg	catcatttac	ttcacttgta	octgcaggag	caatcattac	aatggctggt	600
gtggttcatg	gaatcacaac	gattggcttc	aacacaactt	tcattgagtt	agtttataaa	660
tggattcasa	caccattgca	acacgtgact	gacggtcogg	ttggggctct	cgttattgoc	720
tttatgccag	tatttatctg	gtggttcggt	gttcacggag	cgacaatcat	tggtgggatt	780
atgggaccat	tgcttcaagc	aaactctgct	gacaatgctg	ctctctacaa	agcaggacat	840
cttagcctgt	caaatggcgc	ccatategtt	actcaatcat	ttatggacca	atacttgaca	900
gtaactggtt	ctggtttgac	cattggtttg	gttatcttcc	tcttagtgag	tgcaaatca	960
gttcaaggta	aaactttagg	acgaatggaa	attggacctg	cagtattcaa	tatcaacgaa	1020
ccatattctgt	ttggacttcc	tatcgttttg	aatccaatc	ttgetattcc	atztatcttg	1080
gctccggtga	tttcaggaat	tttgacttac	ttagtgattt	atctaggaat	cattccacca	1140
tttaatggtg	octatgctcc	ttggacaacc	octgoggtct	tgtcaggata	tctagtaggt	1200
ggctggcaag	gtatggtttg	gcaaattatt	attcttgctt	tgaccacagt	tctctattgg	1260
ccatttgoca	aagcttatga	caatattctt	ctgaaagaag	aagctgaaac	agaagctgga	1320
attaatgctg	ccgaataa					1338

<210> 8
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis
 <400> 8

5

ES 2 676 270 T3

Met Asn Asn Phe Ile Gln Asn Lys Ile Met Pro Pro Met Met Lys Phe
1 5 10 15

Leu Asn Thr Arg Ala Val Thr Ala Ile Lys Asn Gly Met Ile Tyr Pro
20 25 30

Ile Pro Phe Ile Ile Ile Gly Ser Val Phe Leu Ile Leu Gly Gln Leu
35 40 45

Pro Phe Gln Ala Gly Gln Asp Phe Met Asn Lys Ile Lys Leu Gly Pro
50 55 60

Leu Phe Leu Gln Ile Asn Asn Ala Ser Phe Gly Ile Met Ala Leu Leu
65 70 75 80

Ala Val Phe Gly Ile Ala Tyr Ala Trp Val Arg Asp Ala Gly Tyr Glu
85 90 95

Gly Val Pro Ala Gly Leu Thr Gly Val Ile Val His Ile Leu Leu Gln
100 105 110

Pro Asp Thr Ile His Gln Val Thr Ser Val Thr Asp Pro Thr Lys Thr
115 120 125

Ser Thr Ala Phe Gln Val Gly Gly Val Ile Asp Arg Ala Trp Leu Gly
130 135 140

Gly Lys Gly Met Val Leu Ser Ile Ile Val Gly Leu Leu Val Gly Trp
145 150 155 160

ES 2 676 270 T3

Ile Tyr Thr Gly Phe Met Arg Arg Asn Ile Thr Ile Lys Met Pro Glu
 165 170 175

Gln Val Pro Glu Asn Val Ala Ala Ser Phe Thr Ser Leu Val Pro Ala
 180 185 190

Gly Ala Ile Ile Thr Met Ala Gly Val Val His Gly Ile Thr Thr Ile
 195 200 205

Gly Phe Asn Thr Thr Phe Ile Glu Leu Val Tyr Lys Trp Ile Gln Thr
 210 215 220

Pro Leu Gln His Val Thr Asp Gly Pro Val Gly Val Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240

Phe Met Pro Val Phe Ile Trp Trp Phe Gly Val His Gly Ala Thr Ile
 245 250 255

Ile Gly Gly Ile Met Gly Pro Leu Leu Gln Ala Asn Ser Ala Asp Asn
 260 265 270

Ala Ala Leu Tyr Lys Ala Gly His Leu Ser Leu Ser Asn Gly Ala His
 275 280 285

Ile Val Thr Gln Ser Phe Met Asp Gln Tyr Leu Thr Val Thr Gly Ser
 290 295 300

Gly Leu Thr Ile Gly Leu Val Ile Phe Leu Leu Val Ser Ala Lys Ser
 305 310 315 320

Val Gln Gly Lys Thr Leu Gly Arg Met Glu Ile Gly Pro Ala Val Phe
 325 330 335

Asn Ile Asn Glu Pro Ile Leu Phe Gly Leu Pro Ile Val Leu Asn Pro
 340 345 350

Ile Leu Ala Ile Pro Phe Ile Leu Ala Pro Leu Ile Ser Gly Ile Leu
 355 360 365

Thr Tyr Leu Val Ile Tyr Leu Gly Ile Ile Pro Pro Phe Asn Gly Ala
 370 375 380

Tyr Val Pro Trp Thr Thr Pro Ala Val Leu Ser Gly Tyr Leu Val Gly
 385 390 395 400

Gly Trp Gln Gly Met Val Trp Gln Ile Ile Ile Leu Ala Leu Thr Thr

ES 2 676 270 T3

405

410

415

Val Leu Tyr Trp Pro Phe Ala Lys Ala Tyr Asp Asn Ile Leu Leu Lys
 420 425 430

Glu Glu Ala Glu Thr Glu Ala Gly Ile Asn Ala Ala Glu
 435 440 445

<210> 9
 <211> 486
 <212> ADN
 <213> Lactococcus lactis

5

<400> 9
 atgtttggaa taggaaaaaa gaaagaattg agagatgata aaagccttta tgctccagtt 60
 tctggggaag ttatcaacct ttcaacagtc aacgaccccg tattttcaaa aaagataatg 120
 ggagacgggt tcgcggttga gccaaaagaa aataaaattt ttgccccagt ttctgcaaaa 180
 gtaactttgg ttcaaggaca tgcaattggt tttaaactgt ctgatggctt agatgtactt 240
 ttacatcttg gaattgatac agtagctctt aaaggtcttc attttaaagt caaggtcaaa 300
 gttgatgata ttgtcaatgg tggtgatgag cttggaagcg ttgattgggc acagattgaa 360
 gctgcaggtt tagataaaac gacaatggtt atctttacaa atacaaaaga taaactctct 420
 gagttcaatg tcaattatgg accagctact tctggaagtg aacttggtaa ggcaagtgtt 480
 aaataa 486

10

<210> 10
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

15

<400> 10
 Met Phe Gly Ile Gly Lys Lys Lys Glu Leu Arg Asp Asp Lys Ser Leu
 1 5 10 15
 Tyr Ala Pro Val Ser Gly Glu Val Ile Asn Leu Ser Thr Val Asn Asp
 20 25 30
 Pro Val Phe Ser Lys Lys Ile Met Gly Asp Gly Phe Ala Val Glu Pro
 35 40 45
 Lys Glu Asn Lys Ile Phe Ala Pro Val Ser Ala Lys Val Thr Leu Val
 50 55 60
 Gln Gly His Ala Ile Gly Phe Lys Arg Ala Asp Gly Leu Asp Val Leu
 65 70 75 80

ES 2 676 270 T3

Leu His Leu Gly Ile Asp Thr Val Ala Leu Lys Gly Leu His Phe Lys
85 90 95

Ile Lys Val Lys Val Asp Asp Ile Val Asn Gly Gly Asp Glu Leu Gly
100 105 110

Ser Val Asp Trp Ala Gln Ile Glu Ala Ala Gly Leu Asp Lys Thr Thr
115 120 125

Met Val Ile Phe Thr Asn Thr Lys Asp Lys Leu Ser Glu Phe Asn Val
130 135 140

Asn Tyr Gly Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Leu Gly Lys Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys

- <210> 11
- <211> 1566
- <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis

- <400> 11

5

ES 2 676 270 T3

atggcaaat attcacaact tggacagaa attatogcaa atgtagggtg egctgagaat 60
gtcacaaaag ttattcaactg tatcaactegt cttcgtttta ccttgaaaga caaagataaa 120
gcagatacgg cggcgattga agccttaact ggtgtogctg gagctgttta taactcaaac 180
ttgaatcaat atcaagtagt tattggacaa gctgtagaag atgtttatga cgaggttgtt 240
gaacagcttg gagattcagt tgttgatgaa gatgcaacgg cgcaagcact tgctgcaaca 300
gcaccggcta gtggtaaaaa acaaaatcca attgttcatt cttccaagt ggttattggg 360
acaattacag gttogatgat tccaattatt ggtttacttg cggctggtgg gatgattaat 420
ggattattaa gtatctttgt taaaggaaat cgtttaattg aagtgattga cctgcaagt 480
tcaacttaog tcattatctc aactctagca atgacaccat tttatttctt aactgtttta 540
gtaggatttt cagcagcaaa acaattagca cctaaagata ctgttttaca atttattggt 600
gctgctgttg gtggtttcat gattaatcca gggattacta acttggtaaa tgctcatgtt 660
ggaacaaatg cggccggtaa aaatgttgtt gttgaagcag cagctccagt agcaaattdc 720
cttgagatca cttttaatac aagttatddd ggaattcogg ttgotttgcg aagttatgct 780
tatacaattd tccaatcat tgtggggta gcaatogcta aacdtttgaa tgcttggttg 840
aaaaaggttd taccacttgc cttgogtcca attttccac cgatgattac tttcttcatc 900
actgcttcaa tcattttact cttggtoggt cctgttattt caacaatttc atctgggttg 960
tcattogtta ttgaccatat cttgtcatta aacttaggga ttgcaagtat tatogctoggt 1020
ggtttgtatc aatgtttggt tatatttgggt ttgcaactggt tggttgtacc acttatttca 1080
caagagttgg cagcaacagg agcaagctca cttaatatga ttgttagctt cacaatgctt 1140
ggcaaggag ttggtgcctt gactgtcttc tttaaatcta aaaaagctga ccttaaagga 1200
ctttctgctc cagctgccat ttoggctttt tgtggagtaa ctgaacctgc catgtaogga 1260
attaacttga aatatgttcg cgtcttcate atgtcttcaa ttggtgcagc aattggtgct 1320
gggattgocg gatttgggtg cttacaaatg tttggatttt cagggtcatt gattagtttt 1380
cctaacttta tctctaatec attgacgcac catgcacctg cgggtaactt aatgctcttc 1440
tggattgoca ctgocgtatg tgcgtttgce actttcttat tagtttgggt ctttggttac 1500
aaggatactg atgtcatggg acaaggagtt gaacaaaaaa atgcatttaa ggatgctgta 1560
aaataa 1566

<210> 12
<211> 521
<212> PRT
<213> Lactococcus lactis

5

<400> 12

ES 2 676 270 T3

Met Ala Asn Tyr Ser Gln Leu Ala Thr Glu Ile Ile Ala Asn Val Gly
1 5 10 15

Gly Ala Glu Asn Val Thr Lys Val Ile His Cys Ile Thr Arg Leu Arg
20 25 30

Phe Thr Leu Lys Asp Lys Asp Lys Ala Asp Thr Ala Ala Ile Glu Ala
35 40 45

Leu Pro Gly Val Ala Gly Ala Val Tyr Asn Ser Asn Leu Asn Gln Tyr
50 55 60

Gln Val Val Ile Gly Gln Ala Val Glu Asp Val Tyr Asp Glu Val Val
65 70 75 80

Glu Gln Leu Gly Asp Ser Val Val Asp Glu Asp Ala Thr Ala Gln Ala
85 90 95

Leu Ala Ala Thr Ala Pro Ala Ser Gly Lys Lys Gln Asn Pro Ile Val
100 105 110

His Ala Phe Gln Val Val Ile Gly Thr Ile Thr Gly Ser Met Ile Pro
115 120 125

Ile Ile Gly Leu Leu Ala Ala Gly Gly Met Ile Asn Gly Leu Leu Ser
130 135 140

ES 2 676 270 T3

Ile Phe Val Lys Gly Asn Arg Leu Ile Glu Val Ile Asp Pro Ala Ser
145 150 155 160

Ser Thr Tyr Val Ile Ile Ser Thr Leu Ala Met Thr Pro Phe Tyr Phe
165 170 175

Leu Pro Val Leu Val Gly Phe Ser Ala Ala Lys Gln Leu Ala Pro Lys
180 185 190

Asp Thr Val Leu Gln Phe Ile Gly Ala Ala Val Gly Gly Phe Met Ile
195 200 205

Asn Pro Gly Ile Thr Asn Leu Val Asn Ala His Val Gly Thr Asn Ala
210 215 220

Ala Gly Lys Asn Val Val Val Glu Ala Ala Ala Pro Val Ala Asn Phe
225 230 235 240

Leu Gly Val Thr Phe Asn Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro Val Ala Leu
245 250 255

Pro Ser Tyr Ala Tyr Thr Ile Phe Pro Ile Ile Val Ala Val Ala Ile
260 265 270

Ala Lys Pro Leu Asn Ala Trp Leu Lys Lys Val Leu Pro Leu Ala Leu
275 280 285

Arg Pro Ile Phe Gln Pro Met Ile Thr Phe Phe Ile Thr Ala Ser Ile
290 295 300

Ile Leu Leu Leu Val Gly Pro Val Ile Ser Thr Ile Ser Ser Gly Leu
305 310 315 320

Ser Phe Val Ile Asp His Ile Leu Ser Leu Asn Leu Gly Ile Ala Ser
325 330 335

Ile Ile Val Gly Gly Leu Tyr Gln Cys Leu Val Ile Phe Gly Leu His
340 345 350

Trp Leu Val Val Pro Leu Ile Ser Gln Glu Leu Ala Ala Thr Gly Ala
355 360 365

Ser Ser Leu Asn Met Ile Val Ser Phe Thr Met Leu Ala Gln Gly Val
370 375 380

Gly Ala Leu Thr Val Phe Phe Lys Ser Lys Lys Ala Asp Leu Lys Gly

ES 2 676 270 T3

385					390						395					400
Leu	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ile	Ser	Ala	Phe	Cys	Gly	Val	Thr	Glu	Pro	
				405					410					415		
Ala	Met	Tyr	Gly	Ile	Asn	Leu	Lys	Tyr	Val	Arg	Val	Phe	Ile	Met	Ser	
			420					425					430			
Ser	Ile	Gly	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Phe	Gly	Gly	Leu	
		435					440					445				
Gln	Met	Phe	Gly	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Ser	Phe	Pro	Asn	Phe	Ile	
	450					455					460					
Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	His	His	Ala	Pro	Ala	Gly	Asn	Leu	Met	Leu	Phe	
465					470					475					480	
Trp	Ile	Ala	Thr	Ala	Val	Cys	Ala	Val	Ala	Thr	Phe	Leu	Leu	Val	Trp	
				485					490					495		
Phe	Phe	Gly	Tyr	Lys	Asp	Thr	Asp	Val	Met	Gly	Gln	Gly	Val	Glu	Gln	
			500					505					510			
Lys	Asn	Ala	Phe	Lys	Asp	Ala	Val	Lys								
		515					520									

<210> 13

<211> 107

5 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 13

aaaacgcctt aaaatggcat tttgacttgc aaactgggct aagatttget aaatgaaaa 60

10 atgectatgt ttaaggtaaa aaacaaatgg aggacatttc taaatg 107

REIVINDICACIONES

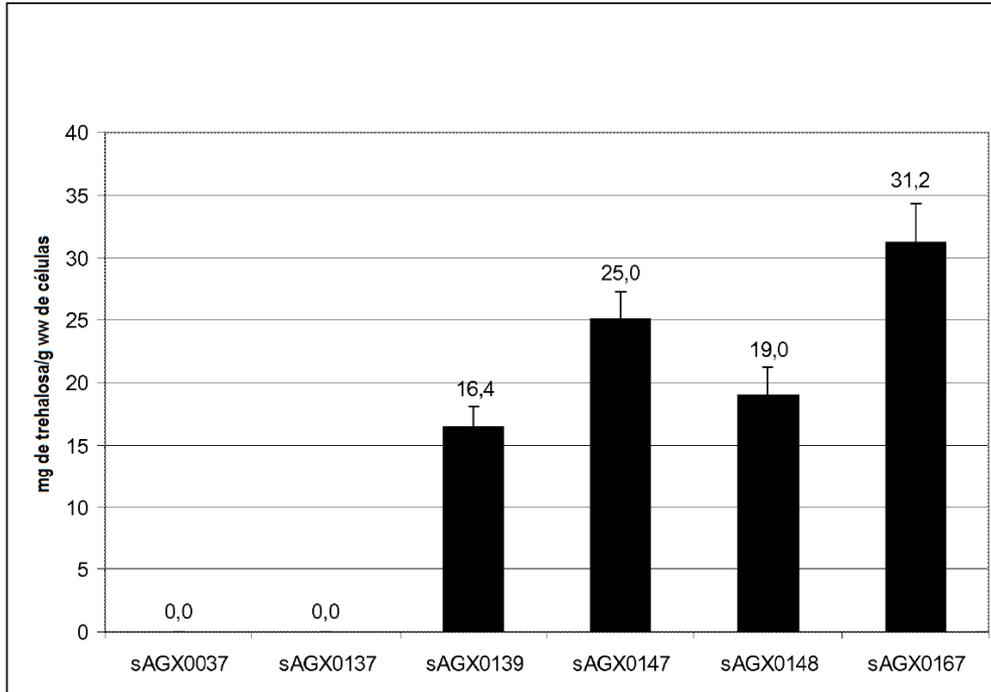
- 5 1. Una bacteria gram positiva que carece de actividad de componente IIC del sistema PTS de celobiosa específica (PtcC), en la que el gen que codifica PtcC endógeno ha sido parcial o completamente eliminado, interrumpido o inactivado tal como que es incapaz de producir producto génico PtcC funcional, y en donde dicha bacteria gram positiva sobreexpresa uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa.
- 10 2. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más transportadores de trehalosa es un transportador de trehalosa endógeno.
- 15 3. La bacteria gram positiva según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la bacteria gram positiva es una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterium.
- 20 4. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha bacteria gram positiva es una Lactococcus sp. o un Lactobacillus sp.
- 25 5. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el gen PtcC o el producto del gen PtcC tiene una secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es al menos 75% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 85% idéntica, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 7 u 8, respectivamente.
- 30 6. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el gen de PtcC o el producto de gen PtcC tiene la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 u 8, respectivamente.
- 35 7. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde uno o más transportadores de trehalosa son uno o más transportadores de trehalosa endógenos del sistema fosfotransferasa (PTS) localizado dentro del operón trehalosa de una bacteria gram positiva.
- 40 8. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el uno o más transportadores de trehalosa tiene un ácido nucleico que es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 9 u 11, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 10 o 12, respectivamente.
- 45 9. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 7, en donde uno o más transportadores de trehalosa tienen el ácido nucleico de SEQ ID NO: 9 u 11, respectivamente, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12, respectivamente.
- 50 10. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la sobreexpresión de uno o más transportadores de trehalosa se logra mediante la inserción de un promotor 5' al uno o más genes que codifican uno o más transportadores de trehalosa, tales que el promotor está operativamente ligado a la una o más secuencias transportadoras.
- 55 11. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el promotor es un promotor constitutivo.
- 60 12. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el promotor es de una bacteria endógena gram positiva.
- 65 13. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el promotor es el promotor de la proteína de unión al ADN de tipo HU (PhIIA).
14. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el promotor tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 13.
15. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el promotor tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13.
16. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que carece de actividad de trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP).
17. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado parcialmente o completamente, se ha interrumpido o inactivado, tal como que es incapaz de producir un producto de gen trePP funcional.
18. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en donde la secuencia de ácido nucleico trePP que codifica TrePP es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%

idéntica a SEQ ID NO: 1, o la secuencia de aminoácidos de TrePP es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 2.

- 5 19. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la secuencia de ácido nucleico de trePP que codifica TrePP es idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos de TrePP es idéntica a la SEQ ID NO: 2.
20. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional.
- 10 21. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicha trehalosa 6-fosfato fosfatasa es OtsB.
22. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la trehalosa 6-fosfato fosfatasa es OtsB de *E. coli*.
- 15 23. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que contiene uno o más productos génicos heterólogos.
24. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el uno o más productos génicos heterólogos son uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos heterólogos.
- 20 25. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos heterólogos se seleccionan del grupo que consiste en insulina, hormona del crecimiento (GH), prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, somatostatina, hormona estimulante de la tiroides, polipéptido intestinal vasoactivo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL -13, cualquiera de IL-14 a IL-32, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN, EPO, GCSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL, TNF α , CD40, CD27, ligandos FAS, familia de citoquinas IL- 1, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento transformantes, factores de crecimiento nervioso, factores de crecimiento epidérmico, citoquinas relacionadas con la insulina, péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), péptido 2 similar al glucagón (GLP -2), factores de trébol (TFF) y PYY.
- 30 26. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicho uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos heterólogos se seleccionan del grupo que consiste en IL-10 humana (hIL-10), GLP-1 humana (hGLP-1), GLP-2 humano (hGLP-2) y PYY humano.
- 35 27. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos heterólogos es un anticuerpo o fragmento funcional del mismo.
28. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo es un anticuerpo neutralizante.
- 40 29. La bacteria gram positiva de acuerdo con la reivindicación 27 o la reivindicación 28, en donde dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo es un VHH, nanocuerpo, Fab, scFv, Fv, dAb, Fd, diacuerpo o tricuerpo.
- 45 30. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en donde el anticuerpo o fragmento funcional del mismo, inhibe el efecto biológico de las citoquinas seleccionadas de la lista de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5 , IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12 (y sus subunidades IL-12p35 e IL12p40), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 , IL-21, IL-23 (y su subunidad IL-23p19), IL-27, IL-32 (y sus variantes de empalme), IFN (α , β , γ) y TNF α .
- 50 31. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en donde el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se selecciona de:
- i) un anticuerpo anti-TNF α , fragmento de anticuerpo anti-TNF α , dominio variable de anticuerpo único anti-TNF α , receptor de TNF soluble o variante negativa dominante de TNF α ;
- 55 ii) un anticuerpo anti-IL-12, fragmento de anticuerpo anti-IL-12, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12, receptor IL-12 soluble, variante dominante negativa de IL-12 o IL-12 dAb;
- iii) un anticuerpo anti-IL-12p35, fragmento de anticuerpo anti-IL-12p35, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12p35, receptor IL-12p35 soluble, variante negativa dominante de IL-12p35 o dAb IL-12p35;
- 60 iv) un anticuerpo anti-IL-12p40, fragmento de anticuerpo anti-IL-12p40, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12p40, receptor de IL-12p40 soluble, variante negativa dominante de IL-12p40 o dAb de IL-12p40;
- v) un anticuerpo anti-IL-23, fragmento de anticuerpo anti-IL-23, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-23, receptor de IL23 soluble, variante negativa dominante de IL-23 o dAB de IL-23;
- 65

- vi) un anticuerpo anti-IL-23p19, fragmento de anticuerpo anti-IL-23p19, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-23p19, receptor de IL-23p19 soluble, variante negativa dominante de IL-23p19 o dAb IL-23p19;
- 5 vii) un anticuerpo anti-IFNy, fragmento de anticuerpo anti-IFNy, dominio variable de anticuerpo único anti-IFNy, receptor IFNy soluble o variante negativa dominante de IFNy;
- viii) un anticuerpo anti-IL-17, fragmento de anticuerpo anti-IL-17, dominio variable de anticuerpo anti-IL-17 único, receptor IL-17 soluble, variante dominante negativa de IL-17 o IL-17 dAb; y
- 10 ix) un anticuerpo anti-MCP-1, fragmento de anticuerpo anti-MCP-1, dominio variable de anticuerpo único anti-MCP-1, receptor de IL-17 soluble, variante negativa dominante de MCP-1 o dAb de MCP-1.
32. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde el anticuerpo o fragmento funcional del mismo es un Fab anti-TNF de cA2 o Fab anti-TNF de CDP870.
- 15 33. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde la bacteria gram positiva se seca, se seca por pulverización, se congela o se seca por congelamiento.
- 20 34. La bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 para uso como medicamento.
- 35 35. Un medicamento, un aditivo alimenticio, una composición probiótica o un cultivo iniciador, tal como un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende la bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33.
- 25 36. Un método para preparar un medicamento o para preparar un aditivo alimenticio o para preparar un cultivo iniciador o para preparar una composición probiótica, comprendiendo el método:
- 30 i) propagar la bacteria gram positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, y
- ii) formular la bacteria gram positiva así propagada en, respectivamente, el medicamento o aditivo alimenticio o cultivo iniciador o composición probiótica.
- 35 37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde:
- el medio de cultivo comprende maltosa o glucosa o una combinación de maltosa y glucosa, como una fuente de carbono; y/o
- 40 - el medio de cultivo sustancialmente no contiene trehalosa añadida externamente.
38. El método de la reivindicación 37, en donde la maltosa o glucosa o combinación de maltosa y glucosa es la principal o única fuente de carbono.
- 45 39. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, que comprende adicionalmente congelar o secar por congelamiento la bacteria gram positiva, medicamento, aditivo alimenticio, composición probiótica o cultivo iniciador.
- 50 40. Un método para preparar un producto alimenticio, que comprende mezclar el aditivo alimenticio o el cultivo iniciador de acuerdo con la reivindicación 35 con un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por la bacteria gram positiva.
41. El método de la reivindicación 40, en donde el método comprende además la etapa de fermentar dicho material de sustrato.
- 55 42. Un producto alimenticio que comprende la bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33.

A



B

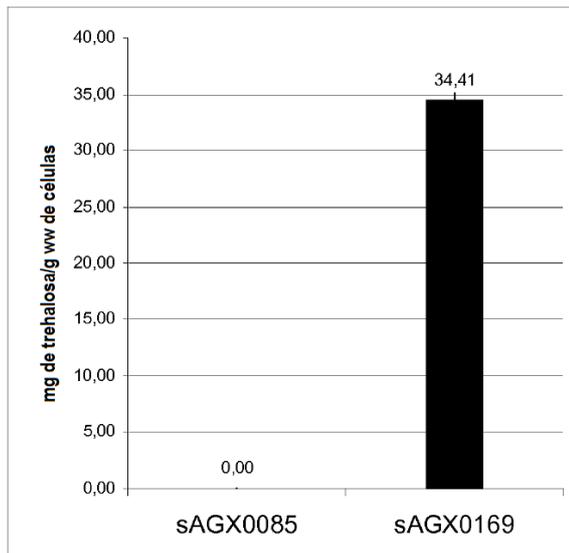
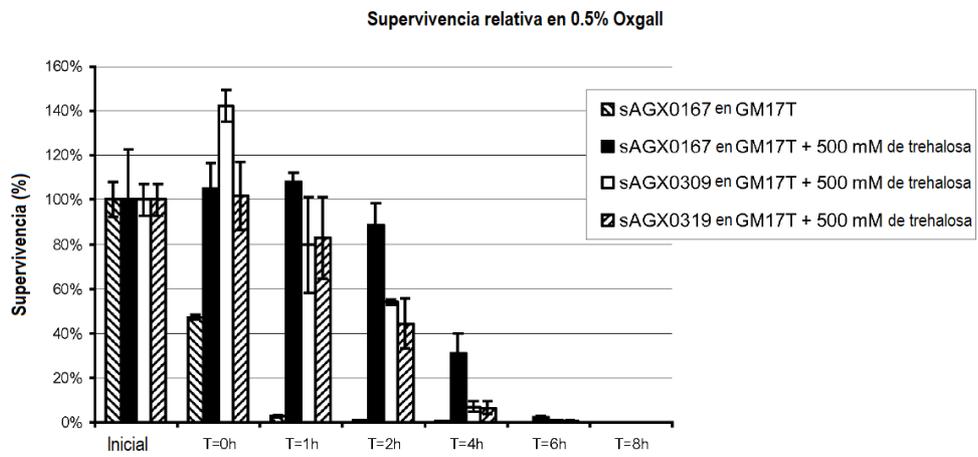


FIGURA 1

A



B

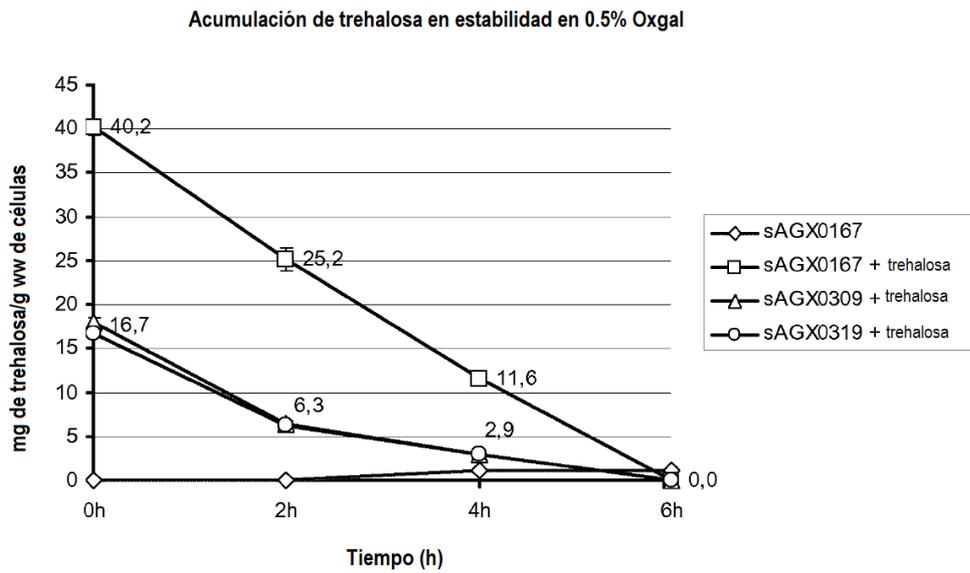
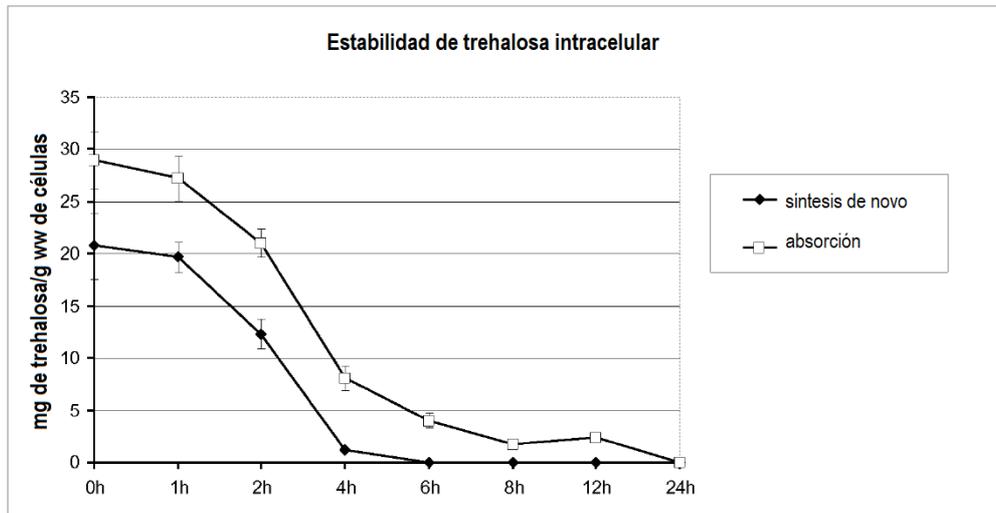


FIGURA 2

A



B

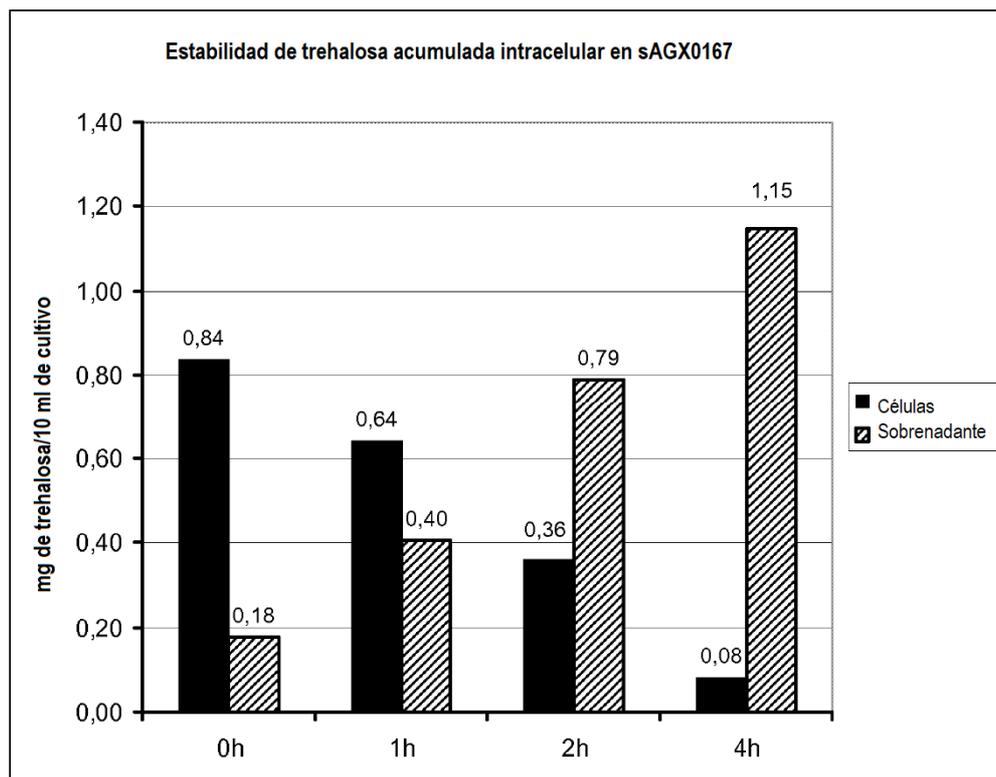
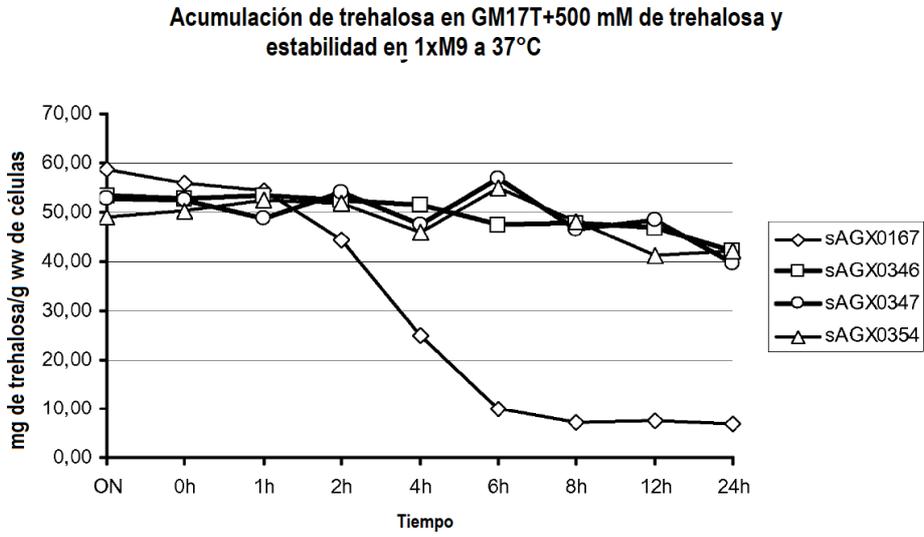


FIGURA 3

A



B

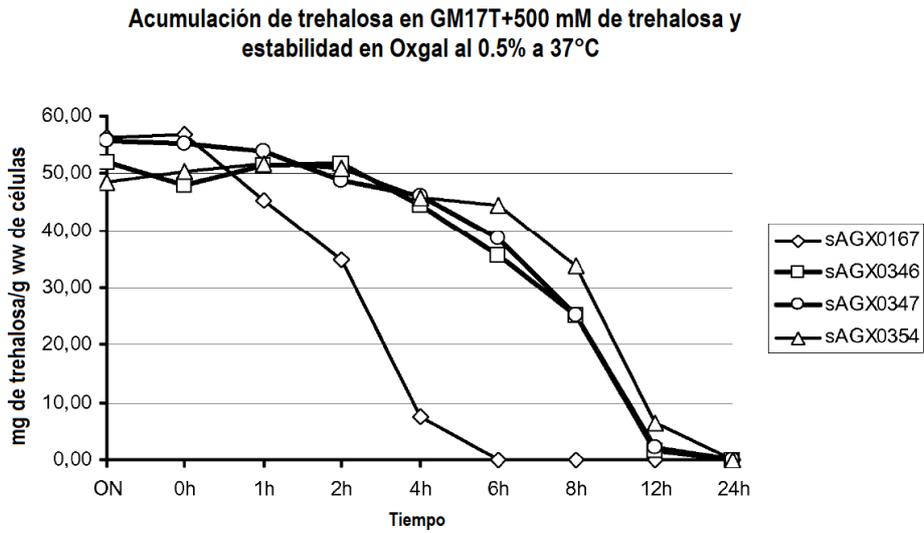
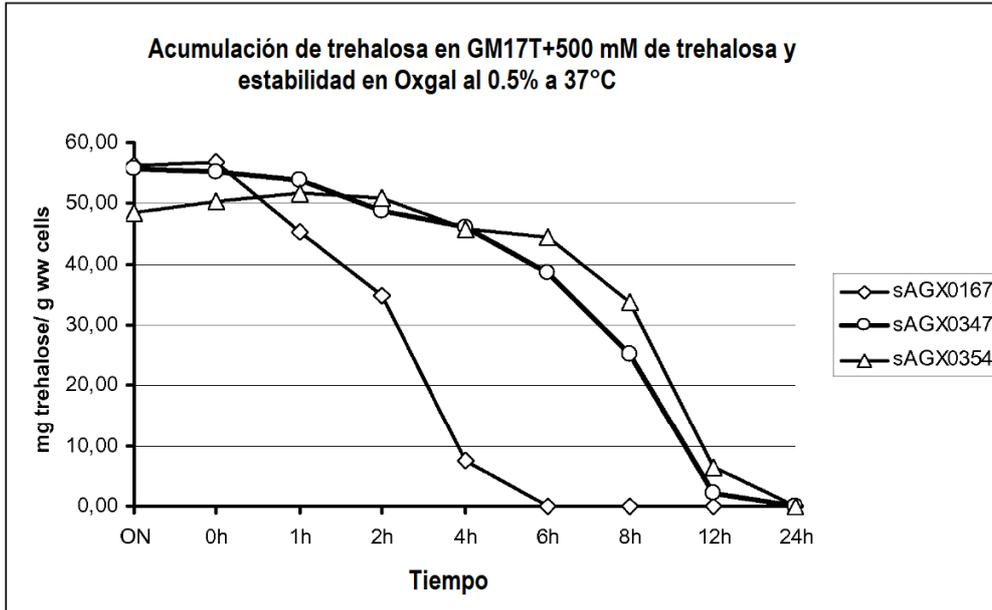


FIGURA 5

A



B

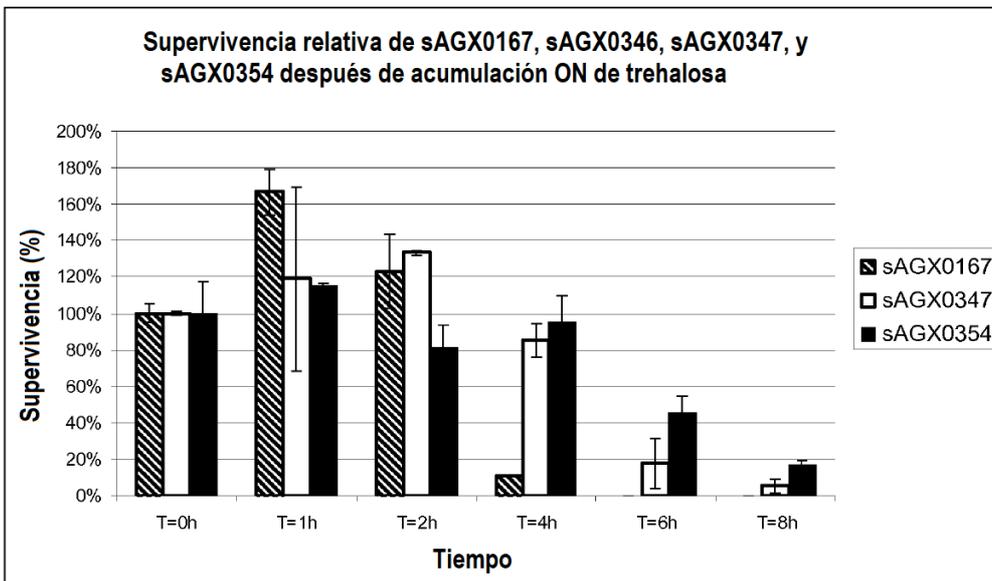


FIGURA 6

Acumulación de trehalosa intracelular de sAGX0167 y sAGX0346 después de crecimiento ON en diferente medio

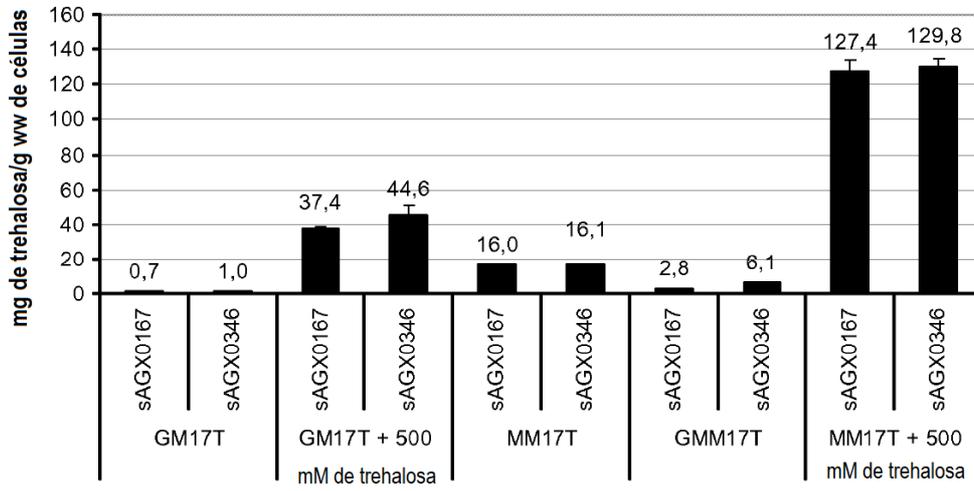
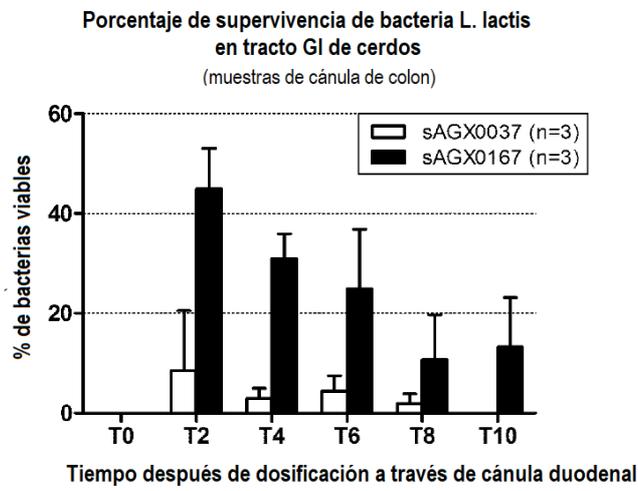


FIGURA 7

A



B

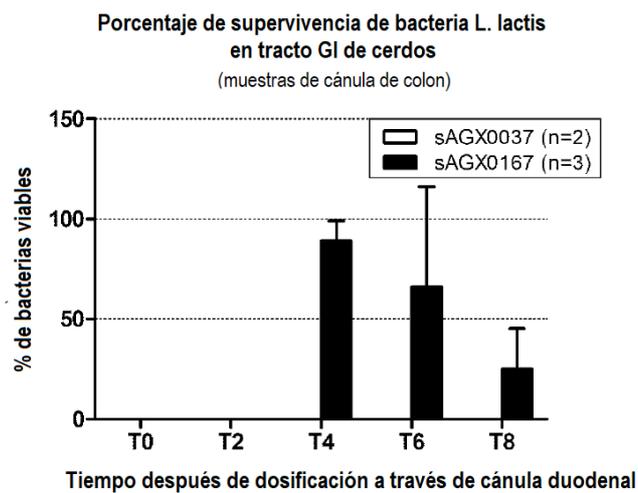
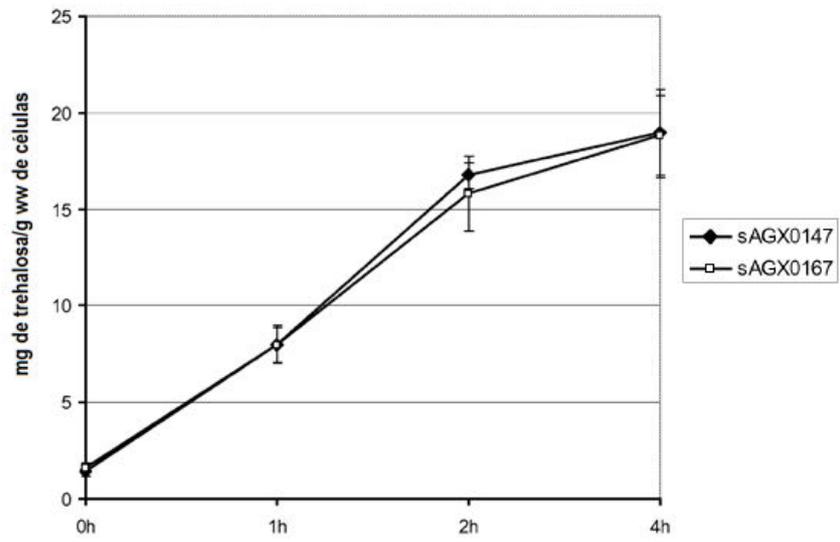


FIGURA 8

A



B

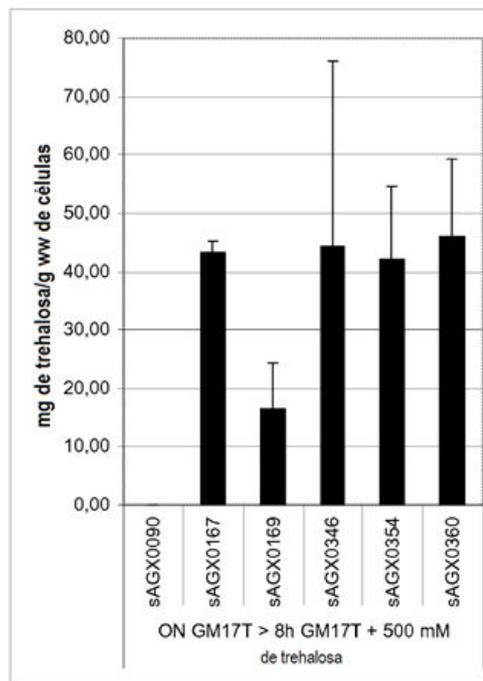


FIGURA 9

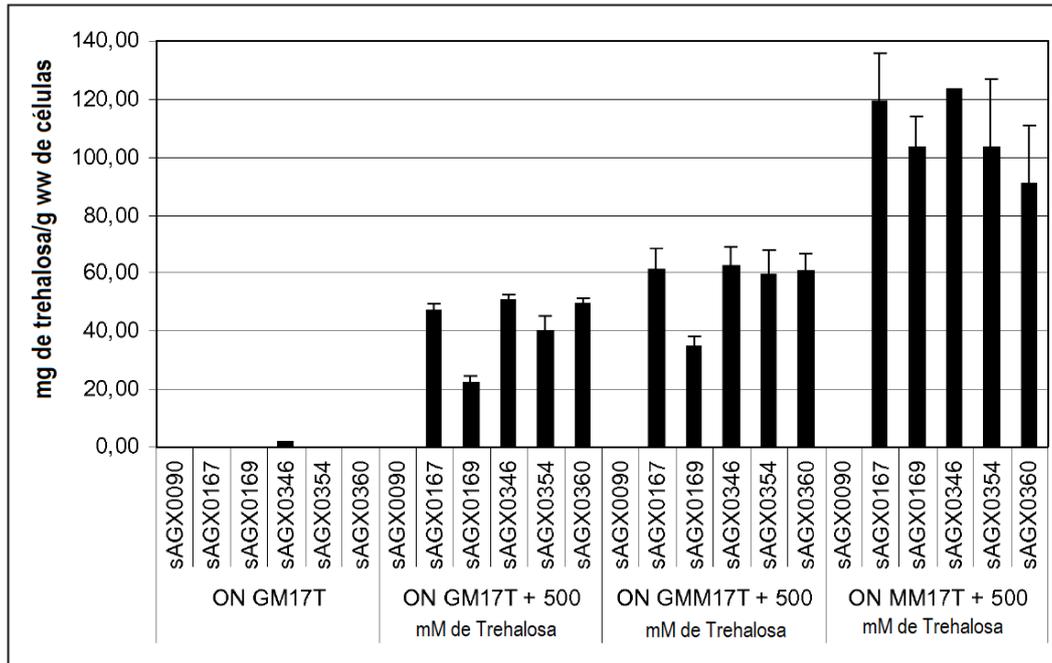


FIGURA 10

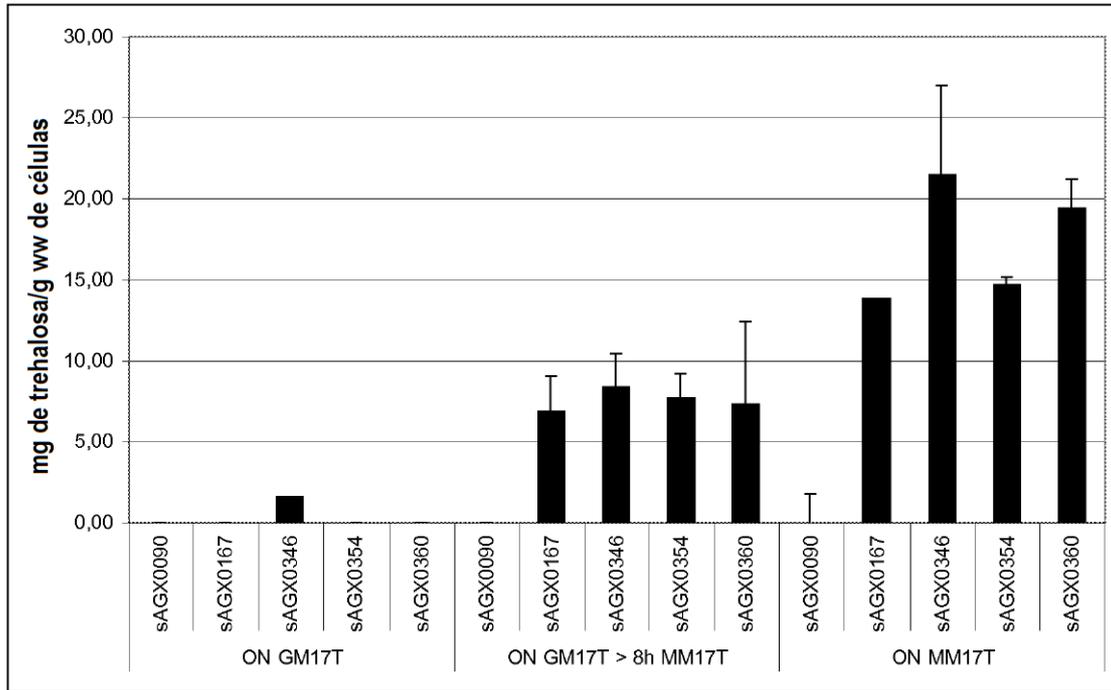


FIGURA 11