

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 707**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/04</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)	<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/10</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/74</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/744</b>	(2015.01)		
<b>C07K 14/325</b>	(2006.01)		
<b>C12P 19/12</b>	(2006.01)		
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068633**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041672**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12772891 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2758512**

54 Título: **Bacterias gram positivas modificadas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**23.09.2011 EP 11182642**

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

**24.07.2018**

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 2 676 707 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 gram positivas modificadas y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a bacterias gram positivas, seleccionadas de una bacteria de ácido láctico y una Bifidobacteria, con resistencia al estrés mejorada y características de fabricación, procesamiento y almacenamiento mejoradas. Estas bacterias gram positivas modificadas genéticamente carecen de actividad de trehalosa-6-fosfato fosforilasa (TrePP) y del componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC) que permite acumulación y retención de trehalosa intracelular. La invención adicionalmente se refiere a usos de estas bacterias gram positivas en la tecnología de alimentos y las aplicaciones médicas.

10 Antecedentes de la invención

15 Las bacterias Gram-positivas se clasifican colectivamente ya que tienen una sola membrana plasmática de bicapa lipídica. Las bacterias Gram positivas incluyen una multitud de géneros bacterianos baciliformes 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 gram-positivos, de varilla o cocos bajos en GC, tolerantes al ácido, generalmente no esporulantes, que no respiran, que se asocian por sus características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas bacterias, que usualmente 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 la LAB con fermentaciones de alimentos, ya que la acidificación inhibe el crecimiento de agentes de deterioro. Un prototipo de LAB *Lactococcus lactis* es una bacteria de ácido láctico de fermentación mesófila y microaerófila. Mientras que la bacteria se utiliza ampliamente en fermentaciones alimenticias, especialmente en la industria láctea, existe un interés creciente por su uso en medicamentos y nutracéuticos, como medicamentos para tratar infecciones en cavidades corporales, como infecciones vaginales, o como vehículo para el suministro de moléculas activas biológicas. En todos esos casos, subsiste la necesidad de cultivos iniciadores altamente viables, o formulaciones farmacéuticas o nutracéuticas que comprendan una alta proporción de bacterias viables. Sin embargo, *L. lactis* tiende a perder viabilidad durante el almacenamiento, o durante el procesamiento (para la producción de una fórmula en polvo seco, formación de comprimidos, etc.). La caída en la viabilidad es aún más pronunciada cuando la bacteria después de liofilización se somete a un estrés adicional, como la alta acidez o la presencia de sales biliares.

20 Se han propuesto diversos métodos para superar este problema. El uso de trehalosa es de particular interés. La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que se encuentra en una gran variedad de organismos, que varía desde bacterias hasta animales invertebrados. La trehalosa, a veces en combinación con dextrano, se utiliza a menudo como un crioprotector agregado externamente. La trehalosa agregada externamente funciona como una matriz de sacárido (Conrad et al., 2000), y ejerce su efecto protector especialmente durante el secado por congelación, en el que actúa como un formador de vidrio. Más aún, 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 la trehalosa agregada externamente rara vez conduce a la acumulación interna de trehalosa en los microorganismos, ya sea porque no se absorbe o se metaboliza rápidamente después de absorción.

25 Termont et al. (Appl Environ Microbiol 72: 7694; 2006) informaron que la trehalosa de novo sintetizada, 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 agregada exógenamente, protege a *L. lactis* de la lisis biliar y la muerte celular a través de secado por congelación. 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.

30 Andersson et al. (J Biol Chem 276: 42707; 2001) han descrito una ruta novedosa para la utilización de trehalosa en *L. lactis*. Esta ruta emplea la actividad de trehalosa-6-fosfato fosforilasa (trePP), convirtiendo trehalosa-6-fosfato a  $\beta$ -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.

35 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 trePP y  $\beta$ -fosfoglucomutasa (*pgmB*) de *L. lactis*. Según lo indicado por estos autores, dado que las bacterias carecen de trehalosa 6-fosfato fosfatasa, el gen respectivo, *otsB*, del organismo de calidad alimenticia *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.

40 Aunque estos procesos ciertamente conducen a una mejora del almacenamiento, existe una necesidad adicional de métodos que puedan conducir a un almacenamiento mejorado de bacterias gram positivas, tales como LAB o Bifidobacteria, no solo en aquellos casos en que se utiliza la bacteria para el suministro de compuestos biológicamente activos en aplicaciones médicas, sino también cuando la bacteria se utiliza en la industria alimenticia, tal como la industria láctea.

## 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. Ejemplos son lisis de ácidos biliares, experimentados por LAB vivos durante el tránsito intestinal, o estrés de congelación y/o secado durante congelación, secado, secado por pulverización, secado por congelación, que se utiliza para la preservación de LAB.

Solo está disponible un número limitado de métodos 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 uso en productos farmacéuticos o alimenticios.

En este documento presentamos un método novedoso que permite la acumulación intracelular de trehalosa, solo con base en la ausencia de la trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP) y la actividad del componente IIS del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC) en bacterias gram positivas, preferiblemente a través de hacer que el gen que codifica TrePP y/o ptcC endógeno se elimine, se interrumpa o se inactive parcial o completamente, de tal manera que sea incapaz de producir un producto trePP funcional y/o producto del gen de ptcC. En contraste con el presente método, 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 indicó la sobreexpresión de TrePP para obtener la acumulación intracelular de trehalosa. Más aún, aunque LAB tal como *Lactococcus lactis* puede ser capaz de utilizar trehalosa, hasta ahora no se ha descrito ninguna cepa de *Lactococcus lactis* que sintetice trehalosa. No se han identificado genes de trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa endógenos, que se consideran que son un requisito previo para la producción de trehalosa a partir de glucosa-6-fosfato, un metabolito presente en *L. lactis*.

En un aspecto, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP) y actividad del componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC). El otro aspecto, la invención se refiere a dicha bacteria gram positiva para uso como un medicamento. Un aspecto adicional proporciona una composición que comprende una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC. Dichas composiciones por ejemplo pueden abarcar composiciones farmacéuticas, cultivos iniciadores, aditivos para alimentos, o composiciones probióticas.

La composición que comprende una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC puede ser una composición probiótica o aditivo para alimentos, más específicamente como un probiótico no médico o aditivo para alimentos. Sin limitación, dicho aditivo para alimentos puede ser un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio. La composición que comprende una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC como un cultivo iniciador puede ser para la preparación de un producto alimenticio, más particularmente en el producto alimenticio es un producto alimenticio no medicinal.

Un aspecto adicional proporciona una composición probiótica o aditivo para alimentos, más específicamente una composición probiótica o aditivo para alimentos no medicinal, que comprende una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC. Sin limitación, dicho aditivo para alimentos 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 gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a dicha composición o composición farmacéutica para uso como un medicamento. También se proporciona mediante un aspecto de la invención un método para preparar un producto alimenticio, que comprende mezclar dicha composición probiótica, dicho aditivo para alimentos o dicho cultivo iniciador con un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria. En las realizaciones, dicho método puede comprender adicionalmente la etapa de fermentar dicho material de sustrato.

En este documento se describe un producto alimenticio que se puede obtener mediante cualquier dicho método. Un producto alimenticio puede abarcar sin limitación probióticos.

Otro aspecto proporciona un método para preparar un medicamento, tal como una formulación farmacéutica, nutracéutico, alimento médico o alimento funcional o probiótico, o para preparar una composición probiótica o aditivo para alimentos, más específicamente una composición probiótica o aditivo para alimentos no medicinal, o para preparar un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende las etapas de: i) propagar una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, y ii) formular la denominada bacteria gram positiva propagada, en, respectivamente, el medicamento o composición probiótica o aditivo para alimentos o cultivo iniciador. Por lo tanto, también se cubre el uso de una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y

5 Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC para la preparación de un medicamento, tal como una formulación farmacéutica, nutracéutico, alimento médico o alimento funcional o probiótico, o para la preparación de una composición probiótica o aditivo para alimentos, más específicamente una composición probiótica o aditivo para alimentos no medicinal, o para la preparación de un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio.

10 Los inventores han descubierto que las bacterias gram positivas, tales como LAB o Bifidobacteria, como se describe en el presente documento no solo son capaces de acumulación de trehalosa intracelular, incluso independientemente de la fuente de carbono, sino también que la bacteria gram positiva muestra una resistencia enormemente aumentada a diversas condiciones de estrés y asociadas al almacenamiento. Por ejemplo, la bacteria gram positiva es más resistente a manipulaciones asociadas con almacenamiento, tales como secado, congelación, secado por pulverización o secado por congelación (liofilización). La bacteria gram positiva también muestra una mayor supervivencia, independiente de la alimentación o el estado de ayuno, en el sistema gastrointestinal, lo que indica una mejor resistencia a la acidez y la lisis biliar. El rendimiento de la bacteria gram positiva como se describe en el presente documento, ya sea en un entorno medicinal o en la industria alimenticia, es más reproducible que lo conocido previamente. Por lo tanto, la bacteria gram positiva que incorpora los principios de la invención proporciona una mayor resistencia al entorno así como también biorresistencia.

15 En un aspecto, la invención por lo tanto también se refiere a un método para acumular de forma interna trehalosa en una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que comprende propagar una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva.

20 Se describe en este documento 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 Bifidobacteria, que comprende modificar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de tal manera que carezca de actividad de TrePP. Preferiblemente, la resistencia al estrés o características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento pueden ser una o m {as seleccionadas del grupo que comprende resistencia a condiciones ácidas, resistencia a sales biliares, resistencia a calor, resistencia a sal, resistencia a secado, congelación, secado por pulverización, o secado por congelación, y resistencia osmótica.

25 Preferiblemente, en la bacteria gram positiva mencionada anteriormente, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC, el gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de trePP funcional. Se apreciará que dicha eliminación, interrupción o inactivación pueden dirigir por ejemplo la secuencia de codificación del gen de trePP y/o el promotor del cual se expresa el trePP.

30 En realizaciones preferidas, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC como se emplea en este documento no contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional. Como ya se explicó, la sobreexpresión de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga, tal como por ejemplo otsB de *Escherichia coli* o de *Propionibacterium freudenreichii*, anteriormente se suponía que era un requisito para lograr la acumulación de trehalosa en la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria.

35 En algunas realizaciones, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC como se emplea en este documento no contiene trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga funcional. Como ya se explicó, sobreexpresión de trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga, tal como por ejemplo otsA de *Escherichia coli*, se indicó anteriormente para lograr la acumulación de trehalosa en LAB. En otras realizaciones, la bacteria gram positiva no contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional y no contiene trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga funcional.

40 La bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, carece de actividad de TrePP y actividad de componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC). Preferiblemente, en dicha bacteria gram positiva, el gen que codifica ptcC endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de ptcC funcional. Se apreciará que dicha eliminación, interrupción o inactivación puede dirigir por ejemplo la secuencia de codificación del gen de ptcC y/o el promotor del cual se expresa el gen de ptcC. Los inventores han observado inesperadamente que con el tiempo la trehalosa acumulada se escapa en cierta medida fuera de las células a través de un puerto de salida de trehalosa no anticipado y no identificado hasta ahora, por lo que la trehalosa se puede detectar en el sobrenadante. Sorprendentemente, encontraron que la inactivación de ptcC evita la liberación de trehalosa. Estos hallazgos son aún más inesperados, porque hasta ahora el ptcC nunca se ha asociado con el transporte de trehalosa, y no se ha sugerido como un puerto de salida de trehalosa responsable de la pérdida de trehalosa y su liberación en los entornos. También sorprendentemente, los transportadores de trehalosa conocidos y caracterizados no parecen ser responsables de este mecanismo de fuga de trehalosa.

En realizaciones preferidas, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC como se emplea en este documento puede sobreexpresar uno o más transportadores de trehalosa, preferiblemente transportadores de trehalosa endógena, tales como uno o más genes de sistema de fosfotransferasa comprendido en el operón de trehalosa. Los inventores han encontrado de forma sorprendente que dicha sobreexpresión, en contraste con la expresión inducida por trehalosa nativa, mejora adicionalmente la capacidad de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, para acumular y/o retener la trehalosa intracelular.

Para recapitular, en algunas realizaciones la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC como se emplea en este documento adicionalmente puede sobreexpresar uno o más transportadores de trehalosa.

En esta relación, un aspecto adicional de la presente invención es una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC y que exhibe adicionalmente la siguiente característica: sobreexpresa uno o más transportadores de trehalosa.

Un aspecto relacionado se refiere a un LAB que carece de actividad de TrePP y ptcC y que no contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional, y que exhibe adicionalmente la siguiente característica: sobreexpresa uno o más transportadores de trehalosa.

En realizaciones preferidas, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se divulga o emplea en este documento pueden contener adicionalmente uno o más productos génicos heterólogos(s) en algunas realizaciones preferidas, particularmente en los que dicha bacteria gram positiva, esta destinada para un uso medicinal, dichos productos génicos pueden ser productos génicos profilácticos y/o terapéuticos o antígeno(s).

En esta relación, un aspecto adicional de la presente invención es una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC y que contiene adicionalmente uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente productos génicos profilácticos y/o terapéuticos. Esta bacteria gram positiva opcionalmente puede sobreexpresan adicionalmente uno o más transportadores de trehalosa.

Un aspecto relacionado es una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC y que no contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional y que contiene adicionalmente uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente productos génicos profilácticos y/o terapéuticos. Esta bacteria gram positiva opcionalmente puede sobreexpresar adicionalmente uno o más transportadores de trehalosa.

En ciertas realizaciones, se puede secar la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, o medicamento o aditivo para alimentos o composición probiótica o cultivo iniciador como se divulga o emplea en este documento se puede secar, congelar, secar por pulverización, o secar por congelación (lío-filizar). De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para preparar un medicamento, o para preparar un aditivo para alimentos, o para preparar un cultivo iniciador, o para preparar composiciones probióticas, o para acumular de forma interna trehalosa en una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, o para mejorar resistencia al estrés o características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento de y bacteria gram positiva, puede comprender adicionalmente secado, secado por pulverización, congelación o secado por congelación (lío-filización) la LAB, medicamento, aditivo para alimentos, composición probiótica, o cultivo iniciador.

En ciertas realizaciones del método mencionado anteriormente para preparar un medicamento, o para preparar un aditivo para alimentos, o para preparar un cultivo iniciador, o en ciertas realizaciones del método mencionado anteriormente para acumular de forma interna trehalosa en la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, el medio de cultivo puede comprender maltosa o glucosa o una combinación de maltosa y glucosa, como una fuente de carbono, preferiblemente como principal o incluso única fuente de carbono. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo sustancialmente no contiene trehalosa agregada de forma externa (exógenamente). Los inventores han encontrado sorprendentemente que las bacterias gram positivas, tales como bacterias de ácido láctico (LAB) o Bifidobacterias, como se divulga en este documento han adquirido la capacidad de utilizar fuentes de carbono tales como maltosa o glucosa para acumular trehalosa dentro de las células. De acuerdo con lo anterior, las bacterias gram positivas de acuerdo con la invención de forma ventajosa se pueden hacer crecer sobre por ejemplo maltosa como la única fuente de carbono, que es más barato que trehalosa, todavía acumulará trehalosa intracelular. No obstante, se apreciará que en ciertas realizaciones, el medio de cultivo puede contener trehalosa agregada de forma externa (exógenamente).

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

Breve descripción de las figuras

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

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

5 Figura 3: Acumulación y estabilidad de trehalosa intracelular. (A) liberación de trehalosa durante el tiempo; y (B) aumento de trehalosa en el sobrenadante.

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

10 Figura 5: La inactivación de ptcC evita (en sales M9, panel A) o retrasa (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 contra la lisis biliar. (A) liberación de trehalosa intracelular durante el tiempo; y (B) supervivencia durante el tiempo en 0.5% de oxgal

Figura 7: cepas KO de trePP (tanto ptcC en peso así como también KO ptcC) son capaces de convertir glucosa o maltosa a trehalosa intracelular

15 Figura 8: Supervivencia mejorada durante el pasaje intestinal a través del intestino de porcino, tanto cuando los cerdos estaban en ayuno durante 24 horas (A) así como también durante la disponibilidad de comida ad libitum (B).

Figura 9: Acumulación de trehalosa después de producción de biomasa.

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

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

20 Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en este documento, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen tanto el singular como el plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

25 Los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido de" como se utilizan en este documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales, no mencionadas. Se apreciará que los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido de" como se utilizan en este documento comprenden los términos "que consiste en", "consiste" y "consiste en", así como los términos "que consisten esencialmente en", "consiste esencialmente" y "consiste esencialmente en".

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

35 El término "alrededor" o "aproximadamente" como se utiliza en el presente 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 dichas variaciones sean apropiadas para ser realizadas en la invención divulgada. Se debe entender que el valor al que se refiere el modificador "alrededor de" o "aproximadamente" también se divulga específicamente, y preferiblemente.

40 Mientras que los términos "uno o más" o "por lo menos uno", tal como uno o más o por lo menos un miembro(s) de un grupo de miembros, es claro per se, por medio de una ejemplificación adicional, el término abarca, entre otros, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera de  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  o  $\geq 7$  etc. de dichos miembros, y hasta a todos dichos miembros.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, que incluyen los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende un experto común 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.

45 En los siguientes pasajes, diferentes aspectos de la invención se definen con más detalle. Cada aspecto definido de esta manera 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.

50 La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" o "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización se incluye en por lo menos una realización de la presente

invención. Por lo tanto, las apariencias de las frases "en una realización" o "en una realización" en diversos lugares a lo largo de esta especificación no necesariamente se refieren a la misma realización, pero pueden serlo. Adicionalmente, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada, como sería evidente para un experto en la técnica a partir de esta descripción, en una o más realizaciones.

5 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 las realizaciones específicas en las que se puede poner en práctica la invención. La siguiente descripción detallada, por lo tanto, no se debe tomar en un sentido limitativo, y el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

10 Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante incluyen Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd 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, New 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 como se establece por ejemplo en Davis, B. D. et al., Microbiology, 3rd edition, Harper & Row, publishers, Philadelphia, Pa. 15 (1980).

Se divulga en este documento una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP).

20 En un aspecto, la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, es para uso como un medicamento, es decir, para uso en el tratamiento. Un aspecto adicional proporciona un medicamento que comprende una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP. También se divulga el uso de una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP para la fabricación de un medicamento. Se puede proporcionar dicho medicamento, por ejemplo, como una formulación farmacéutica, nutracéutico, probiótico, alimento médico o funcional.

25 Otro aspecto proporciona el uso de una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP como un probiótico o un aditivo para alimentos, más específicamente como un probiótico no médico o aditivo para alimentos. Un aspecto relacionado proporciona el uso de una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP como un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, más 30 particularmente en el que el producto alimenticio es un producto alimenticio no medicinal.

Un aspecto adicional de esta manera proporciona un probiótico o aditivo para alimentos, más específicamente un probiótico no médico o aditivo para alimentos, que comprende una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP. Un aspecto relacionado proporciona un cultivo iniciador, preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, más particularmente 35 en el que el producto alimenticio es un producto alimenticio no medicinal, dicho cultivo iniciador comprende una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP.

Como se utiliza en este documento, el término "bacteria gram-positiva" tiene su significado común conocido en la técnica. Por medio de orientación adicional, una bacteria gram-positiva se puede identificar mediante tinción de Gram ya que refiere la tinción de cristal violeta.

40 En una realización preferida, la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención no es patógena en el sentido de que no provoca daño o no conduce a efectos perjudiciales cuando se administra a un sujeto deseado.

Como se utiliza en este documento, el término "bacterias de ácido láctico" o "LAB" se refiere a una bacteria gram-positiva que es no patógena en el sentido de que no provoca daño o no lleva a efectos perjudiciales cuando se administra a un sujeto destinado, y que preferiblemente pertenece a los géneros bacterianos de *Lactococcus*, 45 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella*. Más preferiblemente, la LAB puede ser una especie de *Lactococcus*, tal como, pero no limitada a *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*, y cualesquier subespecies y cepas de las mismas. Aún más preferiblemente, la especie *Lactococcus* puede ser *Lactococcus lactis*, y cualesquier subespecies y cepa de las mismas, tal como sin limitación *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *bv. diacetylactis*. Adicional y preferiblemente, la *Lactococcus lactis* puede ser *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, más preferiblemente *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, y cualesquier subespecies y cepas de las mismas, tal como, por ejemplo, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, o 50 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. También preferiblemente, la LAB puede ser un *Enterococcus* sp., preferiblemente *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y cualesquier subespecies y cepas de las mismas, tal como, sin limitación cepa LMG15709 de *Enterococcus faecium*. 55

La bifidobacteria es un género de bacterias gram-positivas, no móviles, a menudo ramificadas anaeróbicas. Las bifidobacterias como se utiliza en este 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 Bifidobacteria es *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*. Se debe entender que también se incluyen todas las subespecies y cepas de Bifidobacteria.

Como se utiliza en este documento, el término "trehalosa 6-fosfato fosforilasa", "trePP", o "TrePP" se refiere a una enzima que fosforila la trehalosa 6-fosfato, preferiblemente una enzima que cataliza la reacción, preferiblemente la reacción reversible, de  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa-6-fosfato con fosfato para producir glucosa-6-fosfato y  $\beta$ -D-glucosa-1-fosfato, o viceversa. Los sinónimos para trePP son por ejemplo trehalosa-6-fosfato:fosfato  $\beta$ -D-glucosiltransferasa y  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa-6-fosfato:fosfato  $\beta$ -D-glucosiltransferasa. Por medio de ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos y proteínas de trePP de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 se representa mediante las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente (que corresponden a números de acceso Genbank NC\_009004.1 (región 449195-451504) y YP\_001031805.1, respectivamente). En una realización, la trePP como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 2. En una realización adicional, la trePP como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. En otra realización, la trePP como se utiliza en este documento codifica una proteína que es por lo menos 75% idéntica a la SEQ ID NO: 2, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican una proteína de trePP funcional. En otra realización, la trePP como se utiliza en este documento es una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, ortóloga de las SEQ ID NOs: 1 y 2.

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 de las alineaciones 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, se utiliza BLAST 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, utilizando la configuración predeterminada publicada u otra configuración adecuada (tal como, por ejemplo, para el algoritmo BLASTN: coste para abrir un espacio = 5, coste para extender un espacio = 2, penalización para un emparejamiento incorrecto = -2, recompensa para un emparejamiento = 1, espacio x\_ventana = 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 trePP se puede medir directa o indirectamente. Una forma de determinar indirectamente la actividad es por medio de la secuencia genética. De esta forma, se pueden identificar fácilmente eliminaciones, interrupciones o mutaciones inactivantes parciales o completas. Una forma directa para determinar la actividad se puede basar, 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  $\beta$ -D-glucosa-1-fosfato), posiblemente combinado con un marcado 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 utiliza en este documento, el término "que carece de actividad de TrePP" significa que no está presente o sustancialmente no está presente la actividad de TrePP. Por medio de más orientación, la actividad de TrePP es menor de 20% de la actividad de TrePP de bacterias gram positivas tipo silvestre, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. Por ejemplo, la actividad de TrePP es menor de 15%, preferiblemente menor de 10%, más preferiblemente menor de 5%, incluso más preferiblemente menor de 1% de actividad de TrePP tipo silvestre. Como se indicó anteriormente, aún más preferiblemente la actividad de TrePP es indetectable o sustancialmente o completamente ausente.

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

Como se utiliza en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, como se utilizan en este documento 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 utiliza en el presente documento, estos términos también abarcan, dependiendo de la afección del paciente, prevenir la aparición de una enfermedad o afección o de síntomas asociados con una enfermedad o afección, que incluye la reducción de la gravedad de una enfermedad o

afección o síntomas asociados con ella antes de la aflicción con dicha enfermedad o afección. Dicha prevención o reducción antes de la aflicción 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 prevenir 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.

Como se utiliza en este 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 comprimidos 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, pretzels, 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.

En contraste con los nutracéuticos, los denominados "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, tales 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 con el fin de controlar una enfermedad o estado de salud, y el paciente está bajo la atención continua del médico. La marca indica que el producto está destinado a ser utilizado para manejar un trastorno o afección médica específica. Un ejemplo de un alimento médico es un alimento médico nutricionalmente diverso diseñado para proporcionar apoyo nutricional específico a 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 abarcar aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta saludable para disminuir el riesgo de enfermedades, tales como alimentos bajos en grasa o bajos en sodio, o productos para perder peso.

Como se utiliza en este documento, el término "probióticos" se refiere a bacterias que ayudan a mantener el equilibrio natural de microorganismos (microflora) en la cámara intestinal. También, 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 utiliza en el presente documento, una "composición probiótica" es una composición, preferiblemente una composición comestible, que comprende un probiótico. El término "composición probiótica" como se utiliza en el presente documento se puede utilizar indistintamente con "suplemento dietético". La composición probiótica como se define en este documento se puede utilizar 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 (por ejemplo, Actimel®, Yakult®, DanActive®...), bebidas de yogur, yogur, queso fresco, crema, crema agria, etc. Por lo tanto, se debe apreciar que un probiótico o composición probiótica puede ser para aplicaciones medicinales o no medicinales.

El término "cultivo iniciador" se refiere a un cultivo microbiológico que en realidad realiza la fermentación. Estos iniciadores generalmente consisten en un medio de cultivo, tal como granos, semillas o líquidos nutritivos que han sido bien colonizados por los microorganismos utilizados para la fermentación. Como se utiliza en este documento, el término cultivo iniciador preferiblemente se refiere a un cultivo iniciador de alta densidad. De acuerdo con lo anterior, un cultivo iniciador se puede referir 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 se puede secar, secar por pulverización, congelar o secar por congelación.

Como se indicó anteriormente, los presentes inventores han encontrado de forma sorprendente que la sola ausencia de trePP es suficiente para la acumulación de trehalosa intracelular en la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. 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 de trehalosa intracelular. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria que carece de actividad de TrePP y ptcC, como se describe en este documento, que no contiene otsB heteróloga funcional, preferiblemente sin trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional. En una realización adicional, la bacteria gram positiva, como se describe en este documento no contiene una otsA heteróloga funcional, preferiblemente sin trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga funcional. En aún otra realización, la bacteria gram positiva, como se describe en este documento no contiene una otsA heteróloga funcional y no contiene una otsB heteróloga funcional. En una realización adicional, la bacteria gram positiva, como se describe en este documento no contiene una trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga funcional y no contiene una trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional. En aún una realización adicional, la bacteria gram positiva, como se describe en este documento no contiene un gen

heterólogo funcional involucrado en el metabolismo (ya sea catabólico o anabólico) de trehalosa o trehalosa 6-fosfato. Dichos genes abarcan, sin limitación trehalasa, trehalosa fosforilasa, y trehalosa 6-fosfato hidrolasa.

Como se utiliza en este documento, el término "no contiene" o "que no contiene" preferiblemente se refiere a una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que no expresa un producto génico particular, es decir se produce proteína no funcional o activa en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria.

Como se utiliza en este documento, el término "trehalosa 6-fosfato fosfatasa" se refiere a una enzima que desfosforila la trehalosa 6-fosfato, preferiblemente una enzima que cataliza la reacción de trehalosa-6-fosfato para producir fosfato y trehalosa. La trehalosa 6-fosfato fosfatasa pertenece a la familia de Hidrolasas de Monoéster Fosfórico. Los sinónimos para trehalosa 6-fosfato fosfatasa son por ejemplo  $\alpha,\alpha$ -trehalosa-6-fosfato fosfohidrolasa, trehalosa-6-fosfato fosfohidrolasa, y trehalosa 6-fosfatasa. Por medio del ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos y proteínas de trehalosa 6-fosfato fosfatasa de *E. coli* (es decir, otsB) se representa mediante las SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente (que corresponden a números de acceso Genbank X69160.1 (posiciones de nucleótidos 675-1475) y P31678.2, respectivamente). En una realización, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de las SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 4. En una realización adicional, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a las SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa como se utiliza en este documento codifica una proteína que es por lo menos 75% idéntica a la SEQ ID NO: 4, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. 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 utiliza en este documento es una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, ortóloga de las SEQ ID NOs: 3 y 4.

Como se utiliza en este documento, el término "trehalosa 6-fosfato sintasa" se refiere a una enzima que desfosforila la 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 glucosiltransferasas. Los sinónimos para trehalosa 6-fosfato sintasa son por ejemplo difosfato de trehalosa fosfato-uridina glucosiltransferasa, difosfato de fosfotrehalosa-uridina transglucosilasa, uridina difosfoglucosa fosfato glucosiltransferasa, y  $\alpha,\alpha$ -trehalosa-6-fosfato sintasa. Por medio del ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos y proteínas de trehalosa 6-fosfato sintasa de *E. coli* (es decir otsA) se representa mediante las SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente (que corresponden a números de acceso Genbank X69160.1 (posiciones de nucleótidos 1450-2874) y P31677.3, respectivamente). En una realización, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de las SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 6. En una realización adicional, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a las SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se utiliza en este documento codifica una proteína que es por lo menos 75% idéntica a la SEQ ID NO: 6, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican una proteína de trehalosa 6-fosfato sintasa funcional. En otra realización, la trehalosa 6-fosfato sintasa como se utiliza en este documento es una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, ortóloga de las SEQ ID NOs: 5 y 6.

Se entiende que, como se utiliza en este documento, la ausencia de trehalosa 6-fosfato fosfatasa o sintasa heteróloga funcional (o cualquier otra enzima metabólica relacionada con trehalosa) se refiere a la ausencia de cualquier o sustancialmente cualquier actividad de trehalosa 6-fosfato fosfatasa o sintasa heteróloga actividad. Se puede determinar dicha actividad como se describe en este documento en otra parte. En una realización, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento no expresa estas enzimas.

Los inventores han encontrado que la trehalosa en cierta medida se escapa desde las células a través de un puerto de salida de trehalosa hasta ahora no identificado o no anticipado y se puede recuperar en el sobrenadante. Sorprendentemente, los inventores encontraron que la interrupción de ptcC evita la liberación de trehalosa. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento, que carece de actividad de TrePP y componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC).

"Componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa" o "ptcC" como se utiliza en este documento se refiere a un componente del sistema fosfotransferasa. El sistema de fosfotransferasas está involucrado 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. El ptcC es el componente transmembrana de un sistema PTS específico a 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 gram positivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o

Bifidobacteria. Por medio del ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos y proteínas de *ptcC* de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 se representa mediante las SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente (que corresponden a números de acceso Genbank NC\_009004.1 (región 430271-431608) y YP\_001031790.1, respectivamente). En una realización, el *ptcC* como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de las SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 8. En una realización adicional, el *ptcC* como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a las SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. En otra realización, el *ptcC* como se utiliza en este documento codifica una proteína que es por lo menos 75% idéntica a la SEQ ID NO: 8, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican una proteína de *ptcC* funcional. En otra realización, el *ptcC* como se utiliza en este documento es una bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, ortóloga de las SEQ ID NOs: 7 y 8.

La bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y *ptcC* de acuerdo con la invención se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica, ya sea utilizando metodología de biología molecular u obtener a través de cribado de alto rendimiento de variantes naturales o variantes obtenidas a partir de mutagénesis aleatoria química o por irradiación. (El cribado de alto rendimiento para KO trePP se puede realizar mediante un método que utiliza la ausencia de crecimiento sobre trehalosa de la cepa defectuosa en trePP o mediante secuenciación de alto rendimiento y análisis bioinformático de ortólogos de trePP u otros métodos). (Para más información sobre 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 & Warner, Springer, 2003) En una realización, en la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención, el gen que codifica TrePP endógeno y/o *PtcC* y/o los promotores a partir de los cuales se expresa trePP y/o *ptcC* se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de trePP y/o *ptcC* funcional. Las técnicas para la interrupción de genes en general se conocen en el arte. Por medio del ejemplo, el gen de trePP y/o *ptcC* endógeno se puede inactivar mediante la eliminación completa o parcial de la región de codificación (inactivación) o, alternativamente, la eliminación o mutagénesis completa o parcial de la región promotora. Alternativamente, el gen trePP y/o *ptcC* SE puede inactivar insercionalmente (activación), interrumpiendo de esta manera la secuencia de codificación endógena. Por ejemplo, se pueden introducir codones de parada prematuros o mutaciones de desplazamiento de marco. El gen Trepp y/o PTCC también puede ser mutagenizado mediante la introducción de una o más mutaciones de sentido erróneo o sin sentido, siempre y cuando no se puedan producir más o sustancialmente no se puedan producir proteína de Trepp y/o *ptcC* funcional, es decir, la actividad de Trepp y/o *ptcC* está (sustancialmente) ausente. Se debe entender que también se cubren las mutaciones espontáneas

Los inventores han encontrado que sobreexpresar uno o más transportadores de trehalosa aumenta adicionalmente la acumulación de trehalosa intracelular y/o retención en la bacteria gram positiva.

De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento, sobreexpresar, preferiblemente sobreexpresar de forma constitutiva, uno o más genes que codifican un transportador de trehalosa. En una realización preferida, dichos transportadores de trehalosa son transportadores de trehalosa endógena de bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. En una realización preferida adicional, los transportadores de trehalosa son transportadores de trehalosa endógena ubicados en el operón de trehalosa de bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. En aún otra realización, los transportadores de trehalosa son transportadores de trehalosa endógena del sistema de fosfotransferasa (PTS) ubicado dentro del operón de trehalosa de bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. En una realización preferida, la sobreexpresión de uno o más transportadores de trehalosa como se describe en este documento se acompaña por la inserción de un promotor 5' a uno o más transportadores de tal manera que el promotor se une de forma operativa a la secuencia de transportadores. Unido de forma operativa se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes so descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia de promotores "unida de forma operativa" a una secuencia de codificación se une de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se alcanza bajo condiciones compatibles con la secuencia de promotores. En una realización, dicho promotor es un promotor fuerte. En una realización adicional, dicho promotor es un promotor constitutivo. En aún otra realización, dicho promotor es un promotor de bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria endógena. Los promotores adecuados se pueden encontrar en el documento WO 2008/084115. 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. Aún más preferiblemente, el promotor es PhIIA (es decir el promotor de la proteína de unión a ADN similar a HU). De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida el promotor de PhIIA se inserta corriente arriba de las regiones de codificación del transportador de trehalosa endógena ubicado en el operón de trehalosa de la bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. En una realización, el promotor de PhIIA tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 13, que corresponde al promotor de PhIIA de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363. En otra realización, el promotor de PhIIA tiene una secuencia que es por lo menos 75% idéntica a la SEQ ID NO: 13, tal como por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a la SEQ ID NO: 13. En una realización adicional, el PhIIA es una bacteria de ácido láctico (LAB) u ortólogo de Bifidobacteria de la SEQ ID NO: 13.

Por medio del ejemplo, los transportadores de trehalosa mencionados en este documento se representan por la secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 de las SEQ ID NOs: 9 y 10, respectivamente (que corresponden a números de acceso Genbank NC\_009004.1 (región 446937-447422) y YP\_001031803.1, respectivamente), y/o SEQ ID NOs: 11 y 12, respectivamente (que corresponden a números de acceso Genbank NC\_009004.1 (región 447563-449128) y YP\_001031804.1, respectivamente). En una realización, el transportador sobreexpresado como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de las SEQ ID NOs: 9 y 10, respectivamente, y/o SEQ ID NOs: 11 y 12, respectivamente, o que tiene un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 12. En una realización adicional, el transportador sobreexpresado como se utiliza en este documento se refiere a un gen o proteína que tiene la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a las SEQ ID NOs: 9 y 10, respectivamente, y/o SEQ ID NOs: 11 y 12, respectivamente, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. En otra realización, el transportador sobreexpresado como se utiliza en este documento codifica una proteína que es por lo menos 75% idéntica a la SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 12, tal como por ejemplo por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más % idéntica. Preferiblemente, las secuencias descritas anteriormente se refieren a o codifican proteínas transportadoras funcionales sobreexpresadas, preferiblemente sobreexpresadas de forma constitutiva. En otra realización, los transportadores sobreexpresados (de forma constitutiva) como se utiliza en este documento son una bacteria de ácido láctico (LAB) u ortógono de Bifidobacteria de las SEQ ID NOs: 9 y 10 y/o SEQ ID NOs: 11 y 12.

En una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC; y adicionalmente puede sobreexpresar, preferiblemente sobreexpresar de forma constitutiva, uno o más transportadores de trehalosa, en los que la bacteria gram positiva en adición contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional, tal como otsB y/o trehalosa 6-fosfato sintasa heteróloga funcional, tal como otsA, más preferiblemente en la que la bacteria gram positiva contiene por lo menos dicha trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional, incluso más preferiblemente en la que la bacteria gram positiva contiene dicha trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional pero no contiene dicha trehalosa 6-fosfato sintasa heteróloga funcional. Cada una de estas proteínas es como se describe en este documento en otra parte. Particularmente se prefiere una integración genómica de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa, en la que la integración es preferiblemente como se divulga en las solicitudes de patente europea con los números de solicitud 11168495.7 y 11173588.2. Estas solicitudes se refieren a los sistemas de expresión de doble cistrón. La posición preferida de trehalosa 6-fosfato fosfatasa, preferiblemente otsB, como se utiliza aquí, es como un segundo cistrón detrás del gen usp45 endógeno.

La bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento muestra un aumento de tolerancia hacia diversos entornos y amenazas asociadas a almacenamiento o estrés, tales como un aumento de resistencia al secado, secado por pulverización, congelación o secado por congelación, así como también un aumento de resistencia hacia las condiciones severas en el tracto gastrointestinal (por ejemplo ácidos y sales biliares). La bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención por lo tanto es particularmente bien adecuada para ser administrada a un sujeto mientras que muestra un aumento en la tasa de supervivencia en el tracto gastrointestinal. Esta bacteria gram positiva, por lo tanto también se puede aplicar para suministrar proteínas a un sujeto. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento, que contiene uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos y/o antígeno. El suministro de polipéptidos activos biológicos por ejemplo se ha descrito 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 describe en este documento se integran en el genoma bacteriano se integran en el genoma bacteriano. Una estrategia de integración particularmente preferida se divulga en las solicitudes de patentes europeas con los números de solicitud 11168495.7 y 11173588.2. En particular, los genes heterólogos se pueden insertarse 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 utiliza en este documento, el término "antígeno" generalmente se refiere a una sustancia que evoca una respuesta inmunitaria, 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 inmunitaria. Un antígeno como se prevé en este documento puede, en una alternativa, ser de tal manera que induzca la inmunotolerancia, por ejemplo, puede ser un autoantígeno (que incluye auto y alo antígenos) o puede ser un alérgeno. Por lo tanto, en un ejemplo preferido, un antígeno requiere un sistema inmunitario funcional de un sujeto al que se administra para provocar una respuesta fisiológica de dicho sujeto. El "antígeno" como se pretende en este documento también abarca "autoantígenos" que no provocan una respuesta inmunitaria en un individuo sano, pero lo haría en una persona que padece una enfermedad autoinmunitaria, es decir, la falla de un organismo para reconocer su propio constituyente partes (hasta los niveles submoleculares) como "auto", que da como resultado una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que resulte de dicha respuesta inmunitaria tan aberrante se denomina enfermedad autoinmunitaria. De acuerdo con lo anterior, el "antígeno" como se pretende aquí también abarca una proteína (fisiológicamente activa) que no provocaría una respuesta inmunitaria en un individuo sano, sino que lo haría en una

persona genéticamente deficiente en dicha proteína. Adicionalmente, el "antígeno" tal como se pretende aquí también abarca un alérgeno que no provocaría una respuesta inmunitaria en un individuo sano pero lo haría en una persona que padece una enfermedad alérgica.

5 Un antígeno como se prevé en este documento se puede derivar de cualquier polipéptido al que una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal sería terapéuticamente útil, por ejemplo, a partir de un patógeno, por ejemplo, de un patógeno viral, procariótico (por ejemplo, bacteriano) o eucariota, de una proteína no fisiológica (por ejemplo, una proteína derivada de tejido canceroso), de alérgeno (por ejemplo, para provocar tolerancia inmunitaria), 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.

10 El término "un producto profiláctica y/o terapéuticamente génico", 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 inmunitaria contra sí mismo (es decir, no es vacunógeno) 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 vacunógeno debería ser biológicamente activo en su forma expresada o, por lo menos, debe convertirse en la forma biológicamente activa una vez liberado de la célula anfitriona 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.

15 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 profiláctica y/o terapéuticamente génico se 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.

20 Ejemplos no limitantes de productos, polipéptidos o proteínas profiláctica y/o terapéuticamente génicos adecuados incluyen aquellos que son capaces de funcionar localmente o sistémicamente, por ejemplo, son capaces de ejercer actividades endocrinas que afectan el metabolismo local o de todo el cuerpo y/o es capaz de regular las actividades de las células pertenecientes al sistema inmunohemopoyético y/o es capaz 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 inmunitaria o inducción de respuestas inflamatorias de fase aguda a la lesión e infección y/o es capaz de potenciar o inducir resistencia a la infección de células y tejidos mediados por quimioquinas que actúan sobre sus receptores de células objetivo, o la proliferación de células epiteliales o la promoción de curación de heridas y/o es capaz de modular la expresión o producción de sustancias por las células del cuerpo. Ejemplos específicos de dichos péptidos, polipéptidos y proteínas incluyen, sin limitación, insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, 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 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , 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 similares del mismo. Se enumeran ejemplos específicos adicionales de dichos polipéptidos adecuados, por ejemplo, en el documento WO 96/11277, página 14, líneas 1 - 30; en el documento WO 97/14806, página 12, línea 1 a página 13, línea 27; o el documento US 5,559,007, col. 8, línea 31 a col. 9, línea 9. En un ejemplo, dicho péptido, polipéptido o proteína profiláctica y/o terapéuticamente activa 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 de trébol (TFF, por ejemplo, TFF1, 2 y/o 3), o PYY, más preferiblemente hPYY.

25 Como se menciona, en las realizaciones, el polipéptido profiláctico y/o terapéuticamente activo puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo neutralizante, o similares al mismo. 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 utiliza 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 utiliza aquí, incluye, pero no se limita a anticuerpos convencionales, anticuerpos quiméricos, dAb, anticuerpo biespecífico, anticuerpo triespecífico, anticuerpo multiespecífico, anticuerpo bivalente, anticuerpo trivalente, anticuerpo multivalente, VHH, nanocuerpo, Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub> 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 utiliza para describir una inmunoglobulina ya sea natural o parcial o totalmente modificada por ingeniería genética. 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')<sub>2</sub>, 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 totalmente modificado por ingeniería genética. 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, imitadores de anticuerpo. 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, nanoanticuerpos 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 el presente documento, en el que un gen exógeno codifica la cadena ligera (V<sub>L</sub>) de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, y otro gen exógeno codifica la cadena pesada (V<sub>H</sub>) del anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, más preferiblemente en el que el fragmento funcional es Fab. En una realización, el gen exógeno que codifica V<sub>L</sub> o el fragmento funcional del mismo se acopla transcripcionalmente al extremo 3' del gen exógeno que codifica V<sub>H</sub> o el fragmento funcional del mismo.

En una realización, el anticuerpo (neutralizante) como se describe en el presente documento por lo menos parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de una molécula objetivo, tal como una citoquina o quimioquina o una toxina. Como se utiliza 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, como se detalla en los ejemplos. En particular, la inhibición o reducción se puede medir al determinar la puntuación colítica o al determinar la molécula objetivo en un tejido o muestra de sangre. Como se utiliza 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 por lo menos 10% o más, preferiblemente en por lo 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 seleccionadas de la lista de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12 (o sus subunidades IL-12p35 y 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 corte y empalme), IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y TNF $\alpha$ . Alternativamente, estas citoquinas se pueden inhibir mediante moléculas de unión que no son anticuerpos. Preferiblemente, dichas moléculas de unión son receptores de citoquina 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-1 $\alpha$ , MCP-1, RANTES y Eotaxina. Preferiblemente, dichas moléculas de unión están resolviendo el bloqueo de la activación inmunitaria 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 están resolviendo el bloqueo de inflamación a través de la unión a moléculas de adhesión de la lista I-CAM1,  $\alpha$ 4 integrina y  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrina. Preferiblemente, dichas moléculas de unión tienen un efecto agonístico y coestimulador sobre CD3, CTLA4 y/o PD1. Preferiblemente, dichas moléculas de unión son células T neutralizantes o tienen actividad de célula B al dirigir CD25, CD20, CD52, CD95, BAFF, APRIL y/o IgE. Preferiblemente, dichas moléculas de unión están resolviendo el bloqueo de inflamación a través de la unión a enzimas de la familia MMP. Preferiblemente, dichas moléculas de unión afirman un efecto anti-angiogénico, tal como neutralizar la actividad de  $\alpha$ v $\beta$ 3/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1 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 TNF $\alpha$ , IL-12, IFN $\gamma$ , IL-23 o IL-17.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos o moléculas de unión que se pueden utilizar como genes heterólogos en la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento incluyen:

- un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , fragmento de anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , dominio variable de anticuerpo único de anti-TNF $\alpha$ , receptor de TNF soluble o variante negativa dominante de TNF $\alpha$ ;
- anticuerpo anti-IL-12, fragmento de anticuerpo anti-IL-12, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12, receptor IL-12 soluble, variante negativa dominante de IL-12 o IL-12 dAb;
- 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 IL-12p35 dAb;
- anticuerpo anti-IL-12p40, fragmento de anticuerpo anti-IL-12p40, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12p40, receptor IL-12p40 soluble, variante negativa dominante de IL-12p40 o IL-12p40 dAb;

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

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

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

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

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

En una realización preferida, dicho anticuerpo es un fragmento FAB (fragmento de unión a antígeno). Los fragmentos FAB se conocen bien en la técnica. Por medio de más orientación, un fragmento FAB es una región sobre un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y un dominio variable de cada una de de la cadena pesada y ligera.

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

20 El experto apreciará que los anticuerpos, que con fragmentos de anticuerpo funcionales, y en particular fragmentos FAB, se componen de diferentes polipéptidos individuales que se pueden unir de forma covalente mediante puentes de disulfuro. En particular, la cadena pesada y la cadena ligera se codifican mediante secuencias de codificación separadas individuales.

25 De acuerdo con lo anterior, en una realización el gen heterólogo divulgado en este documento 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 activo, en el que dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, preferiblemente respuesta inmunitaria protectora o respuesta de tolerancia inmunitaria, en un sujeto humano o animal, y/o dicho producto, polipéptido o proteína profiláctica y/o terapéuticamente génico, es capaz de producir un efecto profiláctico y/o terapéutico en un sujeto humano o animal.

30 En una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento o la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, para uso como se describe en este documento que se formula para almacenamiento. En particular, en una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento que se congela, seca, seca por congelación, seca por pulverización o se almacena en medio.

35 Como se explicó hasta ahora, la invención también se refiere a composiciones que comprenden la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento o que comprenden la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, para uso como un medicamento. 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 el tratamiento o para uso como un medicamento, un nutraceutico, un alimento médico, un alimento funcional, una composición probiótica, un aditivo para alimentos o un cultivo iniciador. En aún otra realización, la invención se refiere al uso de dicha composición o composición farmacéutica como un medicamento, nutraceutico, alimento médico, alimento funcional, probiótico, aditivo para alimentos, cultivo iniciador, o para la preparación de un medicamento, nutraceutico, alimento médico, alimento funcional, composición probiótica, aditivo para alimentos, cultivo iniciador.

40 Como se utiliza en este documento, las composiciones médicas como se describe en este documento, tal como formulación farmacéutica, nutraceutico, alimento médico o funcional o probiótico, preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias de vehículo farmacéuticamente aceptables y/o aditivos, por ejemplo, tampones, vehículos, excipientes, estabilizantes, etc. El término "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en este documento es consistente con la técnica y significa compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

45 En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una sustancia terapéutica o composición efectiva para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, por ejemplo, humano o animal, es decir, para obtener un efecto y desempeño local o sistémico

- deseado. Por medio del ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de bacterias puede comprender por lo menos 1 bacteria, o por lo menos 10 bacterias, o por lo menos  $10^2$  bacterias, o por lo menos  $10^3$  bacterias, o por lo menos  $10^4$  bacterias, o por lo menos  $10^5$  bacterias, o por lo menos  $10^6$  bacterias, o por lo menos  $10^7$  bacterias, o por lo menos  $10^8$  bacterias, o por lo menos  $10^9$ , o por lo menos  $10^{10}$ , o por lo menos  $10^{11}$ , o por lo menos  $10^{12}$ , o por lo menos  $10^{13}$ , o por lo menos  $10^{14}$ , o por lo menos  $10^{15}$ , o más células anfitrionas, por ejemplo, bacterias, por ejemplo, en una dosis única o repetida. La bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de la presente invención se puede administrar sola o en combinación con uno o más compuestos activos. estos últimos se pueden administrar antes, después o de forma simultánea con la administración de la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención.
- Preferiblemente la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento o composición que comprende esta bacteria gram positiva, se proporciona en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo un comprimido, cápsula, enema o dosis de aerosol medida, de tal manera que se administra una única dosis al sujeto, por ejemplo, un paciente humano o animal.
- Los ingredientes activos se pueden administrar de 1 a 6 veces al día, suficientes para exhibir la actividad deseada. Estas dosis diarias se pueden administrar como una sola dosis una vez al día, o se pueden administrar 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 de mantenimiento diaria se puede administrar durante un período clínicamente deseable en el paciente, por ejemplo desde 1 día hasta varios años (por ejemplo, para toda la vida restante del mamífero); por ejemplo de aproximadamente (2 o 3 o 5 días, 1 o 2 semanas, o 1 mes) o más 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 comprende administrar a dicho humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se enseña en este documento. 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 indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos como gatos, leones y tigres; equinos tales como caballos, burros y cebras; animales de alimento tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y conejillos de Indias; y así sucesivamente. Generalmente, el término "sujeto" o "paciente" se puede utilizar 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 animales no humanos, mamíferos y primates. Los pacientes preferidos pueden ser sujetos humanos.
- Ejemplos no limitantes adicionales de los tipos de enfermedades tratables en humanos o animales mediante el suministro de bacterias gram positivas, seleccionadas de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en el presente documento, que expresan opcionalmente péptidos polipéptidos o proteínas profilácticos y/o terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino que incluyen enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (tratable con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10 o IL-27 o péptidos trébol); enfermedades autoinmunitarias, que incluyen, pero no se limitan a, diabetes 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 alimenticias (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 derivado 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 gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención también se puede utilizar para tratar enfermedades infecciosas. En una realización, se puede obtener 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

gram positiva, de acuerdo con la invención. La CDAD está mediada por dos exotoxinas, la toxina A (enterotoxina, véase, por ejemplo, Genbank NC\_009089.1, región: 795843..803975 para la secuencia de ADN o YP\_001087137.1 para la secuencia de la proteína) y la toxina B (citotoxina; véase, 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 método 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. De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en el presente documento adicional contiene, expresa, produce y/o secreta anticuerpos neutralizantes contra *Clostridium*, preferiblemente *Clostridium difficile*, toxina A y/o toxina B, en la que cada una de estas toxinas tiene preferiblemente la secuencia como se indicó anteriormente. El lector experto comprenderá que, además de los anticuerpos de longitud completa, se pueden utilizar diversos fragmentos funcionales o anticuerpos modificados o variantes, como se describe en este documento en otra parte.

El lector experto apreciará que las enfermedades enumeradas específicamente en este documento son solo de ejemplo y su mención no pretende en modo alguno limitar el uso de la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se enseña en este documento. a estas enfermedades particulares En cambio, un lector experto entiende que la bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, divulgada en este documento, se puede utilizar para expresar en principio cualquier producto de expresión, preferiblemente polipéptidos, de interés, que puede ser de relevancia terapéutica no solo en los enumerados, sino también en varias otras enfermedades o afecciones 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, polipéptido o proteína profiláctica y/o terapéuticamente génico, se ha elegido o determinado para una dolencia determinada, un experto sería capaz de lograr su expresión, aislamiento y/o suministro utilizando los presentes reactivos.

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

La bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención secada, se puede preparar en forma de cápsulas, comprimidos, granulados y polvos, cada uno de los cuales se puede administrar por la ruta oral.

Alternativamente, se puede preparar alguna bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como suspensiones acuosas en medios adecuados, o se pueden suspender bacterias secadas en un medio adecuado justo antes de su uso, dicho medio incluye excipientes a los que se hace referencia en el presente documento y otros excipientes tales como glucosa, glicina y sacarinato de sodio.

Para la administración oral, se pueden formular formas de dosificación oral gastrorresistentes, formas de dosificación que pueden incluir también compuestos que proporcionan una liberación controlada de la bacteria gram positiva, y de ese modo proporcionan una liberación controlada de la proteína deseada codificada en la misma. Por ejemplo, la forma de dosificación oral (que incluyen comprimidos, gránulos, granulados, polvos) se puede recubrir con una capa delgada de excipiente (usualmente 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 se puede diseñar para permitir la liberación lenta de la bacteria gram positiva (y opcionalmente del producto de gen profiláctico y/o terapéutico del mismo), por ejemplo, comprimidos o cápsulas de liberación controlada, liberación sostenida y liberación prolongada o de acción sostenida. 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 utilizar para cualquier otro sitio de suministro, que incluye el intestino, el colon, la bioadhesión o el suministro sublingual (es decir, suministro a la mucosa dental) y suministro 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 anfitrionas 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 utilizar una formulación de enema para administración rectal. El término "enema" se utiliza para cubrir preparaciones líquidas destinadas para uso rectal. El enema se puede suministrar generalmente en recipientes de dosis única y contiene una o más sustancias activas disueltas o dispersas en agua, glicerol o macrogoles u otros solventes adecuados.

5 Una realización preferida de la invención proporciona una cápsula recubierta entérica que comprende bacterias gram positivas viables estabilizada seca por congelación, seca, o seca por pulverización, como se describe en este documento caracterizada porque las bacterias gram positivas viables, se estabilizan utilizando un agente no higroscópico. Como se utiliza en este documento se entiende que un agente no higroscópico significa cualquier excipiente normalmente utilizado en la formulación de una composición farmacéutica y en la que dicho agente exhibe  
10 una absorción de humedad en equilibrio a ambiente 40% de RH 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, isomalta (azúcar de poliol) o una sal de fosfato tal como por ejemplo fosfato de calcio dibásico fosfato dibásico anhidro, hidrogenofosfato de calcio o, por ejemplo, un azúcar tal como sacarosa.  
15

La cápsula utilizada en la formulación mencionada anteriormente normalmente se selecciona del grupo que consiste de una cápsula de gelatina, una cápsula de almidón, una cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y similares; en particular una cápsula de HPMC. Para el suministro intestinal de bacterias viables, las cápsulas recubiertas entéricas de la presente invención deben estar a pH bajo (hasta pH 5.5) y tienen un perfil de disolución acelerado a un pH más  
20 alto (por encima de pH 5.5). La liberación óptima se realiza cuando las cápsulas se desintegran a un pH de aproximadamente 6.8 dentro de 1 hora. Por lo tanto, 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 un pH hasta 5.5 y que es soluble a un pH por encima de 5.5; en particular a un pH por encima de 6.0; más en particular con un perfil de disolución rápida a un pH de aproximadamente 6.8.

25 El polímero entérico utilizado para el recubrimiento entérico normalmente consiste en una sustancia polimérica formadora de película, que es soluble a un pH por encima de 5.5, en particular a un pH por encima de 6.0. Los polímeros conformables en película útiles en las diferentes realizaciones de la presente invención usualmente se seleccionan del grupo que consiste de un derivado de celulosa, un copolímero acrílico, un copolímero maleico, un derivado de polivinilo, shellac y similares; en particular un copolímero acrílico seleccionado del grupo que consiste de  
30 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 nombre comercial está, disponible comercialmente de Rohm Pharma, Alemania), copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo tal como Eudragit L100-55 (nombre comercial, disponible comercialmente de Rohm Pharma, Alemania), copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico-  
35 acrilato de octilo, y similares; más en particular el polímero formador de película consiste de copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo.

También se agrega una combinación de diferentes compuestos de estabilización (crioprotectores) a la biomasa bacteriana antes de secado, secado por pulverización, o secado por congelación. Esta combinación de compuestos de estabilización, que comprende un hidrolisato de almidón y una sal de ácido glutámico y/o un poliol, resulta en  
40 supervivencia y estabilidad mejorada de bacterias gram positivas secas, secas por pulverización, o secas por congelación, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria.

Se pueden utilizar formulaciones y cápsulas como se describe en este documento como un medicamento, nutracéutico, aditivo para alimentos, alimento funcional, alimento médico, cultivo iniciador y/o composición probiótica.

45 Por lo tanto, de acuerdo con la invención, en una realización preferida, la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento, o las composiciones (farmacéuticas) que comprenden esta bacteria gram positiva, se pueden administrar al animal o el humano a través de la mucosa, por ejemplo, una ruta oral, nasal, rectal, vaginal o bronquial mediante cualquiera de las formulaciones del estado de la técnica aplicables a la ruta específica. Las dosificaciones de bacteria gram positiva, para administración  
50 variarán dependiendo de cualquier número de factores que incluyen el tipo de bacteria y el gen codificado por el mismo, el tipo y la gravedad de la enfermedad que se va a tratar y la ruta de administración que se utilizará. Por lo tanto, las dosificaciones precisas no se pueden definir para todas y cada una de las realizaciones de la invención, pero serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica una vez que estén armadas con la presente invención. La dosificación se podría determinar de todos modos caso por caso al medir las concentraciones a nivel del suero de la proteína terapéutica y/o profiláctica después de la administración de cantidades predeterminadas de células, utilizando  
55 métodos bien conocidos, tales como aquellos conocidos como ELISA o Biacore (véase ejemplos ) El análisis del perfil cinético y la vida media de la proteína recombinante suministrada proporciona información suficiente para permitir la determinación de un rango de dosificación efectivo para la bacteria gram positiva.

60 En una realización, cuando la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, expresa un antígeno, por lo tanto también la invención puede proporcionar una vacuna. Preferiblemente, el antígeno puede ser capaz de provocar una respuesta inmunitaria en y ser utilizado como una 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 gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, tal como se describe en este documento, opcionalmente transformada con los ácidos nucleicos o vectores que codifican el antígeno y adicionalmente opcionalmente un excipiente. Dichas vacunas también pueden comprender un adyuvante, es decir, un compuesto o composición que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias surfactantes tales como lisolecitina, 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 en este documento un método para tratamiento o para una terapia, que comprende administrar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, o composiciones, preferiblemente una composición farmacéutica terapéutica o profiláctica a un individuo en necesidad de la misma.

Como se describió anteriormente, la composición que comprende la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención puede ser un cultivo iniciador, una composición probiótica, o un aditivo para alimentos. De acuerdo con lo anterior, la invención en un aspecto se refiere a un cultivo iniciador, una composición probiótica, o un aditivo para alimentos que comprende la bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento.

Un cultivo iniciador puede ser, por ejemplo, un cultivo líquido, cultivo presurizado líquido, en forma congelada o seca, que incluye, por ejemplo, forma seca, seca por congelación y forma seca por pulverización/lecho fluido, o congelada o seca por congelación concentrada. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador como se describe en este documento, que se seca, seca por pulverización, congela o seca por congelación. El cultivo se puede empacar al vacío, o bajo una atmósfera de, por ejemplo, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y similares. Por ejemplo, un cultivo inicial se puede producir y distribuir en recintos sellados, preferiblemente no pirogénicos, que pueden estar elaborados de un material plástico u otro material rígido, no flexible o flexible, en el lugar de fermentación y se pueden agregar al material orgánico para fermentarse, u opcionalmente cultivarse primero en un medio iniciador separado para obtener un cultivo de alta densidad.

Un cultivo iniciador también puede contener, adicionalmente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de acuerdo con 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, tal como leche en polvo o azúcares.

Un cultivo iniciador puede ser un cultivo puro, es decir, puede contener una biomasa de un aislado único de una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de acuerdo con la invención, es decir un clon que en principio se origina de una célula. En otra realización, un cultivo iniciador puede ser un co-cultivo, es decir, puede comprender más de una cepa de una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de la invención, opcionalmente que adicionalmente comprende microorganismos adicionales tales como bacterias o levaduras.

Se puede preferir que un cultivo iniciador o un cultivo de alta densidad contenga por lo menos 10<sup>2</sup> unidades formadoras de colonia (CFU) de una o más bacterias gram positivas, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de la invención, tal como por lo menos 10<sup>3</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>4</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>5</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>6</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>7</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>8</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>9</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>10</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>11</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>12</sup> CFU/g, o por lo menos 10<sup>13</sup> CFU/g.

Normalmente, un cultivo iniciador o un cultivo de alta densidad se puede agregar a un medio iniciador o a material orgánico o sustrato que se va a fermentar en una concentración de células viables de una o más cepas bacterianas (y opcionalmente de una o más cepas de levadura) que tiene por lo menos 10<sup>2</sup> (CFU) de una o más cepas bacterianas (y opcionalmente de una o más cepas de levadura) de la invención, tal como por lo menos 10<sup>3</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>4</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>5</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>6</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>7</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>8</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>9</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>10</sup> CFU/g, por ejemplo, por lo menos 10<sup>11</sup> CFU/g, por lo menos 10<sup>12</sup> CFU/g, o por lo menos 10<sup>13</sup> CFU/g del material orgánico, medio o sustrato.

En una realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador como se define en este documento para la preparación de un producto alimenticio o se refiere a un aditivo para alimentos o una composición probiótica, que comprende una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que carece de actividad de trehalosa 6-fosfato fosforilasa (TrePP) y ptcC. En una realización preferida el gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de trePP funcional, como se describe en este documento en otra parte. En una realización adicional, la bacteria gram positiva, en el cultivo iniciador, la composición probiótica, o el aditivo para alimentos no 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. En aún una realización adicional, la bacteria gram positiva, en

el cultivo iniciador, composición probiótica, o aditivo para alimentos como se describe en este documento no contiene un gen heterólogo funcional involucrado en el metabolismo (ya sea catabólico o anabólico) de trehalosa o trehalosa 6-fosfato. Dichos genes abarcan, sin limitación trehalasa, trehalosa fosforilasa, y trehalosa 6-fosfato hidrolasa.

5 La invención se refiere a un cultivo iniciador, composición probiótica, o aditivo para alimentos como se define en este documento, en el que la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, carece de actividad de TrePP y componente IIC de sistema PTS específico a celobiosa (ptcC). En una realización preferida, el gen que codifica ptcC endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de ptcC funcional, como se describe en este documento en otra parte.

10 En una realización adicional, la invención se refiere a un cultivo iniciador, composición probiótica, o aditivo para alimentos como se describe en este documento, en el que la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, sobreexpresa, preferiblemente sobreexpresa de forma constitutiva, 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 aún otra realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador, composición probiótica, o aditivo para alimentos como se describe en este documento, en el que la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, expresa uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos, como se describe en este documento en otra parte.

20 En una realización, el cultivo iniciador, composición probiótica, o aditivo para alimentos como se describe en este documento se seca, congela, seca por pulverización o seca por congelación.

25 Como se indicó anteriormente, en un aspecto, la invención se refiere al uso de la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se describe en este documento para la preparación de un cultivo iniciador, preferiblemente para uso como un aditivo para alimentos o composición probiótica o para uso en la preparación de un producto alimenticio. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un cultivo iniciador como un aditivo para alimentos, composición probiótica o para la preparación de un producto alimenticio.

30 Como se utiliza en este documento, el término "aditivo para alimentos" se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, preferiblemente formulada en una composición, que se puede agregar a un alimento humano o animal o pienso, apto para el consumo sin modificaciones adicionales o alternativamente después de una modificación adicional, tal como la fermentación parcial del alimento o pienso o la fermentación total o parcial de uno o más componentes del alimento o pienso. Por medio del ejemplo, y sin limitación, la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención, o las composiciones de acuerdo con la invención, tal como los cultivos iniciadores se describen en este documento, se pueden utilizar en la industria de lácteos, 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  
35 aumentar el sabor y mejorar la digestibilidad de la leche. Ejemplos de productos alimenticios a los que se hace referencia en este documento incluyen, entre otros, queso, yogur, crema agria, suero de leche, leche acidófila.

En un aspecto, la invención también se refiere a un método para preparar un medicamento, un aditivo para alimentos, una composición probiótica, o un cultivo iniciador como se define en este documento, en el que dicho cultivo iniciador es preferiblemente un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio, que comprende las etapas de:

40 i) propagar bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se define en este documento 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 propagada, como un medicamento, aditivo para alimentos, composición probiótica, o cultivo iniciador, respectivamente.

45 Los métodos para propagar bacterias gram positivas, así como también medios y sustratos capaces de ser fermentados por bacterias gram positivas, se conocen bien en la técnica. En una realización, la formulación como un medicamento, aditivo para alimentos, composición probiótica, o cultivo iniciador comprende la formulación como un cultivo líquido, cultivo presurizado líquido, forma congelada o seca, que incluye, por ejemplo, forma seca, forma seca por congelación y forma seca por pulverización/lecho fluido, o congelada o seca por congelación concentrada. Preferiblemente, la formulación comprende secado, secado por pulverización, congelación o secado por congelación.  
50

55 En un aspecto adicional, la invención también se refiere a un método para preparar un producto alimenticio, que comprende la etapa de mezclar la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, como se define en este documento, el aditivo para alimentos como se define en este documento, la composición probiótica como se define en este documento, o el cultivo iniciador como se define en este documento con un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva. El material de sustrato es normalmente una fuente de carbono, preferiblemente un carbohidrato o azúcar. Los carbohidratos capaces de ser fermentados por bacteria gram positiva, 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 las etapas de:

i) proporcionar la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, aditivo para alimentos, composición probiótica, o el cultivo iniciador como se describe en este documento;

5 ii) proporcionar un material de sustrato o una composición, preferiblemente una composición no tóxica o una composición comestible, que comprende un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva;

10 iii) mezclar la bacteria gram positiva, como se define en este documento, aditivo para alimentos como se define en este documento, la composición probiótica como se define en este documento, o el cultivo iniciador como se define en este documento con el material de sustrato o composición

iv) opcionalmente propagar dicha bacteria gram positiva, y/o fermentar dicho material de sustrato o composición con dicha bacteria gram positiva.

En este documento se describe un producto alimenticio directa o indirectamente obtenido o que se puede obtener mediante los métodos descritos en este documento.

15 Como se describió anteriormente, la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención acumula de forma ventajosa trehalosa intracelularmente. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención también se refiere a un método para acumular de forma interna trehalosa en una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, tal como trehalosa que está presente en el medio de crecimiento, o trehalosa agregada externa o exógenamente, que comprende la etapa de propagar bacteria gram positiva de acuerdo con la invención en un medio  
20 que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva. En una realización, el método para acumular de forma interna trehalosa en una bacteria gram positiva, comprende las etapas de:

i) proporcionar la bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, o el cultivo iniciador como se describe en este documento;

25 ii) proporcionar un material de sustrato o una composición, preferiblemente una composición no tóxica o una composición comestible, que comprende un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva;

iii) mezclar la bacteria gram positiva como se define en este documento, o el cultivo iniciador como se define en este documento con el material de sustrato o composición

30 iv) opcionalmente propagar dicha bacteria gram positiva, y/o fermentar dicho material de sustrato o composición con dicha bacteria gram positiva.

La bacteria gram positiva, seleccionada de y una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, de acuerdo con la invención muestra de forma ventajosa una resistencia mejorada a estrés así como también características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento mejoradas. De acuerdo con lo anterior, se describe en este documento un método para mejorar resistencia al estrés o características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento de una  
35 bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que comprende modificar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, de tal manera que carezca de actividad de TrePP. En una realización, el gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de trePP funcional. Preferiblemente la resistencia al estrés o características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento es una o  
40 más resistencias al estrés o características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento seleccionadas del grupo que comprende resistencia a condiciones ácidas, resistencia a sales biliares, resistencia a calor, resistencia a sal, resistencia a secado, secado por pulverización, congelación o secado por congelación, y resistencia osmótica.

En una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, en los que la bacteria gram positiva, no contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional (por ejemplo otsB) y/o una  
45 trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga funcional (por ejemplo otsA), como se describe en este documento en otra parte. En aún una realización adicional, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, en los que la bacteria gram positiva, no contiene un gen heterólogo funcional involucrado en el metabolismo (ya sea catabólico o anabólico) de trehalosa o trehalosa 6- fosfato. Dichos genes abarcan, sin limitación trehalasa, trehalosa fosforilasa, y trehalosa 6-fosfato hidrolasa.

50 La bacteria gram positiva, carece de componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC) actividad. En una realización preferida el gen que codifica ptcC endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que es incapaz de producir producto génico de ptcC funcional, como se describe en este documento en otra parte.

En una realización adicional, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, en los que la bacteria gram positiva, sobreexpresa, preferiblemente sobreexpresa de forma constitutiva, 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.

5 En aún otra realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, en los que la bacteria gram positiva, expresa uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente uno o más productos génicos profiláctico y/o terapéutico, como se describe en este documento en otra parte.

10 En una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, que adicionalmente comprende la etapa de secado, congelación, secado por pulverización, o secado por congelación de la bacteria gram positiva, medicamento, aditivo para alimentos, composición probiótica, o cultivo iniciador.

15 Los inventores han encontrado de forma sorprendente que la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención es capaz de acumular intracelularmente trehalosa sin la adición de trehalosa agregada externamente. De forma ventajosa, la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención se puede propagar en medio opcionalmente incluso sin la trehalosa agregada externamente pero aún acumula trehalosa internamente. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a los métodos como se describe en este documento, que comprende la etapa de mantener o propagar la bacteria gram positiva, como se describe en este documento en un medio que carece o que sustancialmente carece de trehalosa, o un medio que carece o que sustancialmente carece de trehalosa agregada externa o exógenamente. De forma ventajosa, dicho medio puede comprender otra fuente de carbono fermentable, tal como, pero sin limitación maltosa y/o glucosa.

20 De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, en los que la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención se mantiene o propaga en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, en el que 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 como se describe en este documento,  
 25 en los que la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención se mantiene o propaga en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, en el que dicho material de sustrato comprende maltosa. En una realización preferida, la invención se refiere a cualquiera de los métodos como se describe en este documento, en los que la bacteria gram positiva, de acuerdo con la invención se mantiene o propaga en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, en el que dicho material de sustrato comprende maltosa y en el que dicho material de sustrato comprende menos (tal como subóptimo),  
 30 no comprende o sustancialmente no comprende trehalosa.

Como se utiliza en este documento, un medio que no comprende o sustancialmente no comprende trehalosa o no se agrega exógena o externamente trehalosa 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 muy  
 35 baja para permitir que la bacteria sea capaz de utilizar una sola 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 de 2% en p/p o menos de 2% en v/v de trehalosa, preferiblemente menos de 1% en p/p o menos de 1% en v/v de trehalosa, más preferiblemente menos de 0.5% en p/p o menos de 0.5% en v/v de trehalosa, tal como  
 40 menos de 0.3, menos de 0.2, menos de 0.1, menos de 0.05, o menos de 0.01% en p/p o% en v/v de trehalosa. En otra realización, el medio contiene menos de 20% 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 de 1%.

45 En este documento se describe el uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento para acumular trehalosa intracelular en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. También se describe en este documento el uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento para acumular trehalosa intracelular en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, en la ausencia o sustancial ausencia de trehalosa. Se describe en este documento  
 50 adicionalmente el uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento para acumular trehalosa intracelular en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, cuando se mantiene o propaga sobre maltosa, preferiblemente como la única o sustancialmente única fuente de carbono.

55 Como se describió anteriormente, la bacteria gram positiva de acuerdo con la invención muestra una resistencia mejorada a una variedad de estrés ambiental así como también características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento mejoradas. De acuerdo con lo anterior, en este documento se describe el uso de la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento para mejorar la resistencia al estrés o para mejorar las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento en dicha bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria. También se describe  
 60 en este documento un método para mejorar resistencia al estrés o para mejorar características de fabricación,

procesamiento y/o almacenamiento en la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, que comprende generar la bacteria gram positiva, preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB) o Bifidobacteria, como se describe en este documento.

- 5 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, o se puede seleccionar de resistencia a condiciones ácidas o sales biliares, o resistencia a sales biliares. Las características de fabricación, procesamiento y/o almacenamiento se puede seleccionar del grupo que comprende secado, congelación, secado por congelación, secado por pulverización o almacenamiento en medio, preferiblemente congelación o secado por congelación, más preferiblemente secado por congelación.
- 10 El otro aspecto, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC y que adicionalmente sobreexpresa, preferiblemente sobreexpresa de forma constitutiva, uno o más transportadores de trehalosa. La invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y que carece de actividad de ptcC. En otra realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva, seleccionada de una bacteria de ácido láctico (LAB) y Bifidobacteria, que carece de actividad de TrePP y ptcC y (de forma
- 15 constitutiva) sobreexpresa uno o más transportadores de trehalosa. En una realización adicional, la invención se refiere a cualquiera de estas bacterias gram positivas, que no contienen trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional y/o trehalosa 6- fosfato sintasa heteróloga funcional. En otra realización, la invención se refiere a cualquiera de estas bacterias gram positivas, que contienen trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional y/o trehalosa 6- fosfato
- 20 sintasa heteróloga funcional. En una realización adicional, la invención se refiere a cualquiera de estas bacterias gram positivas, que contienen uno o más productos génicos heterólogos, preferiblemente productos génicos profiáticos y/o terapéuticos, preferiblemente que no contiene trehalosa 6-fosfato fosfatasa heteróloga funcional y/o trehalosa 6-sintasa heteróloga funcional.

Los aspectos y realizaciones de la invención se respaldan adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

25 EJEMPLOS

La Tabla 1 proporciona una descripción general de las medicaciones genéticas en las cepas descritas en este documento, excepto para las cepas utilizadas en la Figura 4 que se dan en la Tabla 2.

Tabla 1

cepa	a) operón de trehalosa		b) ptcC	c) otsB	d) thyA	e) Cargo
	trehalosa PTS I/II	TrePP				
sAGX0037	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	-	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hTFF10 (sitio thyA)
sAGX0085	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	-	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hTFF1 (sitio thyA)
sAGX0137	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	usp45>> otsB mutante	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hIL-10 (sitio thyA)
sAGX0139	wt (Ptre>>PTS)	wt	wt	usp45>>otsB	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hIL-10 (sitio thyA)
sAGX0147	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	usp45>> otsB mutante	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hIL-10 (sitio thyA)
sAGX0148	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	usp45>>otsB	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hIL-10 (sitio thyA)
sAGX0167	PhIIA>>PTS	KO	wt	usp45>>otsB	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hIL-10 (sitio thyA)
sAGX0169	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	-	KO (reemplazo génico)	PhIIA>>hTFF-1 (sitio thyA)
sAGX0248	wt (Ptre>>PTS)	KO	KO (codón de terminación)	-	wt	-
sAGX0272	wt (Ptre>>PTS)	KO	wt	-	wt	-

cepa	a) operón de trehalosa		b) ptcC	c) otsB	d) thyA	e) Cargo
	trehalosa PTS I/II	TrePP				
sAGX0309	PhIIA>>PTS	KO	wt	-	KO (eliminación de genes)	usp45>>CDP870 anti-TNF
sAGX0319	KO	KO	wt	-	KO (eliminación de genes)	usp45>>CDP870 anti-TNF
sAGX0346	PhIIA>>PTS	KO	KO (codón de terminación)	usp45>>otsB	KO (eliminación de genes)	-
sAGX0347	PhIIA>>PTS	KO	KO (eliminación de genes)	usp45>>otsB	KO (eliminación de genes)	-
sAGX0354	PhIIA>>PTS	KO	KO (codón de terminación)	usp45>>otsB	KO (eliminación de genes)	gapB>>CDP870 anti-TNF

Resumen de las modificaciones genéticas en las cepas descritas en este documento. Se indica a) la estructura del operón de trehalosa: si el promotor nativo del operón de trehalosa (Ptre) precede a los transportadores PTS de trehalosa (Ptre >> PTS) y si el 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) o otsB de tipo silvestre, ya sea insertada en el sitio 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 cargo (reemplazo génico); e) ausencia (-) o naturaleza y estructura de genes de cargo uidA, hIL-10 o anti-TNF CDP870, insertados en el sitio 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	Gen inactivado ID	Producto de proteína inactivado
sAGX0241	pmrB	4799106	bomba de eflujo de resistencia a múltiples fármacos
sAGX0242	celB	4796591	componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa
sAGX0245	araJ	4796972	Permeasa de eflujo de arabinosa putativo
sAGX0246	ptcB	4797109	componente IIB del sistema PTS específico a celobiosa
sAGX0247	ptcA	4798642	componente IIA del sistema PTS específico a celobiosa
sAGX0248	ptcC	4796893	componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa
sAGX0249	msmK	4797024	proteína de unión a ATP de transporte de unión a azúcar múltiple
sAGX0250	llmg_0453	4797778	enzima PTS IIABC específica a 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 maltosa ABC
sAGX0256	malF	4798442	Proteína malF permeasa de sistema de transporte de maltosa
sAGX0257	malE	4798313	proteína de unión al sustrato de transportador de maltosa ABC

Cepa	Gen inactivado	Gen inactivado ID	Producto de proteína inactivado
sAGX0258	lplB	4798767	proteína de unión al sustrato del transportador ABC de azúcar
sAGX0259	lplC	4796680	permeasa del transportador de azúcar ABC
sAGX0260	lplA	4797636	proteína de unión al sustrato del transportador ABC de azúcar
sAGX0261	bglP	4797495	Sistema PTS, enzima específica de beta-glucósidos IIABC
sAGX0262	llmg_1104	4798113	proteína de exportación de fármaco
sAGX0265	tagG	4798685	proteína permeasa de transportador ABC de ácido teicoico

Resumen de 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 se inactiva una selección de genes, tomada de las categorías funcionales de COG de *L. lactis*, "transporte y metabolismo de carbohidratos" [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/cogtik.cgi? gi = 20494 & cog = G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/cogtik.cgi?gi=20494&cog=G) (de la cual se tomó la nomenclatura de genes y proteínas). Se indica la ID del gen de los genes inactivados, así como el producto proteico inactivado.

La inactivación génica 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 inactivación de trePP.

## 10 Sección Experimental

Las cepas se cultivaron durante la noche (A) o durante 24 horas (B) en 50 ml de GM17T + trehalosa 500 mM a 30 °C, las células se recolectaron por centrifugación y se determinó el contenido de trehalosa: se lavaron 3 equivalentes de 10 ml de cultivo durante a noche con tampón de carbonato 0.25 M en el que se determinó después del peso del sedimento celular (peso húmedo). Las células se lisaron en 1 ml de tampón carbonato 0.25 M utilizando 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 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 dinucleótido fosfato nicotinamida-adenina (NADP+) a gluconato-6-fosfato con la formación de dinucleótido fosfato nicotinamida-adenina 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 patrón de trehalosa y se expresaron en mg/g de peso de sedimentos de células húmedas (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 trePP de tipo silvestre (sAGX0037 y sAGX0137) que 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 de 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 divulga en el documento WO 2008/084115) frente a ambos genes del sistema fosfotransferasa (PTS) del operón de trehalosa de k(sAGX0167). La Figura 1 (B) muestra que la cepa de tipo silvestre trePP sAGX0085 que no puede acumular trehalosa. La inactivación de trePP KO (sAGX0169) solo permite la acumulación de trehalosa.

A partir de la Figura 1, está claro que las cepas trePP de tipo silvestre 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 sitio 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). Dicha función no se ha descrito en *L. lactis* y no se esperaría que

estuviera presente, ya que contrarrestaría el metabolismo de la trehalosa por *L. lactis* al convertir la trehalosa-6-fosfato en la trehalosa intracelular inerte. Aquí observamos que, inesperadamente, esta función está presente en TrePP KO de *L. lactis* se puede realizarse por eliminación de genes, como se hizo aquí o por el establecimiento de un codón de terminación o mutación de cambio de marco o una mutación de promotor o la identificación de un mutante de trePP espontáneo no funcional. La acumulación de trehalosa es posible cuando *otsB* está presente como tal (sAGX0139) o combinado con trePP KO (sAGX0148) o incluso combinado adicionalmente con una inserción del promotor constitutivo fuerte *PhIIA* posicionado delante de ambos genes del sistema fosfotransferasa (PTS) (*PhIIA* >> *trePTC*) del operón de trehalosa de *L. lactis* (sAGX0167). La posición preferida de *otsB*, como se utiliza en este documento, 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*, en el que *rpmD* es la región intergénica que precede a *rpmD*).

EJEMPLO 2: La acumulación de trehalosa exógena proporciona protección frente a lisis biliar

#### Sección Experimental

Las cepas se cultivaron durante la noche en 50 ml de GM17T o GM17T + trehalosa 500 mM a 30 °C, las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 25 ml de NaCl al 0.9%. Se tomaron muestras y se determinaron las CFU al colocar las diluciones apropiadas (iniciales). En T0, se agregaron 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 al colocar las diluciones apropiadas (Figura 2 A), se determinó el contenido de trehalosa (Figura 2 B) esencialmente como se describe en el Ejemplo 1

#### Resultados

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 han acumulado trehalosa (sAGX0167 + trehalosa, sAGX0309 + trehalosa y sAGX0319 + trehalosa), es decir, 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 oxgal al 0.5% (Figura 2 A) coincide con la liberación de trehalosa intracelular (Figura 2 B).

EJEMPLO 3: La acumulación de trehalosa exógena proporciona protección frente a lisis biliar

#### Sección Experimental

Las células se recolectaron 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 de ejemplo para todas las cepas de *ptcC* wt.

#### Resultados

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 puede acumularse intracelular por síntesis de novo así como también después de la absorción del medio de crecimiento (sAGX0167 crecido en trehalosa 500 mM, como se describe en la Figura 1). Tanto la síntesis de novo sintetizada como la trehalosa acumulada exógenamente 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).

EJEMPLO 4: Acumulación y liberación de trehalosa en diversas cepas descritas en la Tabla 2

#### Sección Experimental

Las cepas descritas en la Tabla 2 se cultivaron en GM17 complementado con trehalosa 100 mM (Figura 4 A) o 500 mM (Figura 4 B). Las células se recolectaron y se resuspendieron en tampón M9 (Difco). El contenido intracelular de trehalosa 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 MG1363 de *L. lactis* de la base de datos COG (sección Transporte de carbohidratos y metabolismo) y sus genes se rompieron mediante recombinación dirigida por oligonucleótidos en un fondo de trePP KO (sAGX0272, requerido para la acumulación de trehalosa) (Tabla 2; Figura 4) Solo la alteración de *ptcC* evita la liberación de trehalosa.

- 5 Uno no puede predecir cuál de los genes enumerados en la Tabla 2 está implicado en la liberación de trehalosa. La alteración de cualquiera de los genes transportadores de PTS presentes en el operón de trehalosa (IImg\_0453; IImg\_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 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 a 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

#### Sección Experimental

- 15 Las cepas se cultivaron durante la noche en GM17T + trehalosa 500 mM a 30 °C, las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen igual 1 x M9 (Figura 5 A) o oxgal al 0.5% 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 intracelular de trehalosa se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

#### Resultados

- 20 La combinación de *ptcC* KO (inserción del codón de terminación así como eliminación del gen) y PhIIA >> trePTC (alta expresión constitutiva del transportador de trehalosa) permite una alta importación de trehalosa y retención intracelular completa.

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

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

#### Sección Experimental

- 30 Las cepas se cultivaron durante la noche en GM17T + trehalosa 500 mM a 30 °C, las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio volumen de NaCl al 0.9%. Se tomaron muestras y se determinaron las CFU al colocar las diluciones apropiadas (iniciales). En T0, se agregó medio volumen de oxgal 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 al colocar (solo 0-8 horas) de diluciones apropiadas y se representaron gráficamente como% de los valores iniciales de T0 (Figura 6 B).

- 35 Resultados

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

- 40 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 oxgal al 0.5% (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 mediante cepas trePP KO

#### Sección Experimental

- 45 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 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 crecen:

- 5 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 + 500) mM trehalosa; columnas 9 y 10)

10 EJEMPLO 8: Supervivencia después de la liofilización

Sección Experimental

15 Tabla 3 A: El cultivo de 200 L optimizado para 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 cargo en bandejas analíticas y a granel, 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.

20 Tabla 3 B: El cultivo de de 20 L durante la noche (GM17T + trehalosa 500 mM) se concentró 100 veces por 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 a granel y en viales (volumen de carga 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 tandas de producción independientes (sAGX0167 y sAGX0309) producen > 100% de supervivencia después de la liofilización.

25 Ambos polvos (A) y (B) liofilizados se formularon adicionalmente con excipientes adecuados para estandarizar CFU/g. sAGX0037, sAGX0167 y sAGX0309 se cargaron en cápsulas de HPMC a un mínimo de  $1.2 \times 10^{11}$  CFU/cápsula. Las cápsulas se unieron con una película de celulosa y se recubrieron con copolímeros de ácido metacrílico- acrilato de etilo como una película de recubrimiento entérico, para el suministro dirigido al intestino delgado y al colon.

30 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 como se experimenta durante el secado por congelación.

Tabla 3

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

## ES 2 676 707 T3

2					
sAGX0167 exp. 1	B	$1.14 \times 10^{11}$	$1.21 \times 10^{11}$	16.29 mg/g ww	106 %
sAGX0309 exp. 1		$1.21 \times 10^{11}$	$1.45 \times 10^{11}$	16.72 mg/g ww	120 %

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

#### Sección Experimental

5 Las cerdas (> 150 kg) se equiparon quirúrgicamente con cánulas en el duodeno proximal y el colon proximal. En la cánula duodenal, se insertaron sAGX0037 y sAGX0167 encapsulados y secados por congelación. 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 (conteo de CFU) y total (vivo y muerto, análisis Q-PCR) en las muestras. Los números se dan en la Tabla 4.

#### Resultados

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

15 La Tabla 4 y la Figura 8 indican que cuando se compara sAGX0037 encapsulado y secado por congelación (Tabla 4 A), con sAGX0167 encapsulado y secado por congelación (precrecimiento para acumulación de trehalosa intracelular; Tabla 4 B) aumenta la supervivencia durante el paso por el intestino del intestino de porcino tanto cuando los cerdos están en ayunas durante 24 horas (Figura 8 A) así 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

### EJEMPLO 10: La trehalosa se puede acumular después de la producción de biomasa.

#### Sección Experimental

20 Las cepas indicadas se cultivaron durante la noche en GM17T (16 horas a 30 °C) y se recolectaron por centrifugación (15 min a 4000 rpm). Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en GM17T + trehalosa 500 mM fresca 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

Como se indica en la Figura 9A, 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 se puede lograr en las 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.

5 EJEMPLO 11: La maltosa puede estimular la acumulación de trehalosa intracelular

Sección Experimental

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

Resultados

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

EJEMPLO 12: La maltosa se puede convertir en trehalosa intracelular durante o después de la producción de biomasa

15 Sección Experimental

Las cepas indicadas se cultivaron durante la noche (ON, 16 horas a 30 °C) en GM17T, las células se recolectaron por centrifugación (15 min a 4000 rpm), se resuspendieron en M17T + maltosa al 0.5% (MM17T) y se incubaron 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.

20 Resultados

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

ABREVIATURAS

ADP	adenosina-5'difosfato
anti-TNF	Anticuerpo que reconoce el factor de necrosis tumoral
ATP	adenosina-5'trifosfato
celB	componente IIC del sistema PTS específico para celobiosa
CFU	Unidad formadora de colonias
COGs	Agrupaciones de ortólogos de grupos de proteínas
Eno	enolasa fosfopruvato hidratasa) gen (Gen ID: 4797432)
gapB	Gen de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gen ID: 4797877)
Gen ID	Identificador genético
GM17	Oxido M17 + glucosa al 0.5%
GM17T	Oxido M17 + glucosa al 0.5% + timidina a 0.2 mM
GMM17T	Oxido M17 + glucosa a 0.5% + maltosa al 0.5% + timidina a 0.2 mM
hIL-10	Interlequina humana-10
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
hTFF-1	factor-1 de trébol humano
KO	Inactivación; eliminación de genes, reemplazo de genes, interrupción de genes
M	maltosa al 0.5%
M17	Oxido M17

## ES 2 676 707 T3

M9	Sales M9 (Difco)
MM17	Oxido M17 + maltosa al 0.5%
MM17T	Oxido M17 + maltosa al 0.5% + timidina a 0.2 mM
n/a	no aplicable
NADP <sup>+</sup>	fosfato dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADPH	fosfato dinucleótido de nicotinamida-adenina reducida
ODx	Densidad óptica a x nm de longitud de onda
otsA	síntesis de trehalosa osmorreguladora de <i>Escherichia coli</i> A; trehalosa-6-fosfato sintasa
otsB	síntesis de trehalosa osmorreguladora de <i>Escherichia coli</i> B; trehalosa-6-fosfato fosfatasa
otsBA	Unidad de expresión acoplada para otsB y otsA
pgmB	β-fosfoglucomutasa (ID de Gen: 4797271)
PhIIA	Promotor del gen de la proteína de unión al ADN similar a HU (ID de Gen: 4797353)
ptcC	Componente IIC del sistema de PTS específico a celobiosa
Ptre	promotor de operón de trehalosa
PTS	sistema de fosfotransferasa
rpmD	Región intergénica que precede a la 50 S proteína ribosómica del gen L30
T	timidina a 0.2 mM
thyA	gen de timidilato sintasa (ID del gen: 4798358)
TNF	Factor de necrosis tumoral
trePP	trehalosa-6-fosfato fosforilasa (ID de Gen: 4797140)
trePTC	Genes de fosfotransferasas putativos 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 beta-D-glucuronidasa de <i>Escherichia coli</i>
usp45	gen de proteína de 45 kDa secretada no identificada (ID de Gen: 4797218)
wt	tipo silvestre
ww	peso de sedimentos de células húmedas

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Actogenix N.V.

<120> Bacterias gram positivas modificadas y usos de las mismas

5 <130> AGX-031-PCT

<150> 11182642.6

<151> 2011-09-23

<160> 13

ES 2 676 707 T3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2310

<212> ADN

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 1

```

atgactgata aagattggat gatccaatat gacaaacaag aagtagggaa gcgttcttat      60
gggcaagaat ctttaatgtc attgggaaat ggttatttag ggcttcgtgg ggcgcctttg      120
tgggcaactt gttcggataa tcattatccg ggactctatg tcgcaggggt ctttaatcac      180
acaagtacag aagttgcagg tcatgatggt atcaacgaag atatggtaa ttggccaaat      240
ccacaattga ttaaggttta tattgataat gaattgggtg acttcgaggc agcaattgag      300
aaaaattctt cgattgattt caaaaatgga ttgcaaattg agagctataa tgtcagttta      360
gccaaaggag gtttgacttt agtgaccaca aaatttggtg atcccatcca ttttcacgat      420
tttgggttcg ttggagaaat catcgctgat ttttctggaa aattgcgaat agaaactttt      480
attgatgggt 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 ccaaaaaccc tgttgaattt      780
gtgctgacag aactggcagc aacttctgtc agtaaaattc aggaaaataa tgcaaattat      840
tgggagaaaag tatggcagga tggcgatatt gtcacgaat ctgatcatgc ggatttgcaa      900
agaatggtgc gaatgaatat tttccatatt cgccaagcgg cacaacacgg tgctaatacag      960
tttttagatg cgtccgtagg ttcgctgga 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 2 676 707 T3

catgtcagct tagctattgt ttacaatctg tggatttact tacagctgac agatgatgaa 1320  
 agtattttga ctgacgggtgg 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 acaaaaaggtt cgggaaaatc tttatttaga tattgatgag 1620  
 aatggtgtga ttgcccaata tgctaagtat tttgagctta aagaagttga ttttgcagct 1680  
 tatgaagcaa aatatggcga tattcatcgg attgaccggt tgatgaaggc tgaggggaatt 1740  
 tcgcctgacg aatatcaagt ggctaaacaa gctgatacct tgatgttaat gtacaatttg 1800  
 ggtcatgaac atgtgatcaa attggtcaaa caattagggt atgagctacc caaaaattgg 1860  
 ttgaaagtta atcgtgatta ttatcttgca cgaactgtcc atggttcaac gacatctcgt 1920  
 ccagtttttg ctgggattga tgtcaaattg ggtgattttg atgaagcgct tgacttttta 1980  
 atcactgcga ttggaagtga ttactatgat attcaaggcg gaaccacggc cgaagggggt 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

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 2

ES 2 676 707 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 2 676 707 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 2 676 707 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 2 676 707 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

5 <213> Escherichia coli

<400> 3

ES 2 676 707 T3

```

gtgacagaac cgттаaccga aaccctgaa ctatccgca aatatgcctg gttttttgat      60
cttgatggaa cgctggcgga aatcaaaccg catccccgatc aggtcgtcgt gcctgacaat    120
attctgcaag gactacagct actggcaacc gcaagtgatg gtgcattggc attgatatca    180

gggcgctcaa tggaggagct tgacgcactg gcaaaacctt atcgcttccc gtttagcgggc    240
gtgcatgggg cggagcgccg tgacatcaat ggtaaacac atatcgttca tctgccggat    300
gcgattgcmc gtgatattag cgtgcaactg catacagtca tcgctcagta tccggcgcg     360
gagctggagg cgaaagggat ggcttttgcg ctgcattatc gtcaggctcc gcagcatgaa    420
gacgcattaa tgacattagc gcaacgtatt actcagatct ggccacaaat ggcgttacag    480
cagggaaagt gtgttgtcga gatcaaaccg agaggtacca gtaaaggatga ggcaattgca    540
gcttttatgc aggaagctcc ctttatcggg cgaacgcccg tatttctggg cgatgattta    600
accgatgaat ctggcttcgc agtcgttaac cgactgggcg gaatgtcagt aaaaattggc    660
acaggtgcaa ctcaggcatc atggcgactg gcggggtgtgc cggatgtctg gagctggctt    720
gaaatgataa ccaccgcatt acaacaaaaa agagaaaata acaggagtga tgactatgag    780
tcgtttagtc gtagtatcta a                                             801

```

<210> 4

<211> 266

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

ES 2 676 707 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 2 676 707 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

5 <213> Escherichia coli

<400> 5

ES 2 676 707 T3

atgagtcggt tagtcgtagt atctaaccgg attgcaccac cagacgagca cgccgccagt 60  
 gccggtggcc ttgccgttgg catactgggg gcaactgaaag ccgcagggcg actgtggttt 120  
 ggctggagtg gtgaaacagg gaatgaggat cagccgctaa aaaaggtgaa aaaaggtaac 180  
 attacgtggg cctcttttaa cctcagcgaa caggaccttg acgaatacta caaccaattc 240  
 tccaatgccg ttctctggcc cgcttttcat tatcggctcg atctggtgca atttcagcgt 300  
 cctgcctggg acggctatct acgcgtaaat gcggttgcctg cagataaatt actgccgctg 360  
 ttgcaagacg atgacattat ctggatccac gattatcacc tgttgccatt tgcgcatgaa 420  
 ttacgcaaac ggggagtgaa taatcgcatt ggtttctttc tgcatattcc tttcccgaca 480  
 ccggaatct tcaacgcgct gccgacatat gacaccttgc ttgaacagct ttgtgattat 540  
 gatttgctgg gttccagac agaaaacgat cgtctggcgt tcctggattg tctttctaac 600  
 ctgacccgcg tcacgacacg tagcgcaaaa agccatacag cctggggcaa agcatttcga 660  
 acagaagtct acccgatcgg cattgaaccg aaagaaatag ccaaacaggc tgccggggcca 720  
 ctgccgcaa aactggcgca acttaaagcg gaactgaaaa acgtacaaaa tatcttttct 780  
 gtcgaacggc tggattattc caaaggtttg ccagagcgtt ttctcgccta tgaagcgttg 840  
 ctggaaaaat atccgcagca tcatggtaaa attcgttata cccagattgc accaacgtcg 900  
 cgtggtgatg tgcaagccta tcaggatatt cgtcatcagc tcgaaaatga agctggacga 960  
 attaatggtg aatacgggca attaggctgg acgcgcgttt attatttgaa tcagcatttt 1020  
 gaccgtaaat tactgatgaa aatattccgc tactctgacg tgggcttagt gacgccactg 1080  
 cgtgacggga tgaacctggt agcaaaagag tatggtgctg ctcaggacc acccaatccg 1140  
 ggcgttcttg ttctttcgca atttgcgggg gggcaaacg agttaacgtc ggcgttaatt 1200  
 gttaaccct acgatcgtga cgaagttgca gctgcgctgg atcgtgcatt gactatgtcg 1260  
 ctggcggaac gtatttcccg tcatgcagaa atgctggacg ttatcgtgaa aaacgatatt 1320  
 aaccactggc aggagtgctt cattagcgac ctaaagcaga tagttccgog aagcgggaa 1380  
 agccagcagc gcgataaagt tgctaccttt ccaaagcttg cgtag 1425

<210> 6

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 6

ES 2 676 707 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 2 676 707 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 2 676 707 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

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 7

ES 2 676 707 T3

atgaacaatt ttattcaaaa caaaatcatg cctccaatga tgaaatTTTT gaataccgct	60
gcagtcacgg caatcaaaaa tggatgatt taccctatcc catttatcat tattggttca	120
gtattcttga ttcttgggtca actgccattc caagcaggac aagacttcat gaacaaaatc	180
aaattggggc cactctTTTT acaaattaat aatgcttcat ttggtattat ggctttgctt	240
gccgtggtcg gtattgctta cgcttgggtt cgagatgcag gttatgaagg agtaccgct	300
ggtttaacag gtgtcattgt tcacatcttg ttgcaaccag acacaatcca tcaagtaaca	360
agtgttactg acccaactaa aacatcaaca gcatttcaag taggtggtgt cattgaccga	420
gcttggttag gtgggaaagg gatggttctc tcaatcatcg ttggactctt agtaggttg	480
atttactctg gctttatgcy tcggaacatc acaatcaaaa tgccagaaca agttccagaa	540
aacgttgccg catcatttac ttcacttgta cctgcaggag caatcattac aatggctggt	600
gtggttcatg gaatcacaac gattggcttc aacacaactt tcattgagtt agtttataaa	660
tggattcaaa caccattgca acacgtgact gacggtcggg ttggggctctt cgttattgcc	720
tttatgccag tatttatctg gtggttcggt gttcacggag cgacaatcat tgggtggatt	780
atgggaccat tgcttcaagc aaactctgct gacaatgctg ctctctaaa agcaggacat	840
cttagcctgt caaatggcgc ccatatcgtt actcaatcat ttatggacca atacttgaca	900
gttactggtt ctggtttgac cattggtttg gttatcttcc tcttagtgag tgcaaaatca	960
gttcaaggta aaactttagg acgaatggaa attggacctg cagtattcaa tatcaacgaa	1020
cctattctgt ttggacttcc taccgttttg aatccaattc ttgctattcc atttatcttg	1080
gctccgttga tttcaggaat tttgacttac ttagtgattt atctaggaat cattccacca	1140
tttaatggtg cctatgttcc ttggacaacc cctgcggtct tgtcaggata tctagtaggt	1200
ggctggcaag gtatggtttg gcaaattatt attcttgctt tgaccacagt tctctattgg	1260
ccatttgcca aagcttatga caatattctt ctgaaagaag aagctgaaac agaagctgga	1320
attaatgctg ccgaataa	1338

<210> 8

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 8

ES 2 676 707 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 2 676 707 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 2 676 707 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

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 9

```

atgtttggaa taggaaaaaa gaaagaattg agagatgata aaagccttta tgctccagtt      60
tctggggaag ttatcaacct ttcaacagtc aacgaccccg tattttcaaa aaagataatg      120
ggagacgggt tcgcggttga gccaaaagaa aataaaaattt ttgccccagt ttctgcaaaa      180
gtaactttgg ttcaaggaca tgcaattggt tttaaacgtg ctgatggctt agatgtactt      240
ttacatcttg gaattgatac agtagctctt aaaggtcttc attttaaaat caaggtcaaa      300
gttgatgata ttgtcaatgg tggatgatgag cttggaagcg ttgattgggc acagattgaa      360
gctgcagggt tagataaaac gacaatggtt atctttacaa atacaaaaga taaactctct      420
gagttcaatg tcaattatgg accagctact tctggaagtg aacttggtaa ggcaagtgtt      480
aaataa                                          486
    
```

<210> 10

<211> 161

10 <212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 10

ES 2 676 707 T3

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

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

5 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 11

ES 2 676 707 T3

atggcaaatt attcacaact tgcgacagaa attatcgcaa atgtaggtgg cgctgagaat 60  
 gtcacaaaag ttattcactg tatcactcgt cttcgtttta cettgaaaga caaagataaa 120  
 gcagatacgg cggcgattga agccttacct ggtgtcgcctg gagctgttta taactcaaac 180  
 ttgaatcaat atcaagtagt tattggacaa gctgtagaag atgtttatga cgaggttggt 240  
 gaacagcttg gagattcagt tgttgatgaa gatgcaacgg cgcaagcact tgctgcaaca 300  
 gcaccggcta gtggtaaaaa acaaaatcca attgttcatg cttccaagt ggttattggg 360  
 acaattacag gttcgatgat tccaattatt ggtttacttg cggctggggt gatgattaat 420  
 ggattattaa gtatctttgt taaaggaaat cgtttaattg aagtgattga ccctgcaagt 480  
 tcaacttacg tcattatctc aactctagca atgacaccat tttatttctt acctgtttta 540  
 gtaggatttt cagcagcaaa acaattagca cctaaagata ctgttttaca atttattggt 600  
 gctgctggtg gtggtttcat gattaatcca gggattacta acttggtaaa tgctcatggt 660  
 ggaacaaatg cggccggtaa aaatggtggt gttgaagcag cagctccagt agcaaatttc 720  
 cttggagtca cttttaatac aagttatfff ggaattccgg ttgctttgcc aagttatgct 780  
 tatacaattt tcccaatcat tgtggcggta gcaatcgcta aacctttgaa tgcttggttg 840  
 aaaaaggttt taccacttgc cttgcgtcca atttccaac cgatgattac tttcttcac 900  
 actgcttcaa tcattttact cttggtcggt cctgttattt caacaatttc atctggtttg 960  
 tcattcgtta ttgaccatat cttgtcatta aacttaggga ttgcaagtat tatcgtcgggt 1020  
  
 ggtttgtatc aatgtttggg tatatttggg ttgactggtg tggttgtacc acttatttca 1080  
 caagagttgg cagcaacagg agcaagctca cttaatatga ttgttagctt cacaatgctt 1140  
 gcgcaaggag ttggtgcctt gactgtcttc tttaaatcta aaaaagctga ccttaaagga 1200  
 ctttctgctc cagctgccat ttccgctttt tgtggagtaa ctgaacctgc catgtacgga 1260  
 attaacttga aatatgttcg cgtcttcac atgtcttcaa ttggtgcagc aattggtgct 1320  
 gggattgccg gatttgggtg cttacaaatg tttggatttt cagggtcatt gattagtttt 1380  
 cctaacttta tctctaatac attgacgcat catgcacctg cgggtaactt aatgctcttc 1440  
 tggattgcca ctgcggtatg tgctggtgcc actttcttat tagtttgggt ctttggttac 1500  
 aaggatactg atgtcatggg acaaggagtt gaacaaaaaa atgcatttaa ggatgctgta 1560  
 aaataa 1566

<210> 12

<211> 521

<212> PRT

5 <213> Lactococcus lactis

ES 2 676 707 T3

<400> 12

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 2 676 707 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

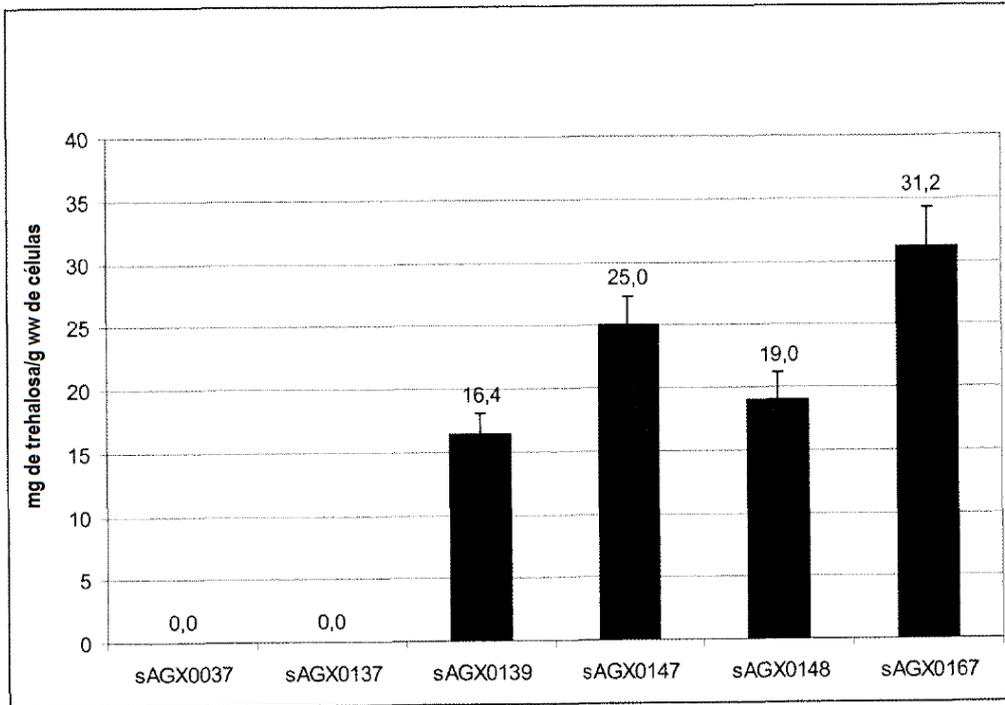


**REIVINDICACIONES**

1. Una bacteria gram positiva seleccionada de una bacteria de ácido láctico y una Bifidobacteria, en la que dicha bacteria gram positiva carece de actividad de trehalosa-6-fosfato fosforilasa (TrePP) y actividad del componente IIC del sistema PTS específico a celobiosa (ptcC).
- 5 2. La bacteria gram positiva de la reivindicación 1, en la que un gen que codifica TrePP endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que dicho gen que codifica TrePP endógeno es incapaz de producir un producto génico de trePP funcional.
3. La bacteria gram positiva de la reivindicación 1 o 2, en la que un gen que codifica ptcC endógeno se ha eliminado, interrumpido o inactivado parcial o completamente de tal manera que dicho gen que codifica ptcC endógeno es incapaz de producir un producto génico de ptcC funcional.
- 10 4. La bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha bacteria gram positiva no comprende fosfatasa de trehalosa-6-fosfato heteróloga funcional.
5. La bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha bacteria gram positiva comprende uno o más genes que codifican un transportador de trehalosa.
- 15 6. La bacteria gram positiva de la reivindicación 5, en la que dicho uno o más genes que codifican un transportador de trehalosa es endógeno a dicha bacteria gram positiva y se sobreexpresa en dicha bacteria gram positiva.
7. La bacteria gram positiva de la reivindicación 6, en la que dicho transportador de trehalosa sobreexpresado en dicha bacteria gram positiva se expresa de forma constitutiva.
8. La bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha bacteria gram positiva comprende uno o más productos génicos heterólogos.
- 20 9. La bacteria gram positiva de la reivindicación 8, en la que dicho uno o más productos génicos heterólogos son uno o más productos génicos profilácticos y/o terapéuticos o antígenos.
10. La bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha bacteria gram positiva se seca, seca por pulverización, congela o seca por congelación.
- 25 11. La bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha bacteria gram positiva es una bacteria de ácido láctico que es *Lactococcus lactis*.
12. Una composición que comprende una bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. La composición de la reivindicación 12, en la que dicha composición es una composición farmacéutica que adicionalmente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 14. La composición de la reivindicación 12, en la que dicha composición es un cultivo iniciador para la preparación de un producto alimenticio.
15. La composición de la reivindicación 12, en la que la composición es una composición probiótica.
16. La composición de la reivindicación 12, en la que la composición es un aditivo para alimentos.
- 35 17. La bacteria gram positiva de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la composición de la reivindicación 12 o 13, para uso como un medicamento.
18. Un método para preparar un medicamento, un aditivo para alimentos, una composición probiótica, o un cultivo iniciador, que comprende:
  - i) cultivar una bacteria gram positiva seleccionada de una bacteria de ácido láctico y una Bifidobacteria en un medio que comprende un material de sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, formando de esta manera una bacteria gram positiva propagada; y
  - 40 ii) formular dicha bacteria gram positiva propagada en dicho medicamento, dicho aditivo para alimentos, dicha composición probiótica, o dicho cultivo iniciador,
 en el que dicha bacteria gram positiva carece de actividad de actividad de TrePP y ptcC.
- 45 19. Un método para acumular de forma interna trehalosa en una bacteria gram positiva seleccionada de una bacteria de ácido láctico y una Bifidobacteria, que comprende cultivar dicha bacteria gram positiva en un medio que comprende un sustrato capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, en el que dicha bacteria gram positiva carece de actividad de actividad de TrePP y ptcC.

20. Un método para preparar un producto alimenticio, que comprende mezclar el aditivo para alimentos de la reivindicación 16, la composición probiótica de la reivindicación 15, o cultivo iniciador de la reivindicación 14 con un material de sustrato que es capaz de ser fermentado por dicha bacteria gram positiva, opcionalmente que adicionalmente comprende fermentar dicho material de sustrato.
- 5 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que el medio de cultivo comprende, como una fuente de carbono, maltosa, glucosa, o una combinación de maltosa y glucosa.
22. El método de la reivindicación 21, en el que el medio de cultivo no contiene trehalosa agregada de forma externa.

A



B

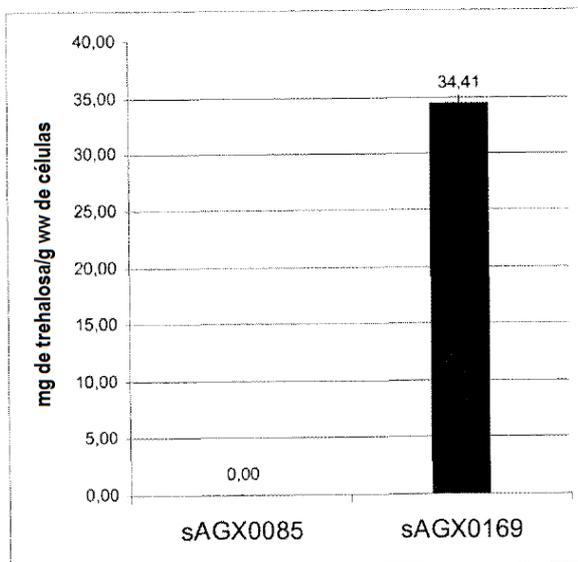


FIGURA 1

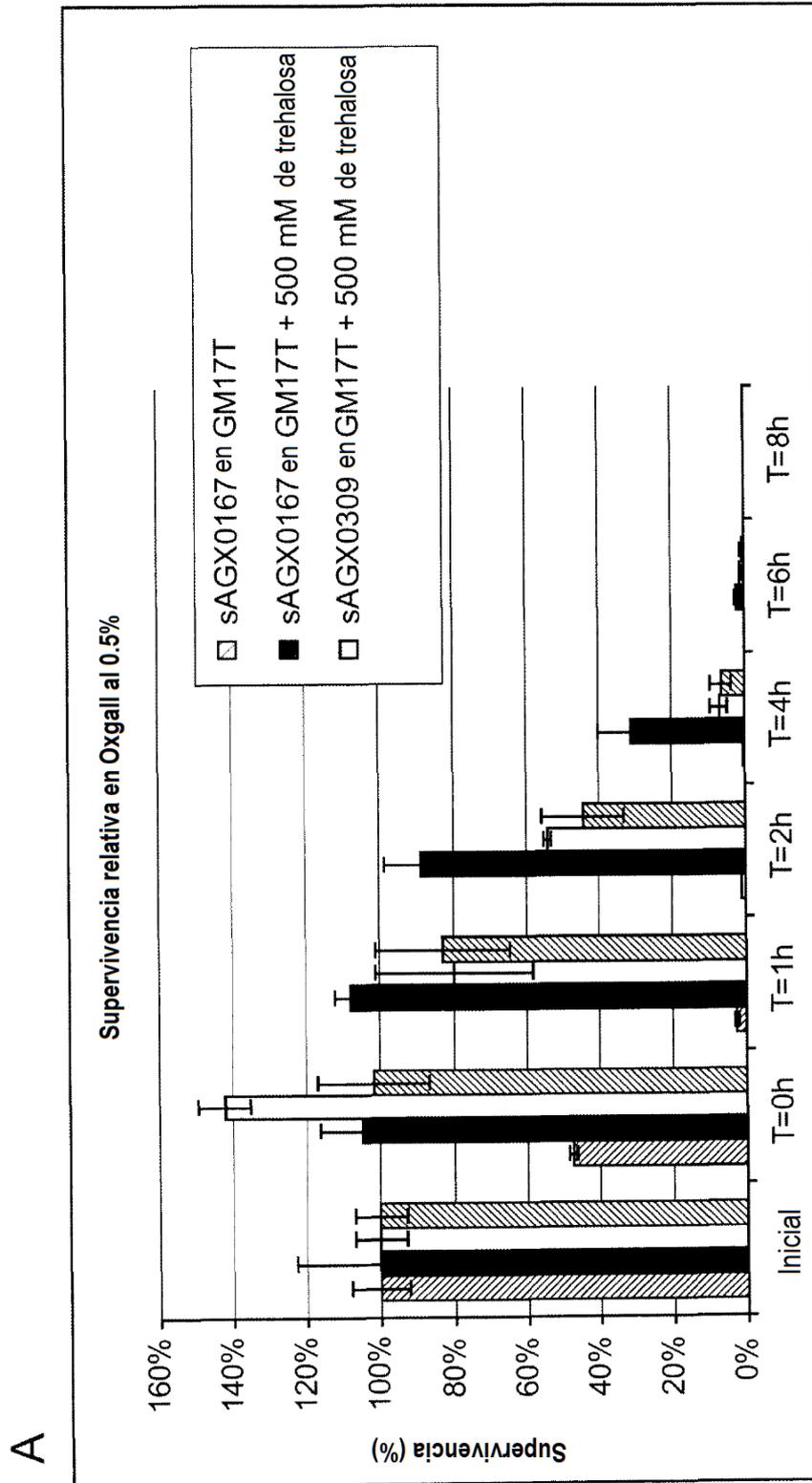


FIGURA 2

B

Acumulación y estabilidad de trehalosa en Oxgal al 0.5%

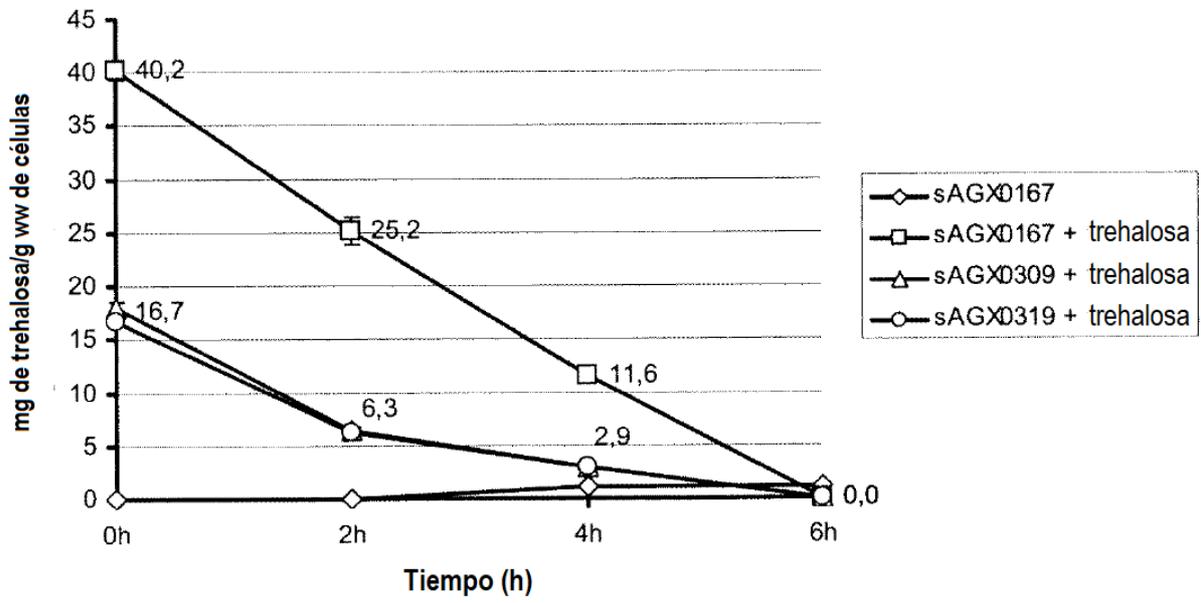
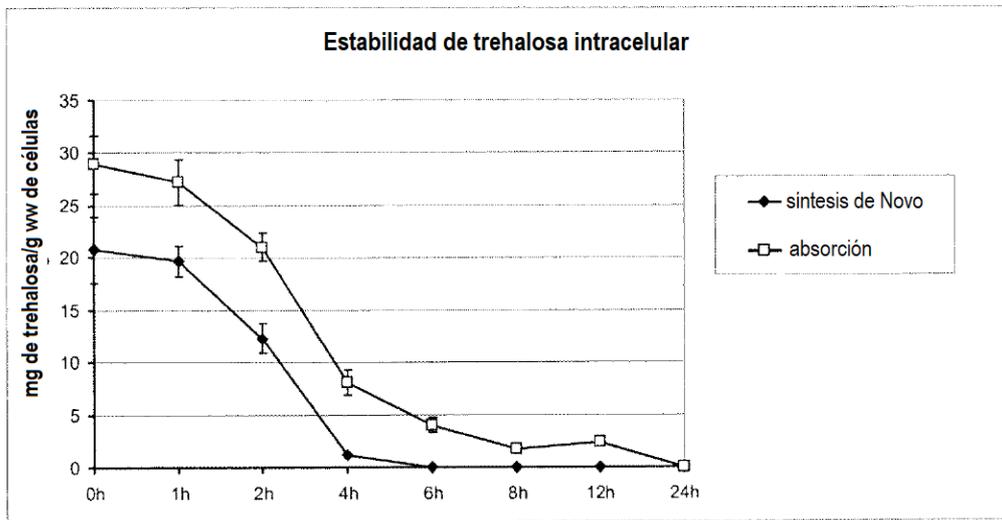


FIGURA 2

A



B

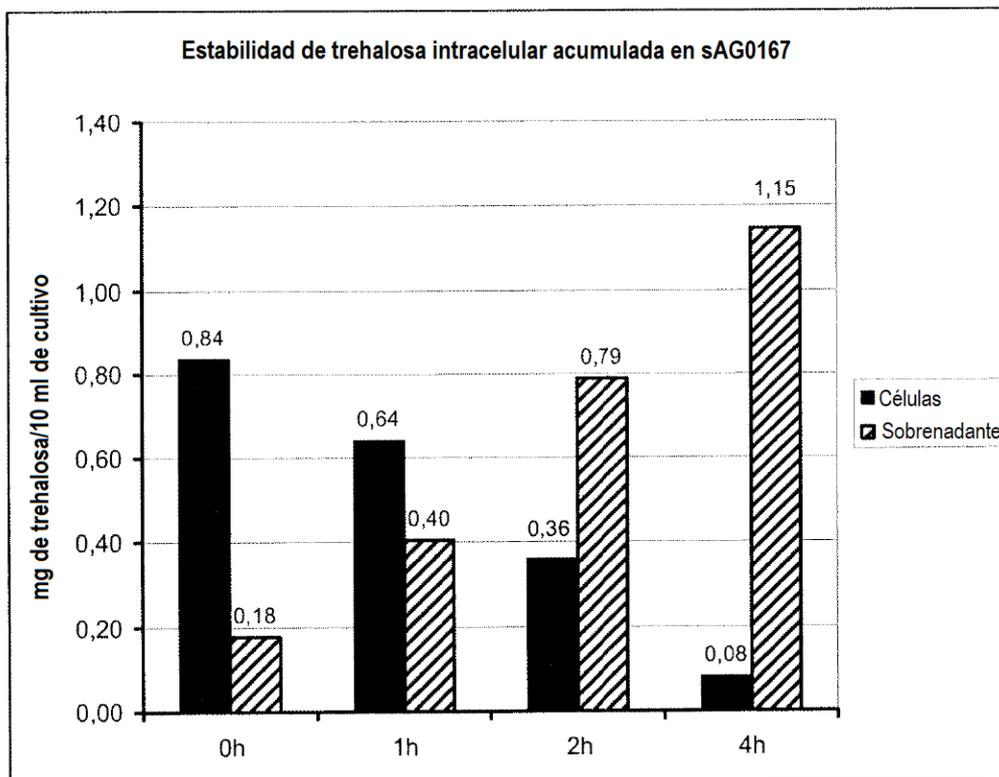


FIGURA 3

A

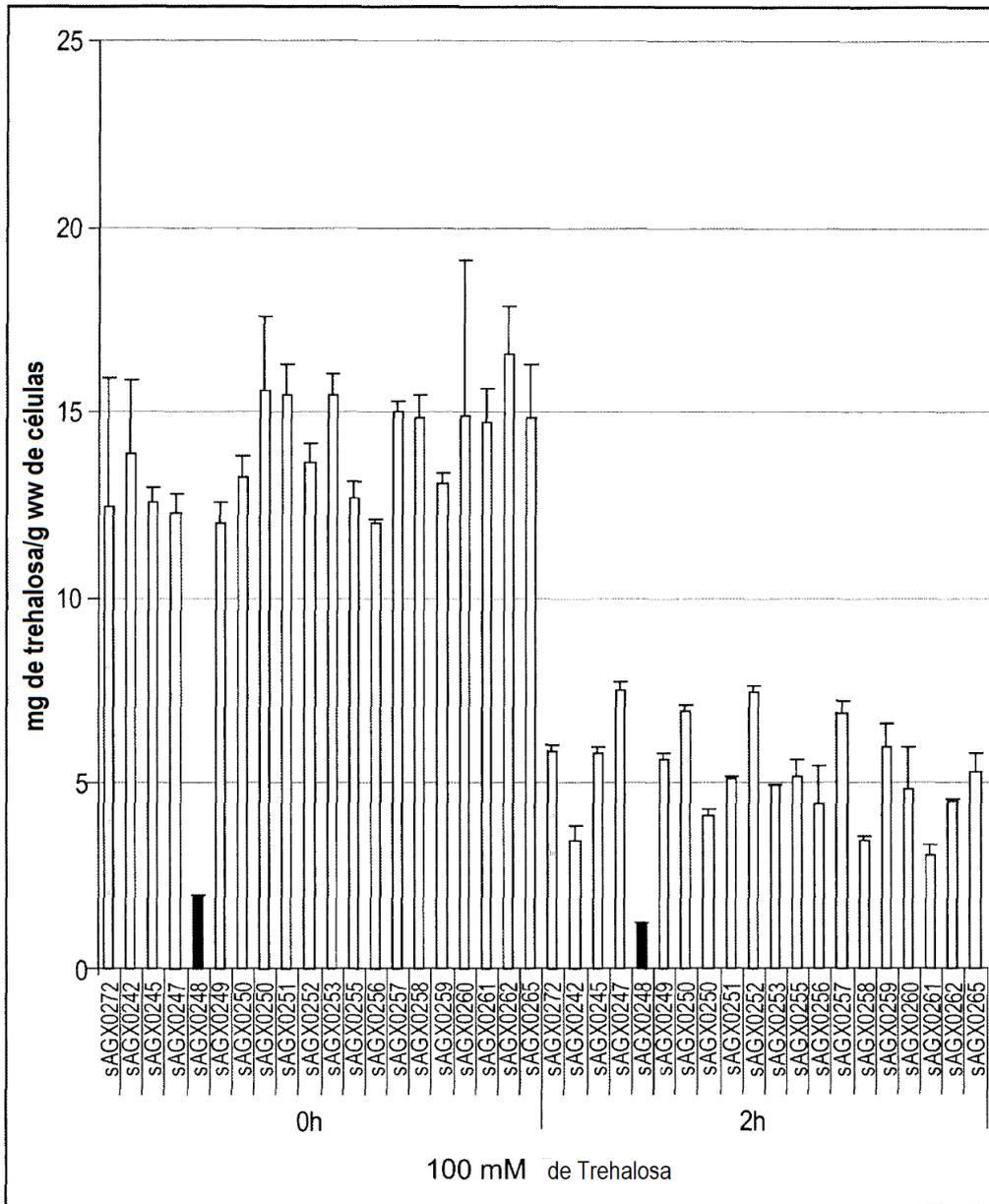


FIGURA 4

A

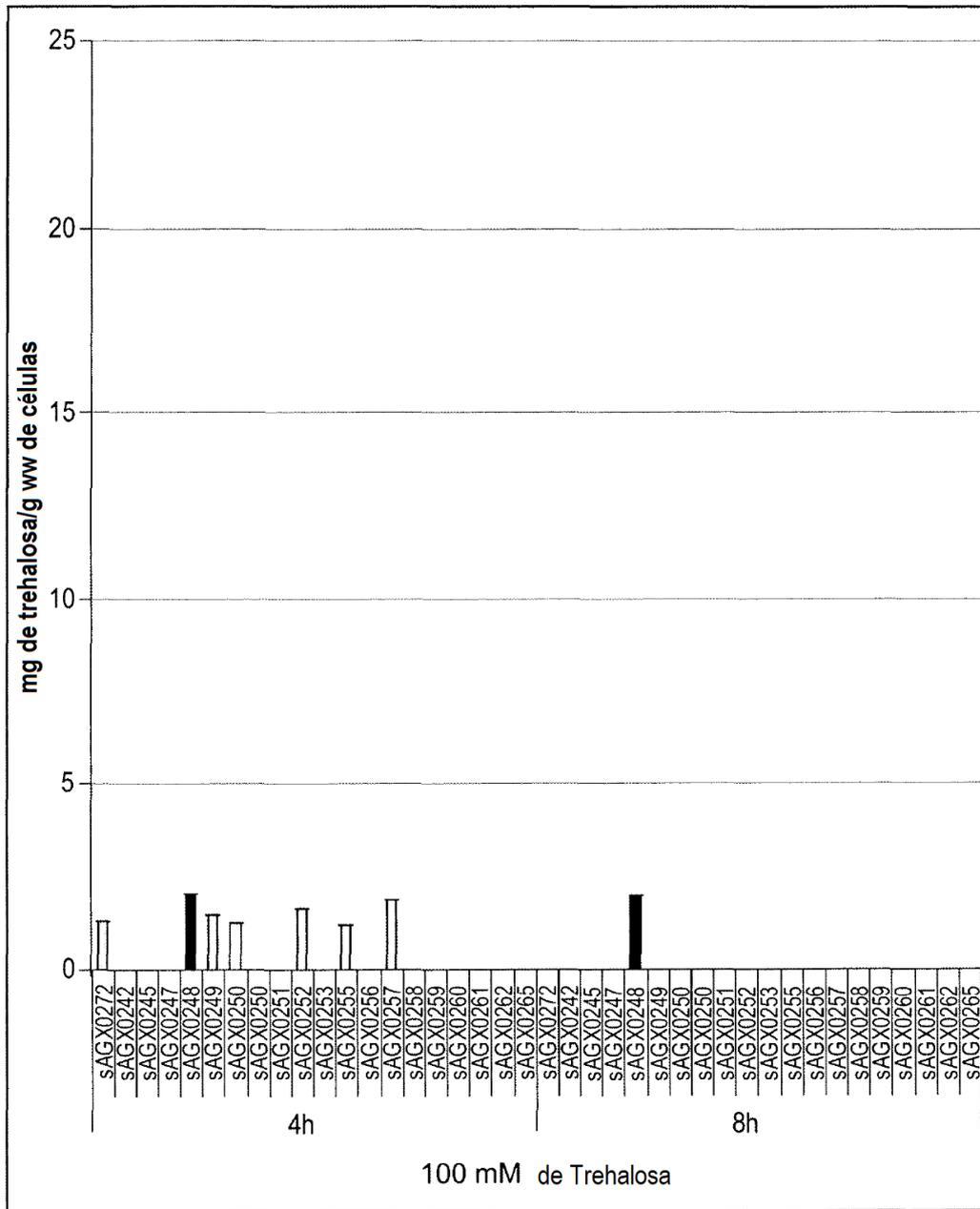


FIGURA 4  
(continuación)

B

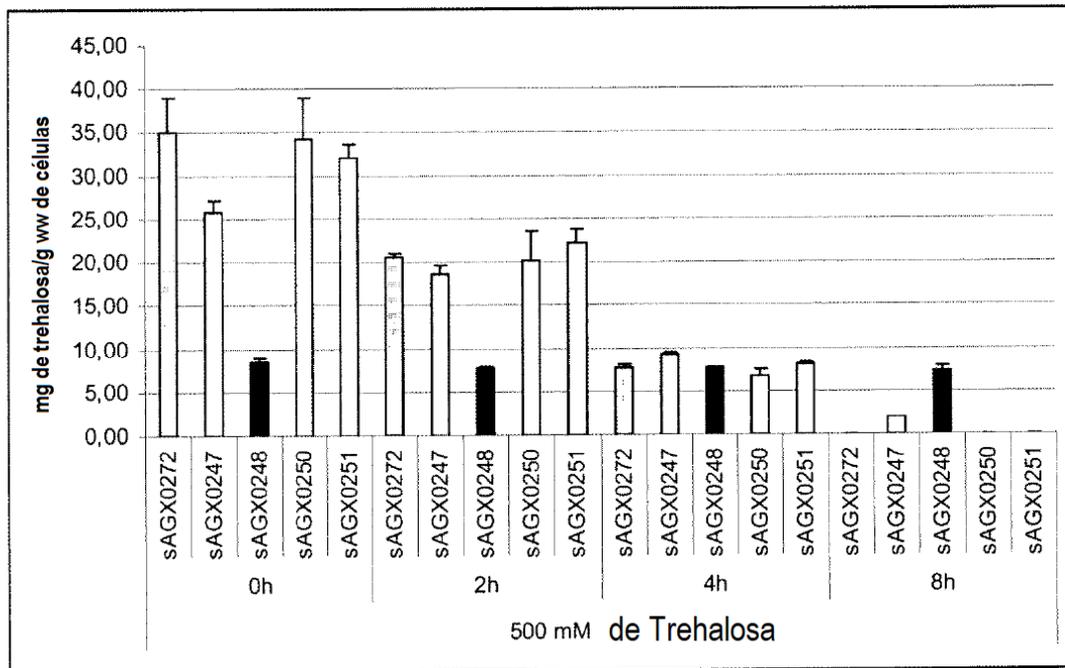
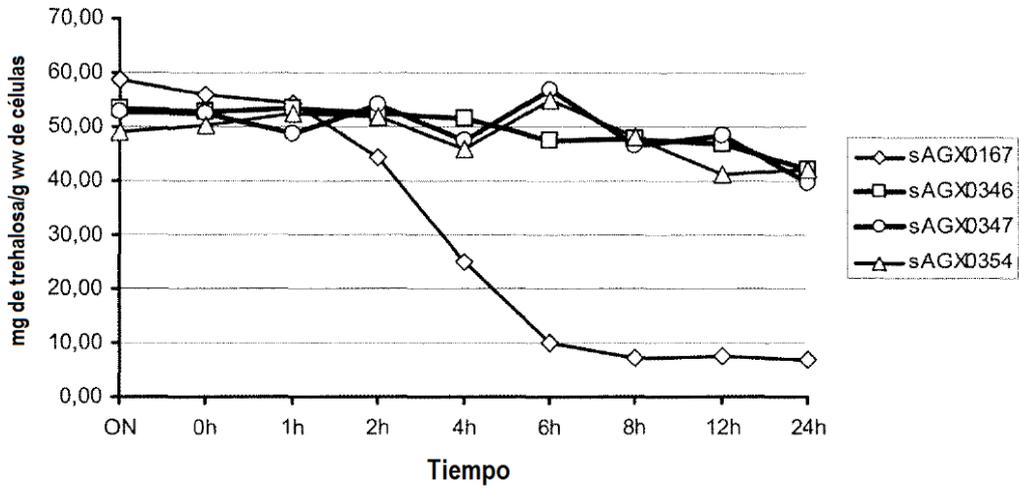


FIGURA 4

A

Acumulación de trehalosa en GM17T + 500 mM de trehalosa y estabilidad en 1xM9 a 37 °C



B

Acumulación de trehalosa en GM17T + 500 mM de trehalosa y estabilidad en Oxgal al 0.5% a 37 °C

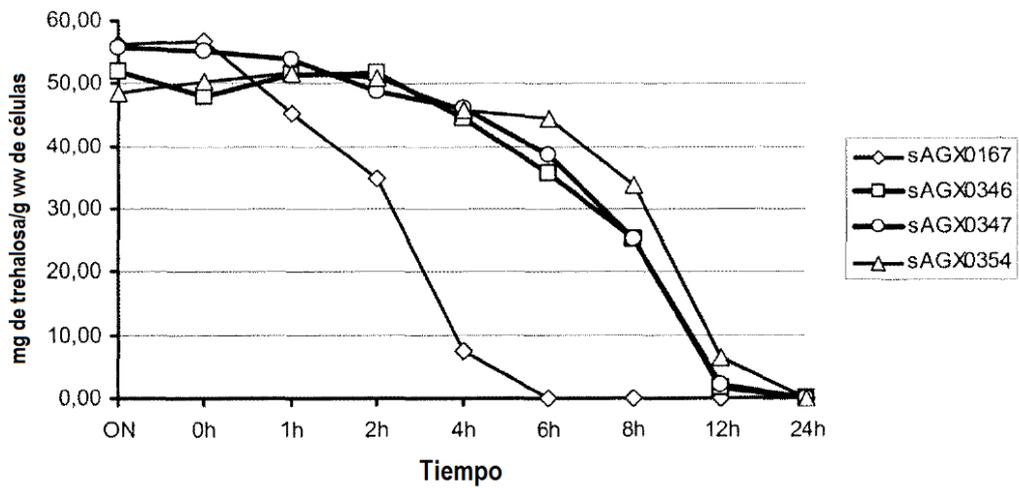
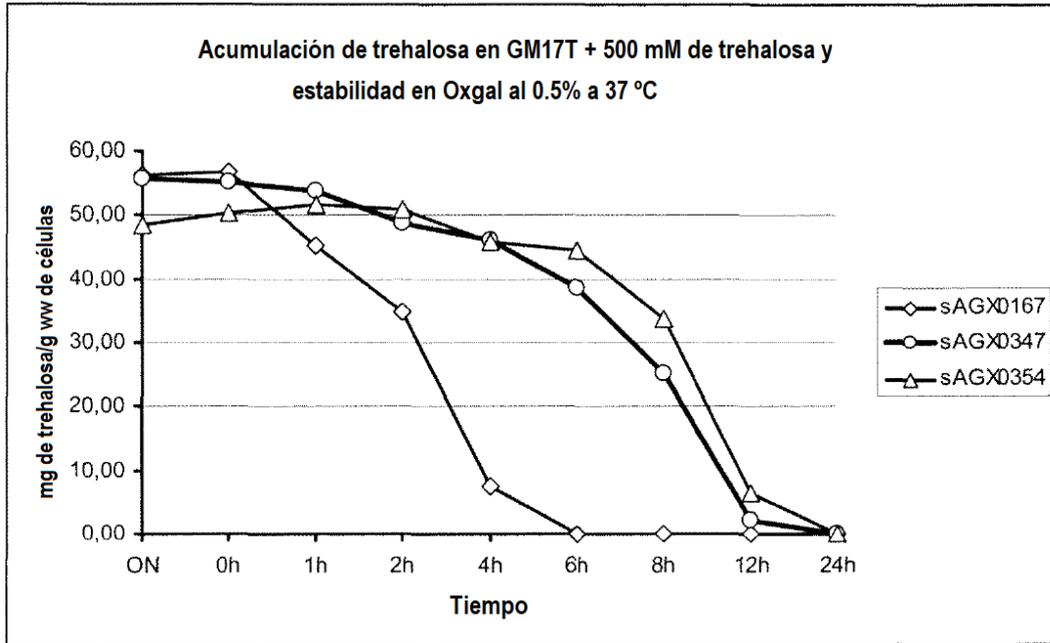


FIGURA 5

A



B

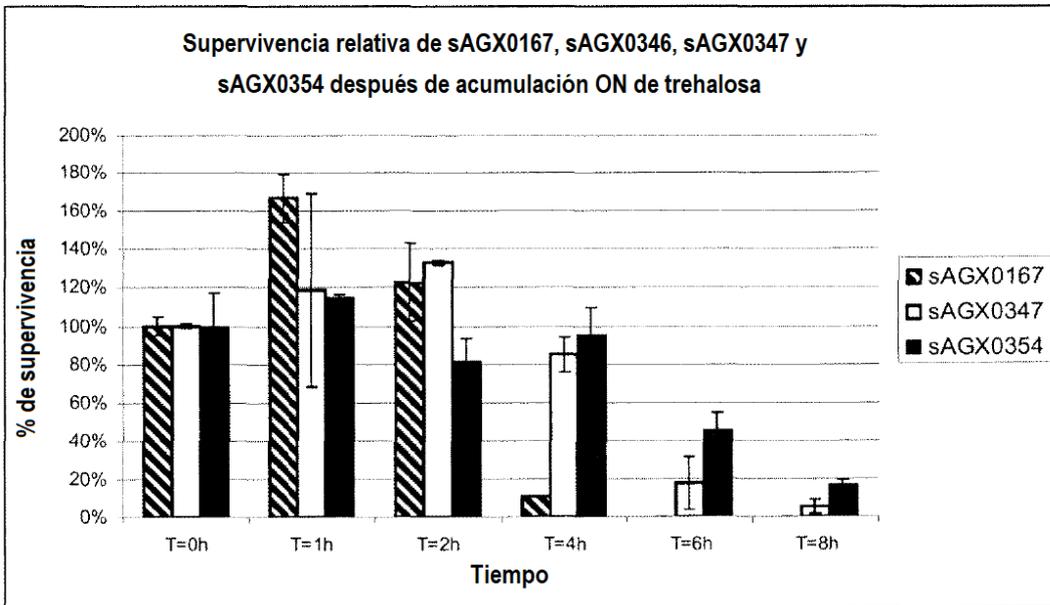


FIGURA 6

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

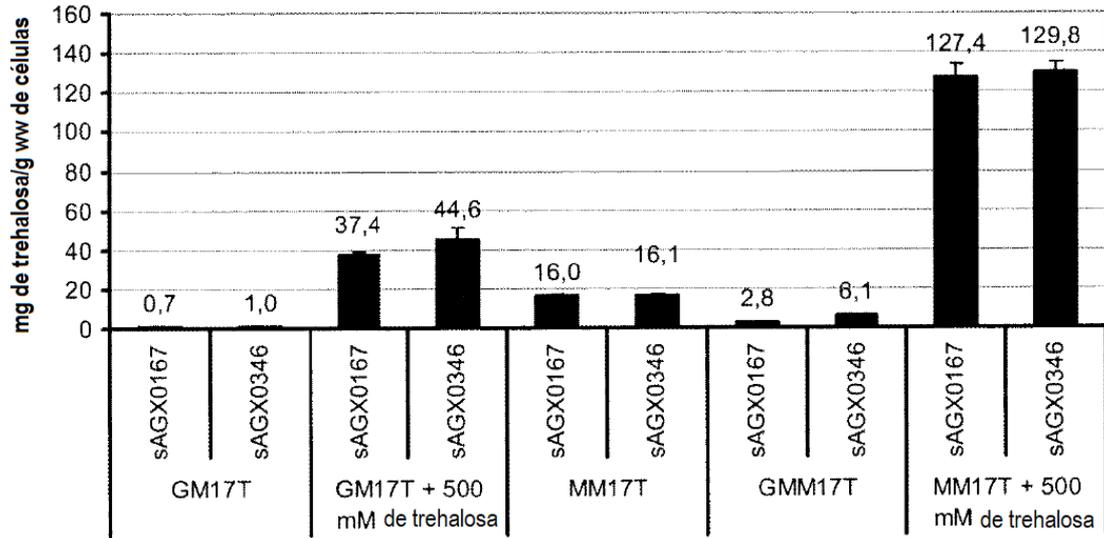
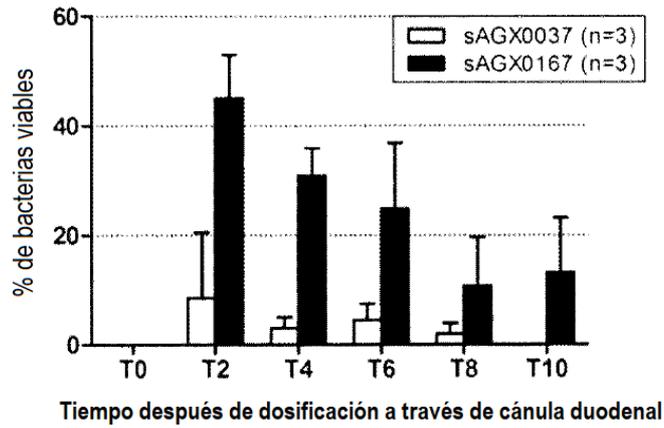


FIGURA 7

A

**Porcentaje de supervivencia de bacteria L. Lactis en el tracto GI de cerdos**

(muestras de cánula de colon)



B

**Porcentaje de supervivencia de bacteria L. Lactis en el tracto GI de cerdos**

(muestras de cánula de colon)

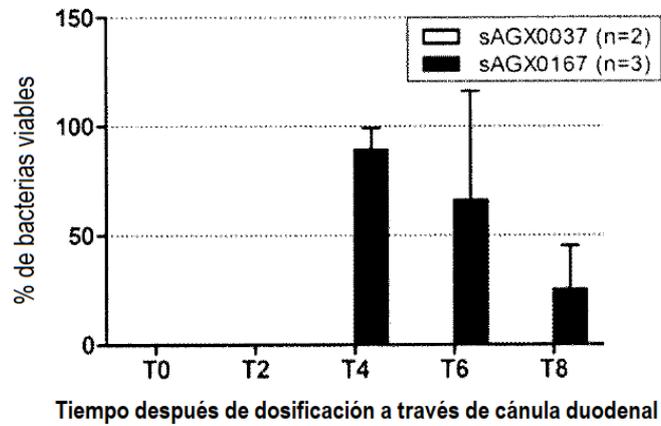
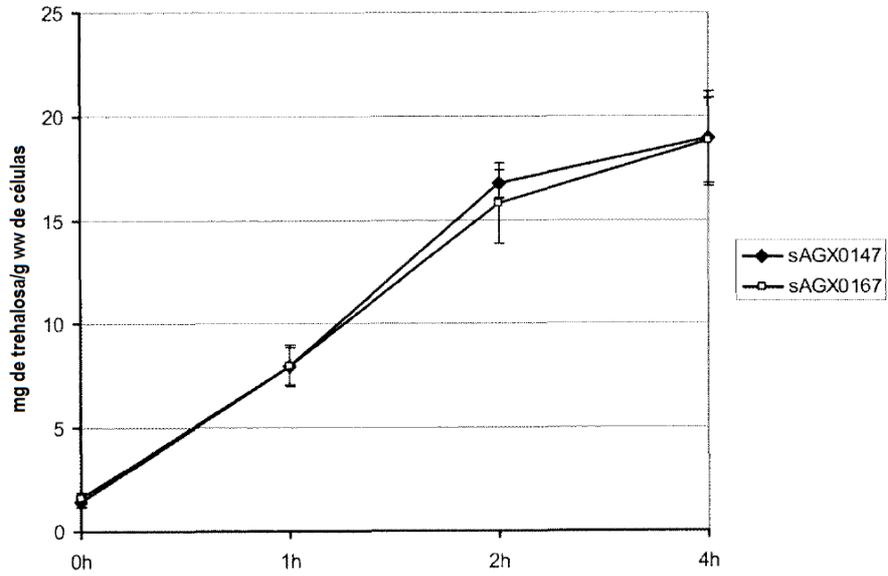


FIGURA 8

A



B

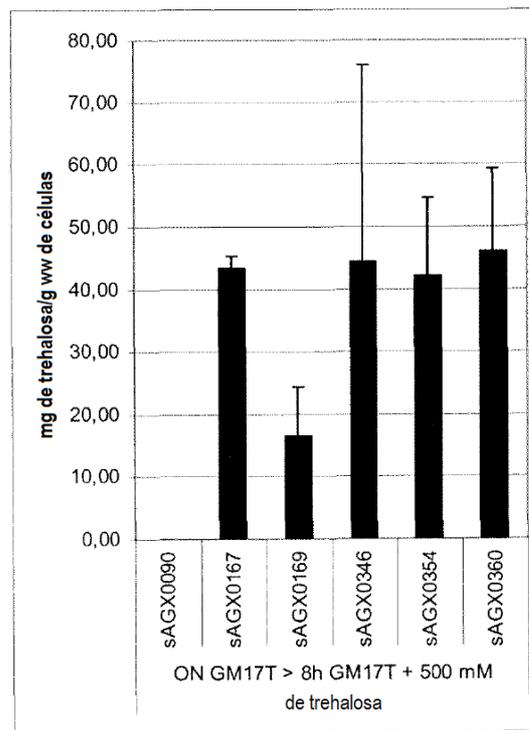


FIGURA 9

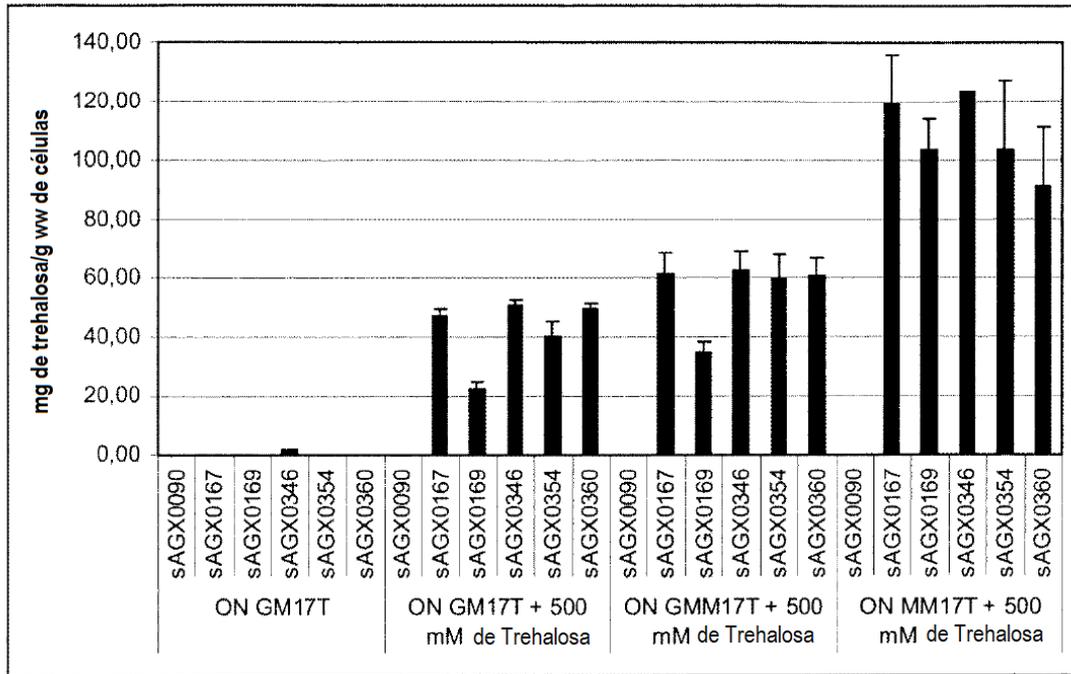


FIGURA 10

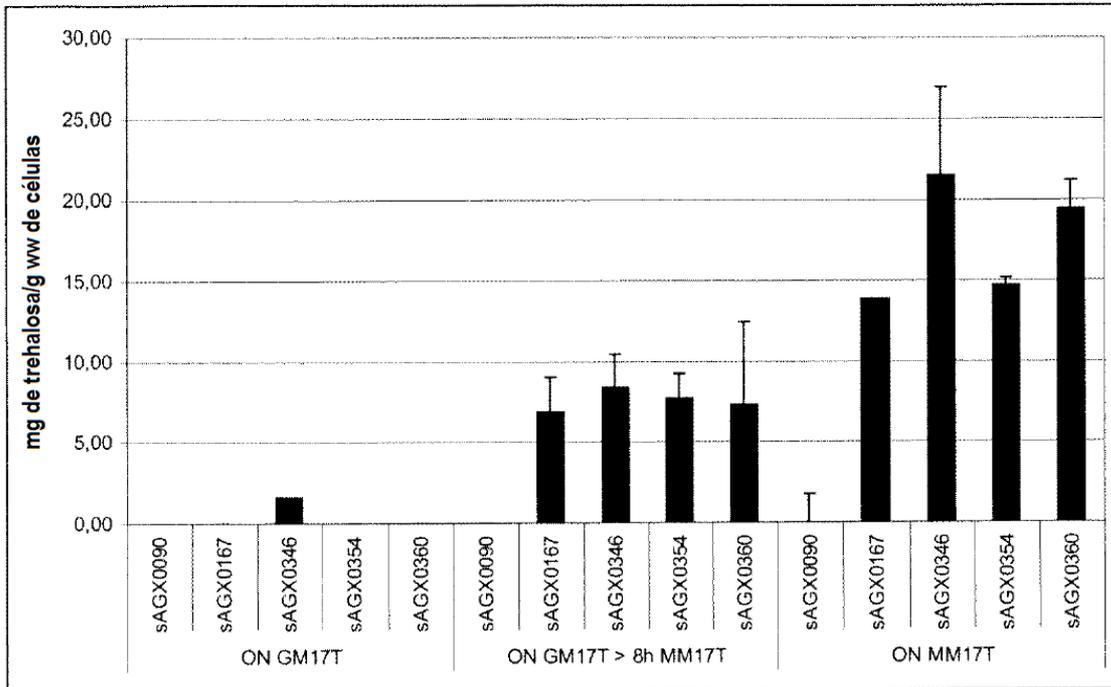


FIGURA 11