

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 877**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

**C12R 1/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012 PCT/EP2012/060431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012 E 12729396 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2714912**

54 Título: **Sistema de expresión policistrónica para bacterias**

30 Prioridad:

**01.06.2011 EP 11168495**

**12.07.2011 EP 11173588**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**ES 2 676 877 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

Sistema de expresión policistrónica para bacterias

Campo de la invención

5 La invención pertenece a los campos de biología y medicina, más particular biología molecular y celular, y se refiere a ingeniería recombinante y expresión de productos tales como péptidos, polipéptidos o proteínas mediante bacterias gram-positivas. Más específicamente, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva y a un ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica para expresión de dichos productos, y se refiere adicionalmente a vectores, usos y aplicaciones, tales como suministro, especialmente suministro terapéutico, de productos así expresados a sujetos.

10 Antecedentes de la invención

Hasta la fecha, se han desarrollado muchos sistemas de expresión para proteínas recombinantes, para diversas aplicaciones biotecnológicas. Se han establecido sistemas para la expresión génica heteróloga u homóloga en procariontes, levaduras y hongos y en células de mamíferos.

15 La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en levaduras se han expresado utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema anfitrión. A pesar de esto, se han detectado varias limitaciones en el sistema de *S. cerevisiae*. Los ejemplos son el rendimiento del producto, que normalmente es bajo, y la secreción ineficaz (muchas proteínas de *S. cerevisiae* no se encuentran libres en el medio de cultivo, sino que se retienen en el espacio periplásmico o se asocian a la pared celular) (Domínguez et al., *Int. Microbiol.*, 1998, vol. (2), 131 -142). Debido a las limitaciones de producción en levadura, surgió un gran interés para la expresión de proteínas en bacterias, que son fáciles de cultivar en un caldo de bajo coste y se utilizan frecuentemente para producir proteínas recombinantes. Entre los sistemas procariontes, los niveles de proteína más altos se obtienen usualmente utilizando expresión recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*) (Jana & Deb. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 67(3), 289-298). Sin embargo, en *E. coli*, las estrategias de producción más comúnmente utilizadas son intracelulares (en el periplasma o el citoplasma) y, por lo tanto, implican procesos de purificación corriente abajo costosos ya menudo problemáticos.

25 Las Bacterias de Ácido Láctico (LAB) son cada vez más importantes como anfitrionas para la expresión recombinante de polipéptidos heterólogos in vitro (por ejemplo, US 5,559,007), así como para la expresión in vivo o in situ y el suministro de antígenos y/o polipéptidos terapéuticamente relevantes (por ejemplo WO 97/14806). Las proteínas heterólogas producidas en estas anfitrionas bacterianas Gram-positivas se pueden secretar fácilmente en el medio, facilitando de esta manera su purificación así como su suministro directo a los sujetos.

30 La mayoría de los sistemas de expresión pueden manejar muy bien la expresión de una única proteína (como resultado de una sola secuencia de genes). Sin embargo, en algunos casos es deseable tener un sistema de expresión que sea capaz de expresar proteínas múltiples o complejos de proteínas multigénicas, por ejemplo, la expresión in vitro de anticuerpos o complejos proteicos, pero también la expresión in vivo o in situ y el suministro de dos o más proteínas que tienen un efecto sinérgico en una enfermedad particular o la expresión in vivo o in situ y el suministro de anticuerpos o fragmentos funcionales (multigénicos) de los mismos. En estos casos, es deseable tener los genes múltiples que codifican las proteínas o anticuerpos deseados bajo el control de un promotor, debido a la necesidad de una corregulación estrecha de los múltiples genes.

35 Los dos métodos más comunes para producir complejos de proteína recombinante son realizar la reconstitución in vitro de subunidades expresadas y purificadas individualmente, o implementar la reconstitución in vivo mediante la coexpresión de las subunidades en un anfitrión apropiado (Selleck & Tan, "Recombinant protein complex expresión in *E. coli*", *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 2008, capítulo 5: unidad 5, 21). Aunque la reconstitución in vitro se ha utilizado con éxito, el proceso es tedioso (cada subunidad se debe expresar y purificar, y el complejo se debe purificar más después de la reconstitución) y los rendimientos de reconstitución a menudo son bajos. Por el contrario, la reconstitución in vivo mediante coexpresión ofrece los beneficios de la eficacia (solo una ronda de expresión y purificación) y rendimientos y calidad potencialmente mayores del complejo deseado (el repliegamiento y montaje del complejo tiene lugar en presencia de enzimas plegables de proteína. En un entorno celular) (Selleck & Tan 2008, supra). La reconstitución in vivo se ha realizado con éxito al coinyectar células de insecto con baculovirus que expresan subunidades de proteína individuales (Tirode et al. *Mol. Cell*, 1999, vol. 3(1), 87-95), y en bacterias de múltiples plásmidos (Johnston et al. *Protein Expr. Purif.*, 2000, vol. 20(3), 435-443; McNally et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85(19), 7270-7273) o a partir de plásmidos policistrónicos especializados (Henricksen et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269(15), 11121-11132; Ishiai et al. *J. Biol. Chem.* 1996, vol. 271(34), 20868-20878; Li et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94(6), 2278-2283).

40 Se han descrito sistemas de expresión policistrónicos generales para producir complejos proteicos en *E. coli* (Selleck & Tan 2008, supra; Tan. *Protein. Expr. Purif.*, 2001, vol. 21(1), 224-234; Tan et al. *Protein Expr. Purif.*, 2005, vol. 40(2), 385-395). Estos sistemas utilizan el concepto de un casete de traducción, compuesto por la región de codificación con los codones START y STOP necesarios y precedido por señales de iniciación de la traducción tales como la secuencia Shine-Dalgarno (SD) y potenciadores de la traducción (Tan 2001, Tan et al. 2005, supra). Cuando se transcribe en ARNm, el casete de traducción contiene la información necesaria y suficiente para que la maquinaria de traducción de *E. coli* inicie y mantenga la traducción del ARNm en el polipéptido deseado (Selleck & Tan 2008, supra).

Se ha descrito un vector de expresión bicistrónico para la interleuquina-18 en *E. coli*, sin embargo, la región intergénica entre los dos genes consistía en un ligador sintético, y es claramente específico de un gen ya que la expresión de la caspasa-4 era mucho mayor que la expresión de ICE. Smolke et al. previamente demostrado que es posible controlar diferencialmente los niveles de proteína codificados por dos o más genes en un operón utilizando secuencias de la región intergénica sintética (Smolke et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66(12), 5399-5405; Smolke & Keasling. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, vol. 80(7), 762-776). Sin embargo, este método se basa en combinaciones aleatorias, y requiere la introducción de secuencias sintéticas en el anfitrión de expresión.

En los últimos años ha surgido la demanda de sistemas de producción de anticuerpos nuevos y mejorados. Los sistemas para la expresión de anticuerpos se han establecido en procariontes, levaduras y hongos y en células de mamíferos. Aunque los anticuerpos de cadena sencilla y de un único dominio son más fáciles de producir a partir de bacterias, los anticuerpos de tamaño completo generalmente tienen afinidades de unión más altas y menos riesgo de formación de anticuerpos neutralizantes cuando se inyectan.

Los anticuerpos de tamaño completo se pueden producir a partir de bacterias (Mazor et al. *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25(5), 563 - 565; Simmons et al. *J. Immunol. Methods*, 2002, vol. 263(1-2), 133-147). La mayoría de los informes sobre la expresión procariota recombinante describen la producción de fragmentos de anticuerpos, aunque casi exclusivamente de *E. coli*. Aunque muchas LAB modificadas por ingeniería genética son capaces de una unión de disulfuro correcta, la literatura contiene solo un número limitado de ejemplos de moléculas similares a anticuerpos producidas a partir de LAB (Kruger et al. *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20(7), 702-706; Beninati et al. *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18(10), 1060-1064; Chancey et al. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176(9), 5627-5636; Hultberg et al. *BMC Biotechnol.*, 2007, vol. 7, 58; Yuvaraj et al. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 2008, vol. 52(8), 913-920). Estos informes solo describen fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla expresados en especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus gordonii*, y no en fragmentos de anticuerpos de doble cadena multigénicos o anticuerpos de tamaño completo.

Los sistemas de expresión policistrónicos podrían ser cruciales para obtener una síntesis procariota eficiente y la expresión de proteínas complejas tales como anticuerpos. Desde la aprobación de la FDA en 1986 de Muromonab-CD3, sigue siendo uno de los fármacos inmunosupresores más potentes disponibles para el manejo del rechazo de trasplantes (Hooks y cols., *Pharmacotherapy*, 1991, vol. 11(1), 26-37), los anticuerpos de tamaño completo y los fragmentos de anticuerpos se han convertido en herramientas cada vez más importantes y versátiles en la medicina.

El documento WO 01/62944 describe dos nuevos sitios de integración cromosómica para la expresión de genes extraños en *Streptococcus gordonii*. Un sitio de integración es intergénico entre *orfA* y *orfB* en un operón de función desconocida. El otro sitio es intragénico dentro del gen *lacG*, que codifica fosfo-beta-galactosidasa, y es parte del operón de lactosa (*lac*).

Brückner R., 1997. *FEMS Microbiology Letters*. 151 (1):1-8 describe vectores de reemplazo génico para estafilococos que comprenden el gen *ermB* de resistencia a la eritromicina.

Dobinsky S, et al., 2002. *Plásmido*. 47(1):10-27 muestra diversas inserciones de Tn917 en el operón *icaADBC* de *Staphylococcus epidermidis* que codifica la adhesina intercelular de polisacárido.

Si bien el estado actual de la técnica revela varios ejemplos de sistemas de expresión policistrónicos en células bacterianas, estos son bastante limitados, lo que destaca la necesidad de un sistema más eficiente para introducir y expresar genes múltiples. De acuerdo con lo anterior, subsiste la necesidad de proporcionar secuencias adicionales que puedan utilizarse favorablemente para la expresión de proteínas, preferiblemente expresión de proteína heteróloga e incluso más preferiblemente expresión de proteínas heterólogas múltiples.

Además de lo anterior, el esfuerzo por producir mayores cantidades de proteína recombinante, tanto para suministro directo de proteínas por microorganismos recombinantes como para la producción de proteínas a granel y la purificación corriente abajo, representa un gran esfuerzo tecnológico. Un método existente para aumentar la producción de proteínas heterólogas es el uso de promotores fuertes seleccionados (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/084115). En este método, el análisis proteómico se realiza para identificar las proteínas endógenas más abundantes expresadas por un microorganismo. Mediante el uso de la secuencia del genoma, los respectivos genes y promotores se pueden identificar y aislar. Estos promotores fuertes (por ejemplo, el promotor del gen de *Lactococcus lactis* *hIIA*, *PhIIA*) se pueden posicionar frente a un gen heterólogo y de esta manera, se puede lograr una alta expresión. Sin embargo, un nivel de expresión que perjudica la fisiología del anfitrión puede imponer una carga de crecimiento al anfitrión y da como resultado una contra selección. Esto limita intrínsecamente la expresión más alta posible de cualquier proteína heteróloga dada en un anfitrión de expresión a un cierto nivel específico. Este es un obstáculo especialmente engorroso en el desarrollo de unidades de expresión localizadas cromosómicamente.

La cuestión de la contraselección se aborda tradicionalmente mediante el suministro de marcadores de selección. De hecho, la selección positiva o negativa, por ejemplo al proporcionar genes de resistencia a antibióticos, puede evitar la pérdida del gen heterólogo introducido. Alternativa o adicionalmente el uso de marcadores de selección, se pueden emplear sistemas de expresión génica inducible, que permiten desacoplar la propagación del anfitrión y la expresión de la proteína heteróloga, evitando de esta manera la posible contraselección durante la fase de propagación cuando no se

expresa el gen heterólogo En este contexto, el documento EP0569604 describe un sistema de expresión inducible en *Streptococcus thermophilus* en el que un gen heterólogo se coloca obligatoriamente 5' en el gen LacZ. De esta forma, la expresión del gen heterólogo no es solo inducible sino que además el mantenimiento del gen heterólogo también se selecciona al cultivar las bacterias en su hábitat natural, la leche, con lactosa como fuente de carbono, que requiere la expresión del gen LacZ.

Está claro que los sistemas para la expresión génica heteróloga descritos anteriormente tienen una aplicación limitada. Por ejemplo, el uso de marcadores de selección, tales como genes de resistencia a antibióticos, no se tolera fácilmente para aplicaciones en la producción de alimentos o en aplicaciones farmacéuticas. Además, la limitación para crecer en el hábitat natural o para utilizar la fuente de carbono del hábitat natural para el crecimiento reduce significativamente la versatilidad de cualquier sistema para la expresión génica heteróloga. También, el uso de sistemas inducibles depende intrínsecamente de las condiciones de crecimiento del anfitrión, de tal manera que son necesarios los medios de cultivo definidos, a los que se debe agregar un inductor, para asegurar la expresión de la proteína heteróloga.

De acuerdo con lo anterior, también subsiste la necesidad en la técnica de aumentar la expresión de proteínas heterólogas; y se necesitan secuencias, sistemas de clonación y estrategias que pueden alcanzar altos niveles de expresión para obtener cantidades suficientes de proteínas heterólogas expresadas en entornos industriales y/o terapéuticos, mientras que al mismo tiempo sean versátiles y ampliamente aplicables bajo una variedad de condiciones diferentes. En estos entornos, también sería particularmente útil obtener la expresión de proteínas múltiples, cada una con su propia actividad biológica y efecto terapéutico.

#### Resumen de la invención

Los aspectos y realizaciones de la presente invención abordan por lo menos algunas, por ejemplo, una o más de las necesidades discutidas anteriormente de la técnica.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las bacterias gram-positivas pueden expresar de manera eficiente genes exógenos o heterólogos a partir de unidades de expresión policistrónicas que también comprenden genes endógenos de estas bacterias. Por lo tanto, las bacterias gram-positivas pueden expresar de forma eficiente genes exógenos o heterólogos a partir de unidades de expresión policistrónicas cuando dichos genes se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente a genes endógenos de estas bacterias. Inesperadamente, los inventores han encontrado que el acoplamiento transcripcional y/o de traducción de genes endógenos y genes exógenos en unidades de expresión policistrónicas da como resultado altos niveles de expresión de los genes exógenos en bacterias gram-positivas. En particular, se encontró que los niveles de expresión de genes exógenos acoplados transcripcionalmente y/o traduccionalmente a genes endógenos bacterianos grampositivos son por lo menos comparables y ventajosamente más altos que los niveles de expresión de genes exógenos que no están acoplados transcripcional o traduccionalmente a genes endógenos de bacterias gram-positivas

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto la invención se refiere a una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica comprende un gen endógeno (por ejemplo pero sin limitación un gen endógeno) y uno o más genes exógenos, en los que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva. Preferiblemente, la unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos. Dicha unidad de expresión policistrónica por lo tanto también se puede denotar de forma consecutiva como que comprende un gen endógeno (por ejemplo pero sin limitación un gen endógeno) y uno o más genes exógenos. La unidad de expresión policistrónica se configura para efectuar la transcripción de un gen endógeno y uno o más genes exógenos en un ARNm policistrónico. Por lo tanto, la presente bacteria gram-positiva de otra forma se puede denotar como que comprende un gen endógeno al que uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente. También se proporciona una bacteria gram-positiva que comprende un gen endógeno al que uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno.

Otro aspecto proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica comprende un gen endógeno a una bacteria gram-positiva y uno o más genes exógenos a la bacteria gram-positiva, en la que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva. Preferiblemente, la unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos. También se proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica que comprende un gen endógeno a la bacteria gram-positiva al que uno o más genes exógenos a la bacteria gram-positiva se acoplan transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno.

Preferiblemente, como se pretende a lo largo de esta especificación dicho uno o más genes exógenos se puede acoplar transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno. Los inventores han encontrado de forma sorprendente que dicha configuración es benéfica con respecto a los niveles de expresión de proteína heteróloga, mantenimiento y/o

estabilidad genómica de la unidad de expresión policistrónica. Más aún, se ha encontrado que la disposición genómica corriente abajo es de menor importancia.

- 5 La transcripción del gen endógeno acoplado transcripcionalmente y uno o más genes exógenos se puede regular o controlar de forma adecuada por dicho promotor endógeno de dicha bacteria gram-positiva. La bacteria gram-positiva preferiblemente se ubica en su sitio cromosómico nativo, al que uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente. La transcripción de este gen endógeno acoplado transcripcionalmente y uno o más genes exógenos se controla o regula por el promotor nativo de dicho uno o más genes endógenos. De forma adecuada, el acoplamiento transcripcional se puede lograr al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos a dicho sitio, preferiblemente al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos 3' de dicho gen endógeno en dicho sitio.
- 10 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva que comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, preferiblemente en el que dicho uno o más genes exógenos es (son) el gen más 3' de la unidad de expresión policistrónica.
- 15 Los inventores han encontrado sorprendentemente que la integración cromosómica de un gen exógeno o heterólogo (o múltiples genes heterólogos) acoplado transcripcionalmente 3' a un gen nativo, que en sí mismo puede ser un gen policistrónico, tal como por ejemplo un operón, produce una unidad de expresión estable, en la que la selección de contador contra el (uno o más) gen exógeno está ausente o es mínima, contrariamente a las expectativas.
- 20 Los inventores han encontrado inesperadamente que las ventajas descritas en el presente documento se manifiestan cada vez más cuando la expresión de la unidad de expresión policistrónica se efectúa bajo ciertas condiciones, en particular por ciertos tipos de promotores. Los inventores han encontrado sorprendentemente que los sistemas de expresión policistrónicos como se describen en el presente documento, en los que la contraselección contra la(s) proteína(s) heteróloga(s) no se aborda mediante medidas convencionales, tales como el uso de marcadores de selección o mediante el uso de sistemas inducibles, no obstante pueden mantenerse de forma estable y expresarse en niveles elevados, de tal manera que sea ampliamente aplicable bajo una variedad de condiciones diferentes, sin necesidad de agentes de selección o inductores. Los módulos de expresión policistrónicos como se describe en este documento permiten de este modo el uso de genes endógenos y/o exógenos no seleccionables.
- 25 En este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva que comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante un promotor constitutivo.
- 30 En este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante un promotor del gen del metabolismo central.
- 35 También en este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante un promotor del gen de mantenimiento.
- 40 En este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante un promotor de genes esenciales.
- 45 También en este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica no se efectúa por un promotor de gen inducible.
- 50 En este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante un promotor del gen ribosómico.
- 55 También en este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante un promotor del gen de glucólisis.

En la bacteria gram-positiva y los ácidos nucleicos recombinantes de la presente invención, los promotores son promotores de gen endógeno seleccionados del grupo que consiste de los promotores de *eno*, *usp45*, *gapB*, *pyk*, *rpmB*, y *rplS*. La transcripción del gen endógeno y uno o más genes exógenos se controla por el promotor nativo de dicho gen endógeno.

5 En este documento se describe un ácido nucleico recombinante o una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, en el que la expresión de dicha unidad de expresión policistrónica se efectúa mediante por ejemplo un promotor del gen de mantenimiento constitutivo (endógeno), un promotor del gen del metabolismo central constitutivo (endógeno), un  
10 promotor de genes esenciales constitutivo (endógeno), un promotor del gen ribosómico constitutivo (endógeno), un promotor del gen de glucólisis constitutivo (endógeno), un promotor del gen de mantenimiento de metabolismo central (endógeno), un promotor del gen del metabolismo central esencial (endógeno), un promotor del gen de mantenimiento de metabolismo central esencial (endógeno), un promotor del gen de mantenimiento de metabolismo central constitutivo (endógeno), un promotor del gen de mantenimiento de  
15 metabolismo central esencial constitutivo (endógeno), un promotor del gen ribosómico esencial (endógeno), un promotor del gen de glucólisis esencial (endógeno), un promotor del gen ribosómico esencial constitutivo (endógeno), un promotor del gen de glucólisis esencial constitutivo (endógeno).

Preferiblemente como se pretende a lo largo de esta especificación dicho uno o más genes exógenos se puede acoplar transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno por lo cual el gen endógeno está presente en su posición  
20 nativa sobre el cromosoma bacteriano. En esta configuración, la secuencia en el extremo 5' de uno o más genes endógenos (que incluye mínimamente el promotor de gen endógeno) es idéntica a aquella de la cepa de tipo silvestre y la región posterior al extremo 3' de uno o más genes exógenos son idénticas a la secuencia de la región 3' del gen endógeno como es la cepa de tipo silvestre.

Muchas aplicaciones de la expresión de proteínas exógenas tales como, por ejemplo, para el suministro terapéutico de  
25 proteínas por microorganismos recombinantes pueden beneficiarse de la expresión de dicha proteína terapéutica en microorganismos anfitriones seleccionados específicos. Estos microorganismos se podrían seleccionar en función de su capacidad de colonización, como por ejemplo cepas seleccionadas procedentes de la microbiota humana o animal. Los microorganismos también se podrían seleccionar según su capacidad para potenciar la actividad de cualquier proteína terapéutica suministrada específica por ejemplo como consecuencia de la interacción de su pared celular, superficie  
30 celular o contenido intracelular con el sistema inmunitario del anfitrión, por ejemplo a través de la interacción con receptores tipo toll, miembros de la familia Ig, complementos, citoquinas y otros. Los microorganismos específicos se podrían seleccionar por su robustez para persistir en sitios de suministro severos específicos, tales como sitios intratumorales, piel, sitios con alto contenido biliar, sitios con pH bajo y otros. La bacteria gram-positiva como se menciona a lo largo de esta especificación puede ser preferiblemente una bacteria de ácido láctico (LAB), más preferiblemente una *Lactococcus* sp., incluso más preferiblemente *Lactococcus lactis* o una subespecie o cepa de la misma. Alternativamente, dicha LAB puede ser preferiblemente una *Enterococcus* sp., más preferiblemente *Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis* o una subespecie o cepa de la misma o *Lactobacillus*. La bacteria gram-positiva también puede ser *Bifidobacteria*.

Para evitar la transferencia lateral de genes a la microflora endógena, la expresión de una unidad de expresión incorporada cromosómicamente es muy favorable para el uso de la microflora recombinante como herramientas de  
40 administración para proteínas terapéuticas en medicina. También, las unidades de expresión localizadas cromosómicamente pueden demostrar ser heredadas de forma mucho más estable durante generaciones, de tal manera que las unidades de expresión localizadas cromosómicamente pueden ser la estructura deseable para las cepas de producción utilizadas en la producción de proteínas a granel. En el estado actual de la técnica, la inserción cromosómica se realiza mediante el uso de vectores de tipo barrera de activación (KI) que son condicionalmente no replicativos y que contienen las regiones de flanqueo del gen heterólogo que permiten la recombinación homóloga. En un método convencional (ver por ejemplo WO 2008/0841 15), el plásmido KI se construye en el anfitrión homólogo (el plásmido KI para *L. lactis* está construido en *L. lactis*). Este es especialmente el caso de la expresión heteróloga que requiere la secreción de proteínas, ya que muchas señales de secreción no son compatibles para su uso en otros  
50 anfitriones. El uso de promotores fuertes en construcciones de expresión que se pretende que se coloquen en el cromosoma bacteriano se ve obstaculizado por la expresión del gen heterólogo de los intermedios del plásmido KI. El gen heterólogo está precedido inmediatamente por un promotor fuerte, lo que hace que la expresión del plásmido KI, aunque no esté destinada y no sea necesaria, limite intrínsecamente el uso de los promotores más fuertes. En muchos casos, el plásmido KI tiene un número de copia que es una multiplicidad del número de cromosomas en el anfitrión, haciendo que al momento de la integración, la expresión sea varias veces menor. Por lo tanto, las unidades de expresión cromosómicas serán intrínsecamente más débiles de lo que sería lo más alto alcanzable. Este problema es eludido por la invención descrita aquí. En este método, los genes heterólogos se posicionarán corriente abajo y se acoplarán transcripcionalmente y/o traduccionalmente a un gen endógeno (fuertemente expresado) en el cromosoma bacteriano. Esta estrategia no requiere que el promotor endógeno (fuerte) esté presente en el plásmido KI. Por el contrario, corriente arriba del gen heterólogo, se posiciona el extremo 3' sin promotor del gen endógeno (fuertemente  
60 expresado). Este tipo de plásmido KI es silencioso y no limitará el uso de promotores fuertes.

## ES 2 676 877 T3

El acoplamiento transcripcional de uno o más genes exógenos con un gen endógeno como se describe en este documento se puede lograr por medio de una región intergénica activa (es decir, funcional, efectiva) en una bacteria gram-positiva por medio de una región intergénica endógena de una bacteria gram-positiva, en la que dicha región intergénica o regiones intergénicas se seleccionan del grupo que consiste de:

- 5 a) secuencias que comprenden o que consisten de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-13;
- b) secuencias que exhiben un emparejamiento incorrecto o una eliminación o inserción de un nucleótido vs. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8;
- c) secuencias que exhiben uno, dos o tres emparejamientos incorrectos, o una eliminación o inserción de uno, dos o tres nucleótidos vs. SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; o
- 10 d) secuencias que exhiben uno, dos, tres o cuatro emparejamientos incorrectos o una eliminación o inserción de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos vs. SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto adicional proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende una región intergénica activa en una bacteria gram-positiva, preferiblemente una región intergénica endógena de una bacteria gram-positiva, unida de forma operativa a un gen exógeno a dicha bacteria gram-positiva, en la que dicha región intergénica o regiones intergénicas se seleccionan del grupo que consiste de:

- 15 a) secuencias que comprenden o que consisten de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-13;
- b) secuencias que exhiben un emparejamiento incorrecto o una eliminación o inserción de un nucleótido vs. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8;
- 20 c) secuencias que exhiben uno, dos o tres emparejamientos incorrectos, o una eliminación o inserción de uno, dos o tres nucleótidos vs. SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; o
- d) secuencias que exhiben uno, dos, tres o cuatro emparejamientos incorrectos o una eliminación o inserción de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos vs. SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

- 25 La unión operable asegura que una transcripción de la región intergénica, presente sobre un ARNm junto con una transcripción del gen exógeno, es capaz de proporcionar un sitio de iniciación de traducción del gen exógeno, en la bacteria gram-positiva. Preferiblemente, la región intergénica se puede proporcionar con 5' del gen exógeno. El ácido nucleico puede comprender dos o más genes exógenos en la disposición policistrónica, cada gen exógeno es precedido por una región intergénica. Las regiones intergénicas puede ser las mismas o diferentes. Por ejemplo, cuando las
- 30 regiones intergénicas son diferentes, estas pueden corresponder a regiones intergénicas derivadas de diferentes genes de la misma o diferente especie, o del mismo gen de diferente especie. Estos ácidos nucleicos pueden ser útiles en la construcción de unidades de expresión policistrónicas que comprenden uno o más genes exógenos, por lo cual uno o más de otros genes se acopla transcripcionalmente o traduccionalmente con uno o más genes exógenos a través de la región intergénica. Por ejemplo, estos ácidos nucleicos pueden ser útiles en la construcción de unidades de expresión
- 35 policistrónicas como se enseña en este documento, por lo cual un gen endógeno se acopla transcripcionalmente o traduccionalmente con uno o más genes exógenos a través de la región intergénica. Preferiblemente el primer cistron de la unidad de expresión policistrónica será un gen endógeno expresado fuertemente.

- Los presentes ácidos nucleicos recombinantes pueden estar comprendidos en un replicón. Un aspecto también se refiere a un replicón o vector que comprende el ácido nucleico como se enseña en este documento. Por ejemplo, el
- 40 vector puede ser un vector de expresión procariota, preferiblemente un vector de expresión policistrónico procariota. Sin embargo, el desarrollo de dichos sistemas de expresión de plásmidos puede ser tedioso debido a que la combinación de ciertos replicones y promotores fuertes puede ser inestable. También puede ser imposible transformar microorganismos seleccionados con plásmidos recombinantes y mantener estos últimos de forma estable en el microorganismo debido a la presencia de plásmidos naturales, especialmente si no se pueden incluir marcadores de selección de antibióticos en
- 45 el plásmido de expresión, como sería el caso en una aplicación para el suministro terapéutico de proteínas. Este problema se puede eludir al posicionar los genes heterólogos corriente abajo y acoplados transcripcionalmente o traduccionalmente a un gen endógeno (fuertemente expresado) sobre el cromosoma bacteriano. Como esta estrategia no requiere un sistema de expresión llevado por el plásmido, se puede utilizar como un método general que se aplicará para la ingeniería genética de cualquier tipo de microflora seleccionada. La única información específica de cepa
- 50 requerida puede establecerse rápidamente a través de tecnología de punta. La secuenciación de alto rendimiento combinada con el análisis proteómico de las proteínas abundantemente expresadas producirá rápidamente la secuencia de nucleótidos de las regiones que codifican las proteínas abundantemente presentes. De acuerdo con lo anterior, aún más preferiblemente, el vector como se describe en este documento se puede configurar para efectuar la recombinación homóloga en la bacteria gram-positiva, tal como para generar una integración cromosómica del gen o genes exógenos.

- 55 En este documento se describe el uso del ácido nucleico recombinante o vector como se describe en este documento para expresión policistrónica de uno o más genes exógenos o para expresión policistrónica de uno o más genes

endógenos y uno o más genes exógenos en la bacteria gram-positiva. También se divulga la bacteria gram-positiva que comprende (por ejemplo, transformada con) el ácido nucleico recombinante o vector como se enseña en este documento, por lo cual la bacteria gram-positiva es capaz de expresión policistrónica de uno o más genes exógenos o de expresión policistrónica de uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos. También se describe en este documento un método para efectuar expresión policistrónica de uno o más genes exógenos o para efectuar expresión policistrónica de uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos en una bacteria gram-positiva, que comprende la etapa de introducir el ácido nucleico recombinante o vector como se enseña en este documento a dicha bacteria gram-positiva. Adicionalmente se describe en este documento un método para generar una bacteria gram-positiva capaz de expresión policistrónica de uno o más genes exógenos o capaz de expresión policistrónica de uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos, que comprende la etapa de introducir el ácido nucleico recombinante o vector como se enseña en este documento a dicha bacteria gram-positiva.

La invención permite expresar, preferiblemente expresar fuertemente (altamente), un gen exógeno único o una pluralidad de (por ejemplo, dos, tres o más) genes exógenos distintos en una bacteria gram-positiva. Dicho gen o genes exógenos puede codificar el producto o productos de expresión tales como de forma ventajosa proteína(s), polipéptido(s) y/o péptido(s). Por medio del ejemplo y sin limitación, dichas proteína(s), polipéptido(s) y/o péptido(s) pueden abarcar antígenos (por ejemplo, para inducir inmunidad o inmunotolerancia), alérgenos, polipéptidos terapéuticos no vaccínógenos (citoquinas, factores de crecimiento, factores de curación de heridas,...), anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab), proteínas de fusión, proteínas multiméricas, etc. y cualquier combinación de los mismos.

La organización policistrónica puede representar unidades de expresión como se enseña en este documento especialmente adecuada para la expresión de proteínas que comprenden dos o más cadenas de polipéptidos (por ejemplo, proteínas multiméricas, complejos de proteína). De acuerdo con lo anterior, dos o más genes exógenos según lo previsto en esta especificación preferiblemente pueden codificar distintos monómeros o subunidades de una proteína multimérica, por lo que los genes se cotranscriben en un ARNm policistrónico y los monómeros o subunidades individuales se traducen a partir de este ARNm. Esto puede permitir una coexpresión estrechamente regulada de los genes exógenos, tal como para lograr un ensamble equilibrado y óptimo de los monómeros o subunidades individuales en la proteína multimérica.

Una ilustración particularmente ventajosa de este principio es la expresión de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos. Por lo tanto, los dos o más genes exógenos como se enseña en este documento preferiblemente pueden codificar cadenas separadas de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo. Por ejemplo, un gen exógeno puede codificar la cadena ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, y otro gen exógeno puede codificar la cadena pesada ( $V_H$ ) del anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo. Preferiblemente, el fragmento funcional del anticuerpo puede ser Fab. En realizaciones específicas pero no limitantes, dicho Fab se puede unir a y/o inhibir el efecto biológico de citoquinas, receptores de citoquinas, quimioquinas o moléculas activadoras inmunitarias/inflamatorias. En una realización preferida el Fab se puede unir a y/o inhibir el efecto biológico de TNF $\alpha$ , tal como sin limitación dicho Fab puede ser cA2 anti-TNF o CDP870 anti-TNF.

Los genes exógenos que codifican las cadenas individuales del anticuerpo o del fragmento del mismo por lo tanto se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente para expresión policistrónica en la bacteria gram-positiva. Preferiblemente, el gen exógeno que codifica  $V_L$  o fragmento funcional del mismo se puede acoplar transcripcionalmente o traduccionalmente al extremo 3' del gen exógeno que codifica  $V_H$  o fragmento funcional del mismo. Esta organización de genes proporciona expresión particularmente efectiva y montaje del anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

La organización policistrónica también puede proporcionar unidades de expresión como se enseña en este documento particularmente adecuadas para la coexpresión de productos tales como proteínas que cooperan para lograr un efecto sinérgico, por ejemplo un efecto terapéutico o profiláctico sinérgico, por ejemplo cuando se administra in situ por la bacteria.

Otro aspecto proporciona una bacteria gram-positiva como se enseña en este documento, en la que uno o más genes exógenos codifican un producto o productos tales como proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) que tiene un efecto terapéutico o preventivo en un sujeto. Dicha bacteria se proporciona particularmente para uso como un medicamento, más particularmente para uso en administración o suministro de dicho producto o productos al sujeto, incluso más particularmente para uso en el tratamiento de una enfermedad que se puede beneficiar de la administración o suministro de dicho producto o productos. Por lo tanto también se proporciona una composición farmacéutica que comprende dicha bacteria gram-positiva.

También se proporciona un método para suministrar un producto o productos tales como proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) a un sujeto que comprende administrar la bacteria gram-positiva como se enseña en este documento al sujeto, en la que uno o más genes exógenos codifican dicho producto o productos. Preferiblemente dicho producto o productos puede tener un efecto terapéutico o preventivo en el sujeto.

De forma ventajosa para suministro in situ de la presente bacteria gram-positiva a sujetos, la bacteria conserva más estrechamente su carácter endógeno al no introducir o introducir menos secuencias exógenas o incluso patógenas



además de las secuencias para los productos de expresión exógenos. De este modo, el GRAS reglamentario o estado "Generalmente Reconocido Como Seguro" se mantiene tanto como sea posible, lo que facilita el proceso de obtener la aprobación clínica o la autorización del mercado para el uso de cepas artificiales en humanos o animales.

Los aspectos adicionales descritos en este documento se presentan adelante en los ítems (i) a (xxii).

- 5 (i) una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos acoplados transcripcionalmente al extremo 3' de dicho uno o más genes endógenos.
- 10 (ii) Un ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende un gen endógeno a una bacteria gram-positiva y uno o más genes exógenos a la bacteria gram-positiva transcripcionalmente acoplada al extremo 3' de dicho uno o más genes endógenos.
- 15 (iii) La bacteria gram-positiva de acuerdo con (i) o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (ii), en la que dicho uno o más genes exógenos codifican una proteína, polipéptido y/o péptido que tiene un efecto terapéutico o preventivo en un sujeto, o un antígeno para inducir inmunidad o inmunotolerancia, un polipéptido terapéuticamente activo no vacunógeno, un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo tal como Fab, una proteína de fusión o una proteína multimérica.
- 20 (iv) La bacteria gram-positiva de acuerdo con (i) o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (ii), en la que uno o más genes exógenos codifican un producto, tal como una proteína, polipéptido o péptido, cuyo producto tiene un efecto terapéutico o preventivo en un sujeto, para uso como un medicamento, preferiblemente para uso en administración o suministro de dicho producto al sujeto.
- (v) La bacteria gram-positiva de acuerdo con (i), (iii) o (iv) o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (ii) a (iv), en la que dicho uno o más genes exógenos es el gen más 3' de la unidad de expresión policistrónica.
- 25 (vi) La bacteria gram-positiva de acuerdo con cualquiera de (i), (iii), (iv) o (v) o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de (ii) a (v), en la que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva.
- (vii) La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (vi), en la que dicho promotor es un promotor de genes esenciales, un promotor constitutivo, un promotor del gen del metabolismo central, y/o un promotor del gen de mantenimiento.
- 30 (viii) La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (vi), en la que dicho promotor es un promotor del gen ribosómico.
- (ix) La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (vi), en la que dicho promotor es un promotor del gen de glucólisis.
- (x) La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (vi), en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste del promotor de *eno*, *usp45*, *gap*, *pyk*, *rpmB* y *rplS* de dicha bacteria gram-positiva.
- 35 (xi) La bacteria gram-positiva de acuerdo con uno cualquiera de (i) o (ii) a (x), en la que el gen endógeno se ubica en su sitio cromosómico nativo en la bacteria gram-positiva.
- (xii) La bacteria gram-positiva de acuerdo con (xi), en la que el gen endógeno se acopla transcripcionalmente a uno o más genes exógenos al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos a dicho sitio, preferiblemente al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos 3' del gen endógeno in dicho sitio.
- 40 (xiii) La bacteria gram-positiva de acuerdo con uno cualquiera de (i) o (iii) a (xii) o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de (ii) a (x), en la que el gen endógeno y uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente mediante región o regiones intergénicas activas en la bacteria gram-positiva, preferiblemente en la que la región o regiones intergénicas es endógena a dicha bacteria gram-positiva.
- 45 (xiv) La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con (xiii), en la que dicha región intergénica se selecciona del grupo que consiste de regiones intergénicas que preceden a *rplW*, *rplP*, *rpmD*, *rplB*, *rpsG*, *rpsE*, *rplN*, *rplM*, *rplE*, y *rplF*.
- (xv) Un ácido nucleico recombinante que comprende una región intergénica activa en una bacteria gram-positiva unida de forma operativa a un gen exógeno a dicha bacteria gram-positiva, preferiblemente en la que la región intergénica es una región intergénica endógena de una bacteria gram-positiva.
- 50 (xvi) El ácido nucleico recombinante de acuerdo con (xiv), en el que dicha región intergénica se selecciona del grupo que consiste de regiones intergénicas que preceden a *rplW*, *rplP*, *rpmD*, *rplB*, *rpsG*, *rpsE*, *rplN*, *rplM*, *rplE*, y *rplF*.

(xvii) La bacteria gram-positiva de acuerdo con uno cualquiera de (i) o (iii) a (xiv), o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con uno cualquiera de (ii) a (x) o (xiii) a (xvi), en la que un gen exógeno codifica la cadena ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, y otro gen exógeno codifica la cadena pesada ( $V_H$ ) del anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo, más preferiblemente en la que el fragmento funcional es Fab.

5 (xviii) La bacteria gram-positiva o ácido nucleico recombinante de acuerdo con (xvii), en la que el gen exógeno que codifica  $V_L$  o fragmento funcional del mismo se acopla transcripcionalmente al extremo 3' del gen exógeno que codifica  $V_H$  o fragmento funcional del mismo.

10 (xix) La bacteria gram-positiva de acuerdo con uno cualquiera de (i), (iii) a (xiv), (xvii) o (xviii), o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con uno cualquiera de (ii) a (x), o (xiii) a (xviii), en la que la bacteria gram-positiva es una bacteria de ácido láctico, preferiblemente *Lactococcus*, *Lactobacillus*, o *Enterococcus*, más preferiblemente *Lactococcus lactis* o *Enterococcus faecium*, o en la que la bacteria gram-positiva es una *Bifidobacteria*.

(xx) una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con uno cualquiera de (i), (iii) a (xiv), o (xvii) a (xix).

15 (xxi) La composición farmacéutica de acuerdo con (xx), en la que dicho uno o más genes exógenos codifican un producto, tal como una proteína, polipéptido o péptido, cuyo producto tiene un efecto terapéutico o preventivo en un sujeto.

(xxii) Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de acuerdo con uno cualquiera de (ii) a (x), o (xiii) a (xix).

20 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 figuras

La Figura 1: tinción con azul de Coomassie de proteínas celulares de un cultivo de placa final de cepa MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*. Las bandas de proteína prominentes se indican de 1 a 12.

25 Figura 2: Representación de una construcción de expresión monocistrónica de referencia (parte superior, SAGX0090) y una construcción policistrónica (bicistrónica, cistrón doble) de acuerdo con una realización de la invención (parte inferior) por lo que el gen X representa un gen endógeno. Ambas construcciones de expresión están destinadas para la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa del gen *uidA* de *E. coli*, que sirve aquí como un gen exógeno a modo de ejemplo.

30 Figura 3: Actividad relativa de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en un anfitrión de referencia (monocistrónico: *PhIIA*>>*uidA*, SAGX0090) y en un anfitrión que comprende una construcción policistrónica (bicistrónica) de acuerdo con una realización de la invención (gen o X endógeno >>*rpmD*>>*uidA*), organizado como en la figura 2. Los genes X endógenos son, en este ejemplo, *usp45*, *enoA*, *rplS*, *rpmB*, *pyk* y *gapB*. En este ejemplo, la región intergénica de *rpmD* proporciona un acoplamiento transcripcional del gen endógeno y exógeno. El gen *E. coli uidA* exógeno codifica  $\beta$ -glucuronidasa. Todas las construcciones de expresión se incorporan en el cromosoma bacteriano. La construcción monocistrónica está presente en el locus *thyA*, las construcciones bicistrónicas se incorporan en la posición nativa del gen X. Los datos muestran que todas las construcciones bicistrónicas tienen una actividad  $\beta$ -galactosidasa superior a la construcción monocistrónica *PhIIA*>>*uidA*.

35 Figura 4: Cuantificación de la secreción de proinsulina (*ins*) humana por *Lactococcus lactis* en un anfitrión de referencia (SAGX0122) y anfitriones de acuerdo con una realización de la invención (SAGX0121 y SAGX0164). (A) Descripción esquemática de los módulos de expresión de *ins*. La cepa SAGX0122 porta una construcción de expresión monocistrónica en la que el promotor *thyA* dirige la expresión de un líder de secreción - fusión proinsulina humana (SS::*ins*), incorporado en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en el locus *thyA*. Las construcciones de expresión bicistrónica en SAGX0121 y SAGX0164 consisten en un acoplamiento transcripcional de los *usp45* y *enoA* endógenos respectivamente con SS::*ins*, a través de la región intergénica de *rpmD*. Estas construcciones están ubicadas sobre el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en las posiciones nativas de los genes *usp45* y *enoA*, respectivamente. (B) Niveles de proinsulina detectados en los sobrenadantes de las diversas cepas. Los códigos de cepa (SAGX0122, SAGX0121 y SAGX0164) se indican debajo de las columnas, respectivamente, lo que indica los niveles de proinsulina humana en los sobrenadantes de estas cepas. Los datos muestran que las cepas que llevan ambas construcciones bicistrónicas tienen niveles de proinsulina en humanos superiores a la cepa que lleva la construcción de *PthyA*>>*ins* monocistrónica.

50 Figura 5: Expresión de Fab anti-TNF de cA2 en *Lactococcus lactis*. Los genes que codifican los fragmentos VLCL (L) y VHCH1 (H) se acoplaron transcripcionalmente mediante las regiones intergénicas *rpmD*, *rplB*, *rpsG*, *rpsE* y *rplN*. Se hicieron construcciones en las que L o H se posicionan como el primer gen de la construcción bicistrónica. Todas las construcciones de expresión de anti-TNF se llevaron a cabo en el plásmido y se colocaron bajo el control del promotor *PthyA*. La actividad anti-TNF se midió en los sobrenadantes de las diversas cepas. Los datos muestran que existe una mayor actividad anti-TNF en todas las construcciones en las que H es el primer gen de la construcción bicistrónica.

Figura 6: Expresión de Fab anti-TNF de CDP870 en *Lactococcus lactis*. (A) Se insertaron fusiones de cadenas ligeras y pesadas de CDP870 a secuencias de codificación del líder de secreción *usp45* (SS:: CDP870 VLCL y SS:: CDP870 VHCH1) como un segundo y tercer cistrón corriente abajo de *usp45* (sAGX0219, sAGX0220) en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis*. En sAGX0219 y sAGX0220, *rpmD* se utilizó para acoplar genes SS:: CD870 a *usp45*. Para evitar la inestabilidad genética, se acoplaron genes de cadena ligera y pesada a través de la región intergénica que precede a *rpIN*. En sAGX0219, el gen de cadena ligera precede al gen de cadena pesada, mientras que en sAGX0220, el gen de cadena pesada precede al gen de cadena ligera. (B) Cuantificación de actividad de TNF antihumano en sobrenadantes de cultivo crudo. Tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras se expresaron en gran medida mediante las construcciones de cistrón doble, lo que conduce a niveles elevados de Fab anti-TNF de CDP870 funcional. La expresión de CDP870 anti TNF aumentó sustancialmente cuando la cadena pesada se posicionó por encima de la cadena ligera.

Figura 7: Cuantificación de la secreción del factor trófico humano-1 (hTFF1) por *Lactococcus lactis* en un anfitrión de referencia (sAGX0085) y un anfitrión de acuerdo con una realización de la invención (sAGX0276). (A) Descripción esquemática de los módulos de expresión hTFF1. La cepa SAGX0085 porta una construcción de expresión monocistrónica en la que el promotor *PhIIA* dirige la expresión de un líder de secreción - fusión hTFF1 (SS:: hTFF1), incorporado en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en el locus *thyA*. La construcción de expresión bicistrónica en sAGX0276 consiste en un acoplamiento transcripcional de *gapB* con SS:: hTFF1, a través de la región intergénica de *rpmD*. Esta construcción se encuentra en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en las posiciones nativas del gen *gapB*. (B) Niveles de hTFF1 detectados en los sobrenadantes de las diversas cepas. Los códigos de cepa (sAGX0085 y sAGX0276) se indican debajo de las columnas, respectivamente, lo que indica niveles de hTFF1 humanos en los sobrenadantes de estas cepas. Los datos muestran que SAGX0276, que lleva la construcción bicistrónica produce niveles de hTFF1 superiores a SAGX0085 que preserva la construcción monocistrónica.

Figura 8: Tinción con azul de Coomassie de proteínas celulares de un cultivo de placa final de la cepa LMG 15709 de *Enterococcus faecium*. Las bandas de proteína prominentes se indican de 1 a 12.

Figura 9: Representación de construcciones policistrónicas (bicistrónica, cistrón doble) de acuerdo con una realización de la invención por la cual el gen X representa un gen endógeno. Las construcciones de expresión están destinados para la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa a partir del gen *uidA* de *E. coli*, que sirve en este documento como un gen exógeno de ejemplo. *Gap* y *eno* son genes endógenos "puño" representativos.

Figura 10: Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) relativa en un anfitrión de referencia (monocistrónico: *PhIIA*>>*uidA*, sAGX0090) y en un anfitrión que comprende una construcción policistrónica (bicistrónica) de acuerdo con una realización de la invención (gen endógeno X>>*rpmD*>> *uidA*), organizado como en la figura 9. Los genes endógenos X son, en este ejemplo, *gapB* y *eno*. En este ejemplo, la región intergénica de *rpmD* proporciona un acoplamiento transcripcional del gen endógeno y exógeno. El gen *E. coli uidA* exógeno codifica  $\beta$ -glucuronidasa. Todas las construcciones de expresión se incorporan en el cromosoma bacteriano. La construcción monocistrónica está presente en el locus *thyA*, las construcciones bicistrónicas se incorporan en la posición nativa del gen X. Los datos muestran que todas las construcciones bicistrónicas tienen una actividad  $\beta$ -galactosidasa superior a la construcción monocistrónica *PhIIA*>>*uidA*.

Figura 11: Cuantificación de la secreción de interleuquina-10 humana (hLL-10) por *Enterococcus faecium* en un anfitrión de referencia (sAGX0270) y un anfitrión de acuerdo con una realización de la invención (sAGX0279). (A) Descripción esquemática de los módulos de expresión de hLL-10. La construcción de expresión bicistrónica en sAGX0279 consiste en un acoplamiento transcripcional de la brecha endógena con SS:: hLL10, a través de la región intergénica de *rpmD*. (B) Niveles de hLL-10 detectados en los sobrenadantes de las diversas cepas.

Figura 12: Cuantificación de la secreción de interleuquina-27 humana (hLL-27) por *Enterococcus faecium* en un anfitrión de referencia (sAGX0270) y un anfitrión de acuerdo con una realización de la invención (sAGX0317). (A) Descripción esquemática de los módulos de expresión de hLL-27. La construcción de expresión bicistrónica en sAGX0317 consiste en un acoplamiento transcripcional de la brecha endógena con SS:: hLL27, a través de la región intergénica de *rpmD*. (B) Niveles de hLL-27 detectados en los sobrenadantes de las diversas cepas.

Figura 13: Expresión de Fab anti-TNF de CDP870 en *Enterococcus faecium*. (A) Se insertaron las fusiones de cadena ligera y pesada de CDP870 a las secuencias que codifican el líder de secreción de *usp45* (SS:: CDP870 VHCH1 y SS:: CDP870 VLCL) como un segundo y tercer cistrón corriente abajo del *gap* (sAGX0278). Para evitar la inestabilidad genética, se acoplaron genes de cadena ligera y pesada a través de la región intergénica que precede a *rpmD* de *Lactococcus lactis* (LL), mientras que *rpmD* de *Enterococcus faecium* (EF) se utilizó para acoplar los genes de *gap* y cadena pesada. (B) Cuantificación de actividad de TNF antihumano en sobrenadantes de cultivo crudo. Tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras se expresaron en gran medida mediante las construcciones de cistrón doble, lo que conduce a niveles elevados de Fab anti-TNF de CDP870 funcional.

Figura 14: Efecto de la bacteria *L.lactis* productora de anti-hTNF (sAGX0220) sobre la toxicidad inducida por hTNF y la producción de citoquinas inflamatorias en ratones A20<sup>IEC-KO</sup>, (a) ratones A20<sup>IEC-CO</sup> (n = 5 por grupo) se pretrataron con vehículo, sAGX0220 o MG1363 1 hora antes de la inyección con 2  $\mu$ g (panel izquierdo) y 6  $\mu$ g (panel derecho) de hTNF recombinante y se siguió la temperatura corporal a tiempo. Un grupo de ratones A20<sup>IEC-CO</sup> fue inyectado con Remicade antes de la inyección con 6  $\mu$ g de hTNF. (b) niveles MCP-1 en íleon, colon proximal y suero 5 h después de inyección

con 2 µg de hTNF. (c) niveles de KC y de IL-6 en homogenados ileales 5 h después de inyección con 2 µg de hTNF. (d) niveles de MCP-1 en íleon, colon proximal y suero 5 h después de inyección con 6 µg de hTNF. (e) niveles de KC e IL-6 en ileal homogeneizado 5 h después de inyección con 6 µg de hTNF. Las barras de error representan SEM. \*, p <0.05.

5 Figura 15: Producción de CDP870 en cepas de acuerdo con una realización de la invención. (A) La cadena pesada y ligera de CDP870 integrada en el locus *usp45*, el locus *enoA* o el locus *gapB*. (B) Análisis de transferencia Western que indica la expresión de CDP870 en diferentes cepas de acuerdo con una realización de la invención. Los análisis de (C) y (D) ELISA que indican la expresión de CDP870 en diferentes cepas de acuerdo con una realización de la invención. (E) Actividad neutralizante de TNF de diferentes cepas de acuerdo con una realización de la invención.

10 Figura 16: Supervivencia de ratones Tg1278 con colitis inducida por TNBS después del tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención (cepa SAGX0309 de *L. lactis* secretora de hTNF) en comparación con ratones tratados con una cepa de *L. lactis* de tipo silvestre y ratones tratados con Cimzia.

15 Figura 17: Evolución del peso corporal de ratones Tg1278 con colitis TNBS inducida después del tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención (cepa sAGX0309 de *L. lactis* secretora de hTNF) en comparación con ratones tratados con una cepa silvestre de *L. lactis* y ratones tratados con Cimzia. Panel superior: peso corporal absoluto (g); panel inferior: peso corporal relativo al peso corporal inicial (%).

Figura 18: Puntuación histológica de tejido de colon de ratones Tg1278 con colitis TNBS inducida después del tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención (cepa sAGX0309 de *L. lactis* secretora de hTNF) en comparación con ratones tratados con cepa de *L. Lactis* de tipo silvestre y ratones tratados con Cimzia. Los valores medios se indican arriba de las barras. La tasa de supervivencia se indica por grupo.

20 Figura 19: Secreción de citoquina proinflamatoria en ratones Tg1278 con colitis inducida por TNBS después de tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención (cepa sAGX0309 de *L. lactis* secretora de hTNF) en comparación con ratones sanos, ratones tratados con cepa de *L. lactis* tipo silvestre y ratones tratados con Cimzia. (A), (B) y (C) representan los niveles de mIL6, mKC y mMCP1 en pg/mg en el colon distal, respectivamente.

#### Descripción detallada de la invención

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

30 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 consiste esencialmente en", "consiste esencialmente" y "consiste esencialmente en".

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.

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.

45 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.

50 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.

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 divulgación, en una o más realizaciones. Adicionalmente, aunque algunas realizaciones descritas en este documento incluyen algunas, pero no otras características incluidas en otras realizaciones, se entiende que las combinaciones de características de diferentes realizaciones están dentro del alcance de la invención, y forman diferentes realizaciones, como lo entenderán aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las realizaciones reivindicadas se puede utilizar en cualquier combinación.

En la siguiente descripción detallada de la invención, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma, y en los que se muestran a modo de ilustración únicamente las realizaciones específicas en las que se puede poner en práctica la invención. Se debe entender que se pueden utilizar otras realizaciones y se pueden realizar cambios estructurales o lógicos sin apartarse del alcance de la presente 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.

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. (1980).

En este documento se describe una bacteria gram-positiva que comprende un gen endógeno al que uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente. Uno o más genes exógenos se puede acoplar transcripcionalmente o traduccionalmente corriente abajo (es decir en el extremo 3') del gen endógeno. La invención proporciona una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos, en los que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva. Preferiblemente, la unidad de expresión policistrónica de forma consecutiva comprende uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos. Un aspecto adicional proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica que comprende un gen endógeno a una bacteria gram-positiva a la que uno o más genes exógenos a la bacteria gram-positiva se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente, en la que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva. Preferiblemente, uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente corriente abajo (es decir en el extremo 3') del gen endógeno.

Preferiblemente, uno de dichos genes exógenos es el gen más 3' de la unidad de expresión policistrónica, es decir un gen exógeno es el último gen o que está más corriente abajo de la unidad de expresión policistrónica. Por ejemplo si el gen endógeno es monocistrónico, uno o más genes exógenos se ubica después de o corriente abajo (es decir en el extremo 3') de - y acoplado transcripcionalmente con - el marco de lectura abierto del gen. Del mismo modo, si el gen endógeno es policistrónico en sí mismo, tal como (parte de) un operón, uno de dichos genes exógenos se ubica después de o corriente abajo (es decir en el extremo 3') de este último (es decir más corriente abajo o más 3') gen endógeno del gen policistrónico endógeno.

Aún más preferiblemente, el gen endógeno como se menciona en este documento a lo largo de la descripción es monocistrónico. Por lo tanto el gen endógeno preferiblemente no forma parte de un operón policistrónico endógeno.

En este documento se describe una unidad de expresión policistrónica afectada por un promotor que puede ser o puede exhibir una o más de las siguientes características: promotores constitutivos, promotores del gen del metabolismo central, promotores de genes esenciales, promotores fuertes, promotores del gen de mantenimiento, promotores del gen ribosómico, promotores del gen de glucólisis. Aún más preferiblemente, el promotor es un promotor constitutivo.

Como se utiliza en este documento, el término "bacteria gram-positiva" tiene su significado común en la técnica. Por medio de más orientación, una bacteria gram-positiva se puede identificar por tinción de Gram como retención de la mancha de cristal violeta.

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

Preferiblemente, la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención es una bacteria de ácido láctico (LAB), including, pero no limitada al género Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Aerococcus,

Carnobacteria, Enterococcus, Oenococcus, SporoLactobacillus, Tetragenococcus, Vagococcus, y Weisella. Más preferiblemente, la LAB es una especie Lactococcus, tales 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 es 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. En realizaciones preferidas adicionales de la invención la actococcus lactis es Lactococcus lactis ssp. cremoris o Lactococcus lactis ssp. lactis, más preferiblemente Lactococcus lactis ssp. cremoris, y cualesquier cepas de las mismas, tal como, por ejemplo, SK11 de Lactococcus lactis ssp. cremoris, MG1363 de Lactococcus lactis ssp. cremoris, o IL1403 de Lactococcus lactis ssp. lactis. En otra realización preferida, la LAB es 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.

En otra realización preferida, la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención es Bifidobacteria.

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 entiende que también se incluyen todas las subespecies y cepas de Bifidobacterias.

Como se utiliza en este documento, el término "de forma consecutiva" en el contexto de genes endógenos y exógenos se refiere a al orden 5' a 3' de los respectivos genes en un ácido polinucleico, vector o cromosoma. Por ejemplo, una unidad de expresión policistónica de forma consecutiva que comprende uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos se refiere a una unidad en la que uno o más genes endógenos se ubican corriente arriba de uno o más genes exógenos. Por lo tanto uno o más genes exógenos se ubican después del extremo 3' de uno o más genes endógenos. Se entiende que el acoplamiento u ordenamiento consecutivo como se describe en este documento no necesariamente implica un acoplamiento directo del gen endógeno y exógeno. Las secuencias adicionales pueden estar presentes entre el gen endógeno y exógeno. Como un ejemplo, una región intergénica como se define en este documento adicionalmente puede estar presente entre (es decir corriente abajo o 3' del gen endógeno y corriente arriba o 5' del gen exógeno) los genes endógenos y exógenos consecutivos. Como se utiliza en este documento, los términos "gen endógeno", "promotor endógeno", "región intergénica endógena", "sitio de unión a ribosoma endógeno" se refieren respectivamente a un gen, promotor, región intergénica o sitio de unión a ribosoma que son nativos de una bacteria gram-positiva, o se puede encontrar en la naturaleza en una bacteria gram-positiva. Como tal, el término gen, promotor, región intergénica o sitio de unión a ribosoma endógeno abarca genes ortólogos, promotores, regiones intergénicas y sitios de unión a ribosomas entre diferentes géneros, especies, subespecies o cepas de bacterias gram-positivas. En particular, se dice que un gen, promotor, región intergénica o sitio de unión a ribosoma aislado de un género, especie, subespecie o cepa de bacterias gram-positivas es endógeno para todos los otros géneros, especies, subespecies o cepas de bacterias gram-positivas, independientemente de las posibles diferencias de secuencia de ácidos polinucleicos, siempre que dicho otro género, especie, subespecie o cepa de bacterias gram-positivas en la naturaleza también comprenda dicho gen, promotor, región intergénica o sitio de unión a ribosoma. Por lo tanto, dichas secuencias de sitios de unión al gen, promotor, región intergénica o ribosoma divergentes pero encontrados en la naturaleza se considerarían endógenas. A modo de ejemplo, y sin limitación, el gen que codifica la enolasa, *enoA*, que se aísla de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* también se considera endógeno con respecto a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Preferiblemente, sin embargo, un gen, promotor o región intergénica "endógena" de un género, especie, subespecie o cepa de bacteria gram-positiva dado como se pretende en este documento puede denotar un gen, promotor o región intergénica que se encuentra en la naturaleza en, es decir, es nativo o pertenece a, ese mismo género, especie, subespecie o cepa de bacteria gram-positiva, respectivamente. A modo de ejemplo, y sin limitación, el gen que codifica la enolasa, *enoA*, que se aísla de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se puede considerar preferiblemente "endógeno" a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, pero no a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Como se utiliza en el presente documento, el término "gen exógeno" se refiere a un gen que no es nativo de una bacteria gram-positiva, o no se puede encontrar en la naturaleza en una bacteria gram-positiva. El término gen exógeno es sinónimo del término gen heterólogo. El gen exógeno puede ser un gen de longitud completa o alternativamente puede ser un gen truncado o un fragmento de gen. Por medio de un ejemplo, un gen exógeno puede derivarse de virus, otros procariontas, tales como una bacteria gram-negativa, o alternativamente y preferiblemente se puede derivar de eucariotas, tales como plantas, animales, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos. Alternativamente, el gen exógeno puede ser total o parcialmente sintético o artificial, en el sentido de que no ocurre completamente o parcialmente en la naturaleza. Además, el gen exógeno puede ser quimérico, en el sentido de que puede estar compuesto de secuencias que se originan de diferentes especies o una combinación de secuencias de origen natural y sintéticas o artificiales. También se incluyen secuencias quiméricas compuestas de secuencias bacterianas gram-positivas y secuencias exógenas de bacterias gram-positivas, tales como, por ejemplo, las secuencias que codifican proteínas de fusión compuestas de péptidos señal de secreción bacteriana gram-positiva y proteínas exógenas.

5 Como los genes eucariotas en su mayor parte comprenden intrones al lado de los exones, los expertos apreciarán que, de acuerdo con la invención, cualquier referencia a un gen exógeno se relaciona con el marco de lectura abierto sin intrón de dicho gen, es decir, la secuencia de codificación de proteínas dicho gen. El término "marco de lectura abierto" o ORF se refiere a una sucesión de tripletes de nucleótidos codificantes que comienzan con un codón de inicio de la traducción (por ejemplo ATG o GTG) y cierre con un codón de terminación de la traducción (por ejemplo, TAA, TAG o TGA) y que codifica un único polipéptido.

10 Los genes procarióticos, en particular los genes de bacterias gram-positivas, no comprenden intrones. Por lo tanto, la secuencia de codificación o marco de lectura abierto de un gen procariótico corresponde a la sucesión de tripletes de nucleótidos codificantes que inician con un codón de iniciación de la traducción y que cierran con un codón de terminación de la traducción localizado en el genoma procariótico, en particular el cromosoma bacteriano.

La bacteria gram-positiva de la invención comprende un marco de lectura abierto endógeno o secuencia de codificación a la que uno más marcos de lectura abierto endógenos o secuencias de codificación se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente.

15 El experto entenderá eso, mientras que el término "gen" en general puede referirse a una región localizable de secuencia genómica, que corresponde a una unidad de herencia, que está asociada a regiones reguladoras transcripcionales y traduccionales, tales como la Pribnow-box, secuencia Shine-Dalgarno, operadores, terminadores, regiones transcritas y/u otras regiones de secuencia funcional, cualquier referencia al término "gen" en el contexto de secuencias exógenas como se describe en este documento preferiblemente se refiere a la secuencia de codificación o marco de lectura abierto de ese gen, a menos que se indique explícitamente de lo contrario. Cualquier referencia al término "gen" en el contexto de secuencias endógenas como se describe en este documento puede referirse a una región localizable de secuencia genómica, que corresponde a una unidad de herencia, que está asociada con regiones reguladoras, regiones transcritas y/u otras regiones de secuencia funcional, pero alternativamente también puede referirse a la secuencia de codificación o al marco de lectura abierto de ese gen.

25 Como se utiliza en este documento, el término "acoplado traduccionalmente" es sinónimo de "unido traduccionalmente" o "conectado traduccionalmente". Estos términos en esencia se relacionan con unidades o sistemas de expresión policistrónicos. Se dice que dos o más genes, marcos de lectura abiertos o secuencias codificantes están acoplados traduccionalmente cuando elemento (s) regulador (es) común (es), en particular un promotor común, efectúa la transcripción de dichos dos o más genes como un ARNm que codifica dichos dos o más genes, marcos de lectura abiertos o secuencias de codificación, que pueden traducirse posteriormente en dos o más secuencias de polipéptidos individuales. El experto apreciará que los operones bacterianos son sistemas o unidades de expresión policistrónicas que se producen de forma natural en los que dos o más genes están acoplados translacionalmente o transcripcionalmente. De acuerdo con la invención, el acoplamiento transcripcional subyace al acoplamiento traduccional.

35 La bacteria gram-positiva de la invención comprende un gen endógeno al que uno o más genes exógenos, marco de lectura abierto o secuencia de codificación se acoplan transcripcionalmente. Preferiblemente, la bacteria gram-positiva de forma consecutiva comprende un gen endógeno al que uno o más genes exógenos, marco de lectura abierto o secuencia de codificación se acoplan transcripcionalmente. Como se utiliza en este documento, el término "acoplado traduccionalmente" es sinónimo con "conectado traduccionalmente" o "unido traduccionalmente". Estos términos en general se refieren a secuencias de ácidos polinucleicos que comprenden dos o más marcos de lectura abiertos o secuencias de codificación que se transcriben comúnmente como un ARNm, y que se pueden traducir en dos o más polipéptidos individuales.

40 La invención específicamente se refiere a una bacteria gram-positiva o ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica, dicha unidad de expresión policistrónica comprende un gen endógeno y uno o más genes exógenos, marco de lectura abierto o secuencia de codificación, en la que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva.

45 Como se utiliza en este documento, el término "unidad de expresión policistrónica" o "sistema de expresión policistrónica" se refiere a una unidad en la que la expresión de dos o más genes se regula por mecanismos reguladores comunes, tales como promotores, operadores, y similares. El término unidad de expresión policistrónica como se utiliza en este documento es sinónimo con unidad de expresión multicistrónica. Ejemplos de unidades de expresión policistrónicas son sin limitación unidades de expresión bicistrónica, tricistrónica, tetracistrónica. Cualquier ARNm que comprende dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más marcos de lectura abiertos o regiones de codificación que codifican productos de expresión individual tales como proteínas, polipéptidos y/o péptidos se abarca dentro del término policistrónico.

55 La unidad o sistema de expresión policistrónica como se describe en este documento se controla transcripcionalmente por un promotor que es endógeno a una bacteria gram positiva.

Por "promotor" se entiende generalmente una región en una molécula de ácido nucleico, preferiblemente una molécula de ADN, a la que se une una polimerasa de ARN e inicia la transcripción. Un promotor preferiblemente, pero no necesariamente, se une corriente arriba, es decir, 5', de la secuencia cuya transcripción controla.

5 En este documento se describen genes traduccionalmente o transcripcionalmente acoplados uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos transcripcionalmente controlados por el promotor nativo de (uno de) dicho uno o más genes endógenos. La unidad o sistema de expresión policistrónica como se describe en este documento se puede controlar transcripcionalmente por el promotor nativo de (uno de) dicho uno o más genes endógenos comprendido en dicha expresión policistrónica sistema o unidad o la unidad o sistema de expresión policistrónica como se describe en este documento puede ser unida de forma operativa a un promotor endógeno gram-positivo.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "ligado operablemente" o "ligado operablemente" es un enlace en el que las secuencias de ADN reguladoras y la secuencia de ADN que se pretende expresar se relacionan de tal manera que permitan la expresión. Por ejemplo, se dice que un promotor se une operativamente a un gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación, si el enlace o conexión permite o efectúa la transcripción de dicho gen. En un ejemplo adicional, se dice que un gen 5' y un gen 3', cistrón, marco de lectura abierto o secuencia de codificación  
15 están unidos operativamente en una unidad de expresión policistrónica, si el enlace o conexión permite o efectúa la traducción de por lo menos el gen 3'.

Por ejemplo, se dice que las secuencias de ADN, tales como, por ejemplo, preferiblemente un promotor y un marco de lectura abierto, se unen operablemente si la naturaleza del enlace entre las secuencias no (1) resultan en la introducción de una mutación de cambio de marco, (2) interfieren con la capacidad del promotor para dirigir la transcripción del  
20 marco de lectura abierto, o (3) interfieren con la capacidad del marco de lectura abierto para ser transcrito por la secuencia de la región del promotor.

En una realización preferida a modo de ejemplo, el promotor se puede colocar corriente arriba de, es decir, 5' de, el marco de lectura abierto al que se une operablemente.

25 El experto apreciará que el promotor puede estar asociado con secuencias o regiones reguladoras nativas adicionales, por ejemplo operadores. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión puede variar de un organismo a otro, pero en general debe incluir una región promotora que, en procariotas, contiene tanto el promotor (que dirige el inicio de la transcripción de ARN) como las secuencias de ADN que, cuando se transcribe en ARN, señalarán el inicio de la síntesis de proteínas. Dichas regiones incluirán normalmente aquellas secuencias 5' no codificantes implicadas con el inicio de la transcripción y traducción, tales como Pribnow-box (cf. TATA-box), secuencia Shine-Dalgarno, y similares.  
30

En una realización adicional, el promotor es el promotor nativo del gen endógeno más 5', es decir, más corriente arriba, en la unidad de expresión policistrónica.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "constitutivo" en el contexto de un promotor (o por extensión en relación con la expresión génica del gen endógeno) se refiere a un promotor que permite la transcripción continua de su gen asociado. En particular, la transcripción del gen o genes asociados bajo el control de dicho promotor se produce independientemente de cualquier inductor u otra señal reguladora.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "gen de mantenimiento" o "promotor de mantenimiento" se refiere a un gen o promotor de un gen que se requiere para el mantenimiento de la función celular básica. Aunque algunos genes de mantenimiento se expresan a niveles relativamente constantes, otros genes de mantenimiento pueden variar dependiendo de las condiciones externas o experimentales. Los genes de mantenimiento pueden, por ejemplo, estar implicados en el metabolismo, la expresión génica (tal como la maquinaria de transcripción basal), la señalización, pero también pueden ser genes estructurales.

45 Como se utiliza en el presente documento, "gen de glucólisis" o "promotor de glucólisis" se refiere a un gen o promotor de un gen implicado en la ruta glucolítica, e incluyen los promotores de los genes que codifican enzimas glucolíticas, particularmente hexoquinasa, fosfoglucoasa isomerasa, fosfofructoquinasa, fructosa bisfosfato aldolasa, triosafosfato isomerasa, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato quinasa.

50 Como se utiliza en este documento, "gen ribosómico" o "promotor ribosómico" se refiere a un gen o promotor de un gen ribosómico, que incluye genes que codifican proteínas ribosomales así como también genes transcritos en ARN ribosómico. Preferiblemente, puede referirse a un gen o promotor de una proteína ribosómica.

Como se utiliza en el presente documento, "gen de metabolismo central" o "promotor de metabolismo central" o alternativamente "gen de metabolismo básico" o "promotor de metabolismo básico" se refiere a un gen o promotor de un gen implicado en rutas metabólicas críticas, e incluye genes implicados en la glucólisis, ruta de pentosa-fosfato y ciclo de ácido tricarbóxico (TCA).

55 Como se utiliza en este documento, el término "esencial" en el contexto de un gen (o por extensión que se relaciona con el promotor de dicho gen) se refiere a un gen cuya ausencia del producto de expresión nativo es perjudicial, tal como en



particular letal, para el anfitrión o alternativamente altera, inhibe o previene, la fisiología o función normal, tal como en particular la propagación o el crecimiento. Debe entenderse que, como se utiliza en el presente documento, el término "esencial" en el contexto de un gen o promotor de un gen se refiere constitutivamente esencial, en oposición a condicionalmente esencial. Por ejemplo, los genes del operón de lactosa, tales como el gen de la beta-galactosidasa, en varias bacterias gram-positivas, en particular bacterias de ácido láctico tales como *Lactococcus* sp. puede ser esencial cuando las bacterias se cultivan en un medio que contiene lactosa como fuente de carbono principal o única, estos genes no son esenciales cuando las bacterias se cultivan en un medio que contiene fuentes de carbono alternativas. Por lo tanto, estos genes son solo condicionalmente esenciales, pero no constitutivamente esenciales, como se pretende en este documento.

Se describen en este documento los siguientes promotores y/o genes de bacterias gram-positivas que corresponden a los siguientes promotores y/o genes de *Lactococcus*, más particularmente promotores y/o genes de la cepa MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*: 1) polimerasa de ARN dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad de 160 kD (rpoC), 2) polimerasa de ARN dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad de 140 kD (rpb2 o rpoB), 3) proteína similar a ferritina de unión a ADN (protector de daño oxidativo) (dps), 4) piruvato quinasa (pyk), 5) glutamil- y glutaminil-ARNt sintetasas (glnS o gltX), 6) enolasa (eno), 7) glutamina sintetasa (glnA) 8) regulador transcripcional tipo HTH (glnR), 9) dipeptidasa Xaa-His (argE o pepV), 10) subunidad beta de ATP sintasa tipo FOF1 (subunidad beta de ATP sintasa F1) (atpD), 11) 3-fosfoglicerato quinasa (pgk), 12) gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa/eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa (gapA o gapB), 13) acetato quinasa (ackA), 14) 3-oxoacil-(acil-vehículo-proteína) sintasa (fabB o fabF), 15) 3-oxoacil-(acil-vehículo-proteína) reductasa (fabG), 16) polimerasa de ARN dirigida a ADN, subunidad alfa/subunidad de 40 kD (rpoA), 17) aminopeptidasa Xaa-Pro (pepP), 18) bisfosfato de fructosa/tagatosa aldolasa (tbp o fbaA), 19) proteína ribosómica S4 (rpsD), 20) superóxido dismutasa (sodA), 21) proteína ribosómica S12 (rpsL) y proteína ribosómica S7 (rpsG), 22) proteína ribosómica L18 (rplR) y proteína ribosómica S5 (rpsE) y proteína ribosómica L30/L7E (rpmD), 23) S-ribosilhomocisteína liasa (luxS), 24) proteína ribosómica L19 (rplS), 25) proteína ribosómica S11 (rpsK), 26) proteína ribosómica L10 (rplJ), 27) proteína ribosómica L7/L12 (rplL), 28) proteína de unión a ADN nucleóide bacteriano/proteína de unión a ADN HU (hup o hllA), 29) proteína ribosómica 50S L28 (rpmB), 30) componente IIB específico a celobiosa del sistema fosfotransferasa (lace o ptcB), 31) subunidad alfa de ATP sintasa tipo FOF1 (atpA), 32) sistema de transporte de azúcar tipo ABC (componente ATPasa) (malK o msmK), 33) subunidad alfa del componente E1 del complejo de acetoina deshidrogenasa (acoA o pdhA), 34) proteína de división celular (difIVA o ftsA), 35) UDP-galactopiranos mutasa (glf), 36) glutamil aminopeptidasa (frvX o pepA), 37) proteína relacionada con deshidrogenasa anticipada (mviM o llmg\_0272), 38) proteína ribosómica S2 (rpsB), 39) factor de iniciación de traducción 3 (IF-3) (infC), 40) proteína ribosómica L4 (rplD) y proteína ribosómica L23 (rplW) y proteína ribosómica L2 (rplB), 41) dominio EMAP (yjdD), 42) factor de alargamiento de transcripción (greA), 43) subunidad de proteasa de proteasa Clp dependiente de ATP (clpP), 44) proteína ribosómica L15 (rplO), 45) proteína ribosómica L11 (rplK), 46) proteína ribosómica S8 (rpsH), 47) proteína ribosómica L21 (rplU), 48) proteína ribosómica S13 (rpsM), 49) proteína ribosómica S19 (rpsS) y proteína ribosómica L22 (rplU o rplV) y proteína ribosómica L16 (rplP) y proteína ribosómica L14 (rplN), 50) proteína ribosómica S10 (rpsJ), 51) co-chaperonina GroES (Hsp10) (cpn10), 52) proteína ribosómica L24 (rplX), 53) proteína hipotética LACR\_0137 (duf965), y 54) proteína de 45 kDa secretada (usp45). Preferiblemente, el promotor endógeno y/o gen endógeno se selecciona del grupo que comprende o que consiste de enoA, usp45, gapB, pyk, rpmB, y rplS. Estos promotores y sus secuencias se divulgan por ejemplo en el documento WO 2008/08411 incorporado mediante referencia en este documento, por ejemplo, en la Tabla 1 y Figura 1A-H de la misma. En una realización, la invención se refiere a una bacteria gram positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento, en la que el gen endógeno y uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, seleccionado del grupo que consiste del promotor de eno, usp45, gapB, pyk, rpmB y rplS de dicha bacteria gram-positiva. En una realización adicional, el gen endógeno se ubica en su sitio cromosómico nativo en la bacteria gram-positiva.

En una realización preferida, uno de dichos genes exógenos, se acopla transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención proporciona una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, en la que dicha unidad de expresión policistrónica comprende un gen endógeno 5' y uno o más genes exógenos 3'. Preferiblemente, el gen más 5' de la unidad de expresión policistrónica es un gen endógeno. Por medio del ejemplo, y sin limitación, la unidad de expresión policistrónica puede comprender o consistir esencialmente desde el extremo 5' hasta el extremo 3' de un gen endógeno seguido por uno o más genes endógenos, seguido por uno o más genes exógenos. Alternativamente, y sin limitación, la unidad de expresión policistrónica puede comprender o consistir esencialmente desde el extremo 5' hasta el extremo 3' de un gen endógeno seguido por uno o más genes exógenos. Alternativamente, la unidad de expresión policistrónica puede comprender o consistir esencialmente desde el extremo 5' hasta el extremo 3' de un gen endógeno seguido por uno o más genes exógenos, seguido por uno o más genes endógenos.

La unidad de expresión policistrónica acoplada transcripcionalmente, como se describe en este documento puede estar comprendida de un replicón que permite mantenimiento y/o propagación y expresión de los genes endógenos y exógenos en las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención como se describe en este documento.

En una realización, el gen endógeno acoplado transcripcionalmente y uno o más genes exógenos, que incluyen el promotor endógeno que se describe en otra parte en esta especificación, y la unidad de expresión policistrónica, como se describe en este documento puede estar comprendida en un vector, preferiblemente un vector de expresión que

permita la expresión en la bacteria gram-positiva. De acuerdo con lo anterior, la invención también se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico recombinante como se describe en este documento.

Como se utiliza en el presente documento, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, normalmente ADN, a la que los fragmentos de ácido nucleico se pueden insertar y clonar, es decir, propagar. Por lo tanto, un vector normalmente contendrá uno o más sitios de restricción únicos, y puede ser capaz de replicación autónoma en un anfitrión u organismo de vehículo definido de forma que la secuencia clonada sea reproducible. Los vectores pueden incluir, sin limitación, plásmidos, fagémidos, bacteriófagos, vectores derivados de bacteriófagos, PAC, BAC, ácidos nucleicos lineales, por ejemplo, ADN lineal, etc., según sea apropiado (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989; Ausubel 1992))

Los factores de importancia en la selección de un vector particular, por ejemplo, un plásmido, incluyen entre otros: la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse de aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un anfitrión particular; y si es deseable poder "transferir" el vector entre células anfitrionas de diferentes especies. Los vectores procariontes preferidos incluyen plásmidos tales como aquellos que se pueden replicar en *E. coli* (tales como, por ejemplo, pBR322, ColE1, pSC101, pUC19, etc.). Dichos plásmidos se describen en, por ejemplo, Sambrook et al., 1989; Ausubel 1992. Los vectores particularmente preferidos pueden ser aquellos capaces de replicarse en *E. coli* (u otras bacterias Gram negativas) así como en otra célula anfitrión de interés, tal como en una bacteria Gram positiva, una bacteria de ácido láctico, preferiblemente *Lactococcus*, más preferiblemente *Lactococcus lactis*. (véase, por ejemplo, Kok et al. Appl. Environ. Microbiol., 1984, vol. 48(4), 726-31). Otros vectores preferidos pueden ser aquellos capaces de replicarse y/o transferirse entre una o más bacterias Gram positivas pero no en bacterias Gram negativas. En una realización preferida, el vector es pT1NX como se describe por Steidler et al. Appl. Environ. Microbiol., 1995, vol. 61(4), 1627-1629, que se incorpora específicamente por referencia en este documento.

En otra realización, el gen endógeno acoplado transcripcionalmente y uno o más genes exógenos, o la unidad o sistema de expresión policistrónica, como se describe en el presente documento, están integrados en el genoma o cromosoma bacteriano gram-positivo. Los métodos para obtener bacterias gram-positivas recombinantes y la recombinación aleatoria así como homóloga son bien conocidos en la técnica, así como también vectores para efectuar la recombinación. Por medio de orientación adicional, dichos métodos y vectores se divulgan, por ejemplo, en Steidler et al. (2003, Nature Biotechnology, 21: 785-789), Law et al. (1995, J Bacteriol, 177(24): 7011-7018), Leenhouts et al. (1998, Methods in Cell Science, 20: 35-50) y el documento WO 2004/046346. Preferiblemente, la unidad de expresión policistrónica como se describe en este documento se genera o se introduce por integración dirigida al sitio de las secuencias requeridas en el cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga.

En una realización, un vector de recombinación comprende un promotor endógeno que se describe en otra parte en esta especificación, y opcionalmente secuencias reguladoras adicionales, así como también una unidad de expresión policistrónica como se describe en este documento. Preferiblemente, el promotor endógeno y la unidad de expresión policistrónica se unen operablemente. La recombinación homóloga se puede efectuar en un locus predeterminado. Dicho sistema es altamente modular y permite la selección individual y combinación de promotor, las secuencias reguladoras, gen endógeno, y gen exógeno, así como también la elección del sitio de inserción.

En otra realización, la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención comprende un promotor endógeno que se describe en otra parte en esta especificación en su locus nativo, es decir, en su contexto genómico nativo sobre el cromosoma bacteriano, al que una unidad de expresión policistrónica que comprende un gen endógeno, y uno o más genes exógenos, se une operablemente. La unión operable se puede efectuar mediante recombinación homóloga entre el locus que comprende el promotor y un vector de recombinación que comprende la unidad de expresión policistrónica, flanqueada por secuencias configuradas para efectuar dicha recombinación homóloga. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva como se describe en este documento, en la que el gen endógeno se acopla transcripcionalmente a uno o más genes exógenos al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos a dicho sitio, preferiblemente al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos 3' del gen endógeno en dicho sitio.

El diseño del vector se puede elegir de tal manera que simplemente el marco de lectura abierto o las secuencias de codificación de los genes endógenos y/o exógenos se integren en el locus cromosómico deseado. En este caso, las secuencias reguladoras junto al promotor per se que afectan la transcripción y/o traducción, por ejemplo los operadores, el sitio de iniciación de la transcripción, la secuencia de shined-argano, la secuencia de terminación, etc. se proporcionan por el locus genómico nativo del promotor. Alternativamente, dichas secuencias se pueden proporcionar en el vector de recombinación que comprende la unidad de expresión policistrónica. En el último caso, dependiendo de las necesidades, las secuencias reguladoras nativas asociadas con el promotor endógeno se pueden eliminar durante la recombinación homóloga. Los sistemas descritos en este documento son modulares con respecto a la selección individual de gen endógeno, gen exógeno y posiblemente las secuencias reguladoras, pero predeterminan el sitio de inserción en el locus endógeno del promotor seleccionado.

En una realización adicional, la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención comprende un promotor endógeno así como también un gen endógeno, tanto que se describe en otra parte en esta especificación, en su (sus) locus nativo, es decir en su (sus) contexto genómico nativo sobre el cromosoma bacteriano, al que uno o más genes exógenos, se

unen operablemente, tal como para efectuar la expresión policistrónica de uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos. En este sistema, el promotor endógeno y uno o más genes endógenos, así como también las secuencias reguladoras que efectúan la transcripción y traducción de dicho uno o más genes endógenos están presentes en su locus nativo. Dicho sistema conserva de forma máxima el carácter nativo de la bacteria gram-positiva.

5 Una unidad de expresión policistrónica comprende por lo menos dos genes, marcos de lectura abiertos o secuencias de codificación. Con el fin de iniciar la traducción de todos los genes, cada uno de estos genes generalmente se asocia con secuencias que efectúan la unión a ribosomas, es decir, sitios de unión a ribosomas. En procariontes, sitios de unión a ribosomas se denominan secuencias de Shine-Dalgarno (SD), que tienen la secuencia de consenso general 5'-AGGAGG-3'. La secuencia SD en promedio se ubica aproximadamente 8 pares base corriente arriba (es decir 5' de) el  
10 codón de inicio de traducción o codón de inicio. Dependiendo de la distancia (en cantidad de nucleótidos) entre el codón de terminación del gen 5' y el codón de inicio del gen 3', las secuencias SD se pueden posicionar normalmente 1) en una región intergénica entre ambos genes, si la distancia tiene por lo menos el tamaño de la secuencia SD; 2) en una distancia más pequeña entre 5' y gen 3'; o 3) 5' al codón de terminación del gen 5, si por ejemplo el codón de  
15 terminación del gen 5' y el codón de inicio del gen 3' son muy cercanos o se superponen.

La invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento, que adicionalmente comprende una o más secuencias de ácidos polinucleicos que comprenden un sitio de unión a ribosoma configurado para efectuar la traducción de uno o más genes exógenos. En otra realización, la  
20 invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento, que adicionalmente comprende uno o más sitios de unión a ribosoma configurados para efectuar traducción de uno o más genes exógenos. En una realización adicional, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento en el que dicho uno o más genes endógenos y dicho uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente por medio de un sitio de unión a ribosoma. En aún otra realización, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante,  
25 que comprende una unidad de expresión policistrónica como se describe en este documento, en la que cualquier gen 5' se acopla a un gen 3' mediante una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende o que consiste (esencialmente) de un sitio de unión a ribosoma. En una realización preferida, dicho sitio de unión a ribosoma es endógeno a una bacteria gram-positiva. En una realización preferida adicional, dicho sitio de unión a ribosoma está comprendido en una región intergénica, preferiblemente una región intergénica de operón.

30 La invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento, que adicionalmente comprende una o más secuencias de ácidos polinucleicos que comprenden una región intergénica configurada para efectuar la traducción de uno o más genes exógenos. En una realización adicional, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento, que adicionalmente comprende una o región intergénica configurada para efectuar la traducción de uno o  
35 más genes exógenos. En una realización adicional, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento en la que dicho uno o más genes endógenos y dicho uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente o traduccionalmente por medio de una región intergénica. En aún otra realización, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante, que comprende una unidad de expresión policistrónica como se describe en este documento, en la que cualquier gen 5' se acopla a un gen 3' mediante una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende o que consiste de una región intergénica. En una realización preferida, dicha región intergénica es endógena a una bacteria gram-positiva. En una realización preferida adicional, dicha región intergénica es una región intergénica de operón.

Como se utiliza en este documento, el término "región intergénica" es sinónimo con "ligador intergénico" o "separador intergénico". Una región intergénica se define como una secuencia de ácidos polinucleicos entre genes adyacentes (es decir, ubicados sobre la misma secuencia de ácidos polinucleicos), marcos de lectura abiertos, cistrones o secuencias de codificación. Por extensión, la región intergénica puede incluir el codón de terminación del gen 5' y/o el codón de inicio del gen 3' que se une mediante dicha región intergénica. Como se define en este documento, el término región intergénica específicamente se refiere a regiones intergénicas entre genes adyacentes en una unidad de expresión policistrónica. Por ejemplo, una región intergénica como se define en este documento se puede encontrar entre genes adyacentes en un operón. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la región intergénica como se define en este  
45 documento es una región intergénica de operón.

En una realización, la región intergénica, ligador o separador se selecciona del grupo de regiones intergénicas que comprenden o que consisten de regiones intergénicas que preceden, es decir 5' a, más particularmente inmediatamente 5' a, rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE o rplN de una bacteria gram-positiva. En una realización, dicha bacteria gram  
55 positiva es una bacteria de ácido láctico, preferiblemente una especie de Lactococcus, más preferiblemente Lactococcus lactis, y cualquier subespecie o cepa de la misma. En una realización, dicha región intergénica abarca el codón de inicio de rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE o rplN y/o el codón de terminación del gen que precede, es decir 5'. En una realización preferida, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento, en el que el gen endógeno y uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente mediante región o regiones intergénicas activas en la bacteria gram-positiva, preferiblemente en las que la región o regiones intergénicas es endógena a dicha bacteria gram-positiva, más preferiblemente en a que la  
60

región intergénica endógena se selecciona del grupo que consiste de regiones intergénicas que preceden a rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE, rplN, rplM, rplE, y rplF.

- 5 El experto apreciará que si la región intergénica abarca un codón de terminación 5' y/o un codón de inicio 3', estos codones respectivos preferiblemente no están presentes en los genes que están unidos por dichas regiones intergénicas, para evitar el doble codón de inicio y/o terminación, lo que puede afectar la iniciación y/o finalización correcta de la traducción. Los métodos para identificar regiones intergénicas son conocidos en la técnica. Por medio de orientación adicional, las regiones intergénicas, por ejemplo se pueden identificar, basándose en la predicción de operones, y promotores asociados y marcos de lectura abiertos, para lo cual se conoce y se encuentra disponible en la técnica un amplio software.
- 10 En una realización adicional, dicha secuencia de regiones intergénicas se selecciona del grupo que comprende, que consiste esencialmente de o que consiste de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 7:

SEQ ID NO: 1	TAATG
SEQ ID NO: 2	TAATCCATG
SEQ ID NO: 3	TAAGGAGAAAAAATG
SEQ ID NO: 4	TAATAGAG GAG GAAAATCGTG
SEQ ID NO: 5	TAAGAAGGGAGATAAGTAAGAATG
SEQ ID NO: 6	TAAGGAAAGGGTAATTAACATG
SEQ ID NO: 7	TAAGCAAACTAGGAGGAATATAGCATG

- 15 En una realización adicional, dicha secuencia de regiones intergénicas se selecciona del grupo que comprende, que consiste esencialmente de o que consiste de secuencias que exhiben un emparejamiento incorrecto o una eliminación o inserción de un nucleótido vs. SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, las secuencias que exhiben uno, dos o tres emparejamientos incorrectos, o una eliminación o inserción de uno, dos o tres nucleótidos vs. SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, y secuencias que exhiben uno, dos, tres o cuatro emparejamientos incorrectos o una eliminación o inserción de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos vs. SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.

- 20 Las SEQ ID NOs: 1 a 7 todas comprenden un y un codón de inicio 3'. Las SEQ ID NOs: 1 a 7 que corresponden a las regiones intergénicas que preceden, respectivamente, rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE y rplN de la cepa MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. cremoris (número de acceso Genbank AM406671.1). Estas secuencias son entre otras idénticas a las secuencias correspondientes de la cepa CV56 de *Lactococcus lactis* ssp. lactis (número de acceso Genbank CP002365.1), NZ9000 de *Lactococcus lactis* ssp. cremoris cepa (número de acceso Genbank CP002094.1), cepa KF147 de *Lactococcus lactis* ssp. lactis (número de acceso Genbank CP001834.1), cepa IL1403 de *Lactococcus lactis* ssp. lactis (número de acceso Genbank AE005176.1), y cepa SK11 de *Lactococcus lactis* ssp. cremoris (número de acceso Genbank CP000425.1).

- 30 En otra realización, la región intergénica, ligador o separador se selecciona del grupo de regiones intergénicas que comprenden o que consisten de regiones intergénicas que preceden, es decir 5' a, más particularmente inmediatamente 5' a, rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, o rplF de una bacteria gram-positiva. En una realización, dicha bacteria gram positiva es una bacteria de ácido láctico, preferiblemente una especie de *Enterococcus*, más preferiblemente *Enterococcus faecium*, y cualquier subespecie o cepa de la misma. En una realización, dicha región intergénica abarca el codón de inicio de rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, o rplF y/o el codón de terminación del gen precedente, es decir 5'. El experto apreciará que si la región intergénica abarca un codón de terminación 5' y/o un codón de inicio 3', estos codones respectivos preferiblemente no están presentes en los genes que se unen mediante dichas regiones intergénicas, con el fin de evitar doble codones de inicio y/o terminación, que pueden afectar la iniciación y/o terminación de traducción correcta. Los métodos para identificar regiones intergénicas se conocen en la técnica. Por medio de más orientación, las regiones intergénicas por ejemplo se pueden identificar con base en la predicción de operones, y promotores asociados y marcos de lectura abiertos, para los que se conoce un software amplio y disponible en la técnica.

- 40 En una realización adicional, dicha secuencia de regiones intergénicas se selecciona del grupo que comprende, que consiste esencialmente de o que consiste de cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 a 13:

SEQ ID NO: 8                      TAATC

## ES 2 676 877 T3

SEQ ID NO: 9                    TAAGGAGGACAACAATA  
 SEQ ID NO: 10                TAATAGGAGGGAATTTCA  
 SEQ ID NO: 11                TTAGAAGAAGGAGGAATACCATTC  
 SEQ ID NO: 12                TAAAAGTTTAAGGAAGGAGGGTCTTACTGA  
 SEQ ID NO: 13                TAATCAAGTAGAATCTACAAGGAGGTGTCTTTAA

- 5 En una realización adicional, dicha secuencia de regiones intergénicas se selecciona del grupo que comprende, que consiste esencialmente de o que consiste de secuencias que exhiben un emparejamiento incorrecto o una eliminación o inserción de un nucleótido vs. SEQ ID NO: 8, las secuencias que exhiben uno, dos o tres emparejamientos incorrectos, o una eliminación o inserción de uno, dos o tres nucleótidos vs. SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 y secuencias que exhiben uno, dos, tres o cuatro emparejamientos incorrectos o una eliminación o inserción de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos vs. SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. SEQ ID NOs: 8 a 13 corresponden a las regiones intergénicas que preceden, respectivamente, rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, y rplF de la cepa LMG15709 *Enterococcus faecium*
- 10 En una realización, las regiones intergénicas como se describe en este documento, que excluyen cualquier codón de terminación precedente y que excluyen cualquier codón de inicio posterior pueden comprender o consistir de más de 1 nucleótido, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos, preferiblemente más de 5 nucleótidos, incluso más preferiblemente 10 o más nucleótidos. En otra realización, la región intergénica puede comprender 1 a 50 nucleótidos, tales como 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, o 1 a 10, preferiblemente 5 a 50, 5 a 40, 5 a 30, 5 a 25, 5 a 20, 5 a 15, o 5 a 10 nucleótidos, incluso más preferiblemente 10 a 50, 10 a 40, 10 a 30, 10 a 25, 10 a 20, o 10 a 15 nucleótidos.

20 Realizaciones particularmente preferidas de bacterias gram-positivas que comprenden una unidad de expresión policistrónica como se describe en este documento se representan en las Tablas 1 y 2, e las que dicha bacteria gram-positiva comprende un promotor endógeno, 3' cuyo gen endógeno se acopla a la región intergénica como se representa en las Tablas 1 y 2, 3' de la cual uno o más genes exógenos, marco de lectura abierto o secuencia de codificación se acoplan a la región intergénica. En una realización preferida, cada gen representado en las Tablas 1 y 2 se controla transcripcionalmente su promotor nativo, y opcionalmente secuencias reguladoras. En otra realización preferida, dicha unidad de expresión policistrónica se integra en el cromosoma bacteriano. En una realización preferida adicional, dicho promotor endógeno y/o gen endógeno están presentes en su locus nativo sobre el genoma o cromosoma bacteriano.

25 Preferiblemente, los codones de inicio y terminación, si están presentes, reemplazan los codones de inicio y terminación de dicho gen exógeno y dicho gen endógeno, respectivamente.

Tabla 1: La unidad de expresión policistrónica de ejemplo puede comprender o consistir esencialmente de promotor endógeno >> gen endógeno >> región intergénica >> gen exógeno, en la que el gen endógeno y región intergénica se seleccionan de las combinaciones adelante.

Gen endógeno	Región intergénica
eno	rplW
eno	rplP
eno	rpmD
eno	rplB
eno	rpsG
eno	rpsE
eno	rplN
eno	rplM
eno	rplE
eno	rplF
usp45	rplW

ES 2 676 877 T3

Gen endógeno	Región intergénica
usp45	rplP
usp45	rpmD
usp45	rplB
usp45	rpsG
usp45	rpsE
usp45	rplN
usp45	rplM
usp45	rplE
usp45	rplF
gap	rplW
gap	rplP
gap	rpmD
gap	rplB
gap	rpsG
gap	rpsE
gap	rplN
gap	rplM
gap	rplE
gap	rplF
pyk	rplW
pyk	rplP
pyk	rpmD
pyk	rplB
pyk	rpsG
pyk	rpsE
pyk	rplN
pyk	rplM
pyk	rplE
pyk	rplF
rpmB	rplW
rpmB	rplP
rpmB	rpmD
rpmB	rplB
rpmB	rpsG

Gen endógeno	Región intergénica
rpmB	rpsE
rpmB	rplN
rpmB	rplM
rpmB	rplE
rpmB	rplF
rplS	rplW
rplS	rplP
rplS	rpmD
rplS	rplB
rplS	rpsG
rplS	rpsE
rplS	rplN
rplS	rplM
rplS	rplE
rplS	rplF

5 Preferiblemente, las regiones intergénicas rplW, rplB, rpsG, y rplN se originan a partir de una especie de *Lactococcus*, subespecie o cepa, preferiblemente *Lactococcus lactis*. Preferiblemente, regiones intergénicas rplP, rplM, y rplE que se originan de una especie *Enterococcus*, subespecie o cepa, preferiblemente *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*. Preferiblemente, regiones intergénicas rplP, rpmD, y rpsE que se originan de una especie *Enterococcus*, subespecie o cepa, preferiblemente *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

10 Por ejemplo pero sin limitación, cuando la unidad de expresión policistrónica comprende dos genes exógenos, la estructura representada como promotor endógeno >> gen endógeno >> región intergénica >> gen exógeno >> región intergénica >> gen exógeno puede ser como sigue: usp45 >> usp45 >> rpmD >> gen exógeno 1 >> rplN >> gen exógeno 2; enoA >> enoA >> rpmD >> gen exógeno 1 >> rplN >> gen exógeno 2; gapB >> gapB >> rpmD >> gen exógeno 1 >> rplN >> gen exógeno 2. Por ejemplo, dicha disposición puede ser particularmente adecuada para la expresión de cadenas pesada y ligera de anticuerpos (preferiblemente en ese orden), tal como anticuerpos anti-TNFa como se enseña en este documento.

15 Tabla 2: La unidad de expresión policistrónica de ejemplo puede comprender o consistir esencialmente de promotor endógeno >> gen endógeno >> región intergénica >> gen exógeno, en la que el gen endógeno y región intergénica se seleccionan de las combinaciones adelante.

Gen endógeno	Región intergénica
eno	SEQ ID NO: 1
eno	SEQ ID NO: 2
eno	SEQ ID NO: 3
eno	SEQ ID NO: 4
eno	SEQ ID NO: 5
eno	SEQ ID NO: 6
eno	SEQ ID NO: 7

ES 2 676 877 T3

Gen endógeno	Región intergénica
eno	SEQ ID NO: 8
eno	SEQ ID NO: 9
eno	SEQ ID NO: 10
eno	SEQ ID NO: 11
eno	SEQ ID NO: 12
eno	SEQ ID NO: 13
usp45	SEQ ID NO: 1
usp45	SEQ ID NO: 2
usp45	SEQ ID NO: 3
usp45	SEQ ID NO: 4
usp45	SEQ ID NO: 5
usp45	SEQ ID NO: 6
usp45	SEQ ID NO: 7
usp45	SEQ ID NO: 8
usp45	SEQ ID NO: 9
usp45	SEQ ID NO: 10
usp45	SEQ ID NO: 11
usp45	SEQ ID NO: 12
usp45	SEQ ID NO: 13
gap	SEQ ID NO: 1
gap	SEQ ID NO: 2
gap	SEQ ID NO: 3
gap	SEQ ID NO: 4
gap	SEQ ID NO: 5
gap	SEQ ID NO: 6
gap	SEQ ID NO: 7
gap	SEQ ID NO: 8
gap	SEQ ID NO: 9
gap	SEQ ID NO: 10
gap	SEQ ID NO: 11
gap	SEQ ID NO: 12
gap	SEQ ID NO: 13
pyk	SEQ ID NO: 1
pyk	SEQ ID NO: 2



ES 2 676 877 T3

Gen endógeno	Región intergénica
pyk	SEQ ID NO: 3
pyk	SEQ ID NO: 4
pyk	SEQ ID NO: 5
pyk	SEQ ID NO: 6
pyk	SEQ ID NO: 7
pyk	SEQ ID NO: 8
pyk	SEQ ID NO: 9
pyk	SEQ ID NO: 10
pyk	SEQ ID NO: 11
pyk	SEQ ID NO: 12
pyk	SEQ ID NO: 13
rpmB	SEQ ID NO: 1
rpmB	SEQ ID NO: 2
rpmB	SEQ ID NO: 3
rpmB	SEQ ID NO: 4
rpmB	SEQ ID NO: 5
rpmB	SEQ ID NO: 6
rpmB	SEQ ID NO: 7
rpmB	SEQ ID NO: 8
rpmB	SEQ ID NO: 9
rpmB	SEQ ID NO: 10
rpmB	SEQ ID NO: 11
rpmB	SEQ ID NO: 12
rpmB	SEQ ID NO: 13
rplS	SEQ ID NO: 1
rplS	SEQ ID NO: 2
rplS	SEQ ID NO: 3
rplS	SEQ ID NO: 4
rplS	SEQ ID NO: 5
rplS	SEQ ID NO: 6
rplS	SEQ ID NO: 7
rplS	SEQ ID NO: 8
rplS	SEQ ID NO: 9
rplS	SEQ ID NO: 10

Gen endógeno	Región intergénica
rplS	SEQ ID NO: 11
rplS	SEQ ID NO: 12
rplS	SEQ ID NO: 13

Preferiblemente, la bacteria gram-positiva que tiene una unidad de expresión policistrónica que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 7 es una especie de *Lactococcus*, subespecie o cepa, preferiblemente *Lactococcus lactis*. Preferiblemente, la bacteria gram-positiva que tiene una unidad de expresión policistrónica que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 a 13 es una especie de *Enterococcus*, subespecie o cepa, preferiblemente *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

El experto apreciará que los genes exógenos, marcos de lectura abiertos o secuencias de codificación se pueden acoplar a secuencias adicionales, cuyas secuencias adicionales efectúan un propósito particular. Por ejemplo, con el fin de aumentar la secreción del gen exógeno, el gen se puede acoplar a un ácido nucleico secuencia que codifica un péptido de señal de secreción. En una realización particularmente preferida, el gen exógeno, marco de lectura abierto o secuencia de codificación de acuerdo con la invención acopla a su extremo 5' a la secuencia de ácidos polinucleicos que codifica la señal de secreción de Usp45, preferiblemente que se origina de una especie de *Lactococcus*, más preferiblemente *Lactococcus lactis* y subespecies y cepas de la misma.

Normalmente, una secuencia de señales de secreción representa un segmento de aproximadamente 16 a aproximadamente 35 aminoácidos, que contiene usualmente aminoácidos hidrófobos que se vuelven a incorporar en la membrana lipídica bicapa, y de ese modo permiten la secreción de una secuencia de proteínas o péptidos acompañante de la célula anfitriona, y que usualmente se divide a partir de esa proteína o péptido. Preferiblemente, la secuencia de señales de secreción se puede activar de esa manera en una célula anfitriona destinada para uso con el ácido nucleico que comprende dicha secuencia de señales.

Las secuencias de señales de secreción activadas en células anfitrionas adecuadas se conocen en la técnica; secuencias de señales de *Lactococcus* de ejemplo incluyen aquellas de usp45 (véase, US 5,559,007) y otras, véase, por ejemplo, Perez-Martinez et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1992, vol. 234, 401-11; Sibakov et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57(2), 341-8. Preferiblemente, la secuencia de señales se ubica entre la secuencia de promotores y el ORF, es decir la secuencia de señales se ubica 3' desde la secuencia de promotores y precede el ORF del polipéptido de interés. En una realización preferida, la secuencia de señales codifica la secuencia de aminoácidos MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSGVYA (usp45). Alternativamente, se puede utilizar una secuencia de señales usp45 mutada (usp45N) que resulta en producción y secreción adicional del polipéptido de interés. En particular, el mutante comprende una asparagina (N) en la posición 4 en lugar de una lisina (K), o una mutación K4N. En una realización preferida, la secuencia de señales codifica la secuencia de aminoácidos MKKNIISAILMSTVILSAAA PLSGVYADTN.

La invención también se refiere a una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende una unidad de expresión policistrónica de acuerdo con la invención como se describe en este documento. En particular, en un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende una unidad de expresión policistrónica de acuerdo con la invención como se describe en este documento, en la que dicha unidad policistrónica comprende un gen endógeno a una bacteria gram-positiva y uno o más genes exógenos a una bacteria gram-positiva, en la que uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente en una forma como se describe en este documento. Preferiblemente uno o más genes endógenos se acopla al extremo 5' de uno o más genes exógenos. Preferiblemente, uno o más genes endógenos y uno o más genes exógenos se conectan mediante una región intergénica como se describe en este documento, preferiblemente una región intergénica que precede rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE, y rplN como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 7 o una región intergénica que precede rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, o rplF como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 a 13 o secuencias relacionadas como se describió anteriormente. En una realización, la secuencia de ácidos polinucleicos comprende adicionalmente un promotor, preferiblemente un promotor endógeno de una bacteria gram-positiva. En otra realización, la secuencia de ácidos polinucleicos comprende adicionalmente secuencias reguladoras, por ejemplo operador, terminador y similares. En una realización preferida, el promotor es el promotor nativo del gen endógeno.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un replicón que comprende la secuencia de ácidos polinucleicos como se describe en este documento. Preferiblemente, dicho replicón es un vector, como se describe en este documento en otra parte. En una realización, dicho vector es adecuado para expresión procariótica. En otra realización, dicho vector es adecuado para recombinación homóloga en una bacteria gram-positiva.

La invención se refiere a una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende un sitio de unión a ribosoma de una bacteria gram positiva y un gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación exógena a dicha bacteria, en la que el sitio de unión a ribosoma se configura para efectuar traducción del gen exógeno, marco de lectura abierto o

secuencia de codificación. En una realización, la secuencia de ácidos polinucleicos comprende un sitio de unión a ribosoma de una bacteria gram positiva y un gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación exógena a dicha bacteria, en la que el sitio de unión a ribosoma se conecta en el extremo 5' del gen exógeno, marco de lectura abierto o secuencia de codificación.

5 La invención se refiere a una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende una región intergénica, preferiblemente una región intergénica de operón, de una bacteria gram positiva y un gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación exógena a dicha bacteria, en la que la región intergénica se configura para efectuar traducción del gen exógeno, marco de lectura abierto o secuencia de codificación. En una realización, la secuencia de ácidos polinucleicos comprende una región intergénica, preferiblemente una región intergénica de operón, de una bacteria gram positiva y un  
10 gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación exógena a dicha bacteria, en la que la región intergénica se conecta en el extremo 5' del gen exógeno, marco de lectura abierto o secuencia de codificación. Preferiblemente, la región intergénica es una región intergénica que precede rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE, o rplN como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que precede rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, o rplF como se describe en este documento en otra parte o  
15 una región intergénica que corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 a 13 o secuencias relacionadas como se describió anteriormente.

La invención se refiere a un vector de expresión policistrónica que comprende la región intergénica que precede rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE, o rplN como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que  
20 corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 7 o una región intergénica que precede rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, o rplF como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 a 13 o secuencias relacionadas como se describió anteriormente. En una realización, dicho vector es adecuado para clonar un gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación en el extremo 3' de dicha región intergénica, preferiblemente un gen que es exógeno a una bacteria gram-positiva. En una realización, dicho vector es  
25 adecuado para ser replicado en una bacteria gram-positiva. En una realización adicional, dicho vector es adecuado para efectuar recombinación homóloga en una bacteria gram-positiva, en particular para integración cromosómica de dicha región intergénica y un gen, marco de lectura abierto o secuencia de codificación en el extremo 3' de dicha región intergénica. En una realización, dicho vector comprende adicionalmente uno o más promotores, preferiblemente un promotor de bacteria gram-positiva. En una realización adicional, dicho vector comprende adicionalmente secuencias reguladoras, por ejemplo operador, terminador y similares. En aún otra realización, dicho vector comprende  
30 adicionalmente uno más marcadores de selección, tales como genes de resistencia a antibióticos.

Se describe en este documento un método para expresión de gen exógeno en una bacteria gram-positiva, que comprende la etapa de transformar dicha bacteria gram-positiva con el vector que comprende un gen exógeno, marco de lectura abierto o secuencia de codificación, opcionalmente que adicionalmente comprende un promotor (endógeno) como se describe en este documento.

35 También se describe en este documento el uso de una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende una región intergénica de una bacteria gram-positiva como se describe en este documento para expresión policistrónica de uno o más genes, marco de lectura abierto o secuencia de codificación exógena a dicha bacteria gram-positiva. También en este documento se describe el uso de una secuencia de ácidos polinucleicos que comprende una región intergénica de una bacteria gram-positiva como se describe en este documento para expresión policistrónica de uno o más genes,  
40 marcos de lectura abiertos o secuencias de codificación exógenas a dicha bacteria gram-positiva y uno o más genes, marco de lectura abierto o secuencias de codificación endógenas a dicha bacteria gram-positiva. Dicho uno o más genes exógenos a dicha bacteria gram-positiva se pueden acoplar al extremo 3' de dicho gen endógeno. La región intergénica puede ser una región intergénica que precede rplW, rplP, rpmD, rplB, rpsG, rpsE o rplN como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 7 o una  
45 región intergénica que precede rplP, rpmD, rplM, rpsE, rplE, o rplF como se describe en este documento en otra parte o una región intergénica que corresponde a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8 a 13 o secuencias relacionadas como se describió anteriormente.

En este documento también se describe un método para expresar de una o más proteínas exógenas en una bacteria gram-positiva, que comprende la etapa de introducir una secuencia de ácidos polinucleicos que codifica dicha una o  
50 más proteínas exógenas o un vector como se describe en este documento en dicha bacteria gram-positiva tal como para ser transcrita en un ARNm policistrónico.

Se describe en este documento un método para generar una bacteria gram-positiva capaz de expresar una o más proteínas exógenas, que comprende la etapa de introducir una secuencia de ácidos polinucleicos que codifica una o  
55 más proteínas exógenas o un vector como se describe en este documento en dicha bacteria gram-positiva tal como para ser transcrita en un ARNm policistrónico.

De acuerdo con la invención, uno o más genes exógenos, pueden ser de cualquier clase u origen. En una realización, uno o más genes exógenos codifican una proteína, polipéptido y/o péptido, preferiblemente una proteína, polipéptido y/o péptido que tiene un efecto terapéutico o preventivo en un sujeto, o preferiblemente un antígeno tal como un antígeno para inducir inmunidad o inmunotolerancia, un polipéptido terapéuticamente activo no vacunógeno, un anticuerpo o un  
60 fragmento funcional del mismo tal como Fab, una proteína de fusión o una proteína multimérica. En una realización

preferida, uno o más genes exógenos 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 de antígeno. El término anticuerpo, como se utiliza en este documento, incluye, pero no se limita a anticuerpos convencionales, anticuerpos quiméricos, dAb, anticuerpo biespecífico, anticuerpo trispecífico, 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 único, dominio variable de anticuerpo único.

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.

El anticuerpo 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. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "neutraliza" o "neutralización" significa la inhibición o reducción de una actividad biológica de una citoquina según se mide 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 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, dichas moléculas de unión se unen a o inhiben el efecto biológico de las citoquinas seleccionadas de la lista de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12 (o sus subunidades IL-12p35 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 (α, β, γ) y TNFα. 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-1α, 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, α4 integrina y α4β7 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 αvβ3/α5β1 e IL-8. En una realización preferida adicional dicha molécula de unión es capaz de neutralizar el efecto biológico de TNFα, IL-12, IFNγ, IL-23 o IL-17. Preferiblemente, dicha molécula de unión se selecciona del grupo que consiste de

- un anticuerpo anti-TNFα, fragmento de anticuerpo anti-TNFα, dominio variable de anticuerpo único anti-TNFα, receptor de TNF soluble o variante negativa dominante de TNFα;

- anticuerpo anti-IL-12, fragmento de anticuerpo anti-IL-12, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-12, receptor 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, fragmento de anticuerpo anti-IL-23, dominio variable de anticuerpo único anti-IL-23, receptor IL-23 soluble, variante negativa dominante de IL-23 o IL-23 dAb;

5 - 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;

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

10 - 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

- 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.

15 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 variable de cada una de la cadena pesada y ligera.

20 En una realización, el Fab es Fab anti-TNF de cA2 (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 Fab anti-TNF de CDP870 (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).

El experto apreciará que los anticuerpos, cuando son 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 ves separadas.

25 De acuerdo con lo anterior, las regiones de codificación de las cadenas pesada y ligera cada una puede estar comprendida en una unidad de expresión policistrónica como se describe en este documento. Secuencias de ácidos polinucleicos que codifican cadenas pesada y ligera se puede incorporar en diferentes unidades de expresión policistrónicas. Preferiblemente, las secuencias de ácidos polinucleicos que codifican cadenas pesada y ligera se incorporan en la misma unidad de expresión policistrónica. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva como se describe en este documento, que comprende uno o más genes endógenos, una o más secuencias de ácidos polinucleicos que codifican una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento, preferiblemente un fragmento funcional del mismo, y una o más secuencias de ácidos polinucleicos que codifican una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento, preferiblemente un fragmento funcional del mismo, que se acoplan traduccionalmente o transcripcionalmente. En otra realización, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, en la que dicha unidad de expresión policistrónica comprende uno o más genes endógenos, una o más secuencias de ácidos polinucleicos que codifican una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento, preferiblemente un fragmento funcional del mismo, y una o más secuencias de ácidos polinucleicos que codifican una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento, preferiblemente un fragmento funcional del mismo. En aún otra realización, la secuencia de ácidos polinucleicos que codifica a cadena ligera se acopla transcripcionalmente o traduccionalmente al extremo 3' de la secuencia de ácidos polinucleicos que codifica la cadena pesada. De forma ventajosa, dicho acoplamiento aumenta adicionalmente la expresión de ambas cadena pesada y ligera.

45 La invención también se refiere al uso de la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento para terapia. La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento.

50 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención se refiere a la bacteria gram-positiva o una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento para uso como un medicamento. El otro aspecto, la invención se refiere a la bacteria gram-positiva o una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento para uso en terapia o tratamiento. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la bacteria gram-positiva o una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento para la fabricación de un medicamento. En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento, que comprende administrar la bacteria gram-positiva o una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento. En una realización, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva o una composición farmacéutica que comprende una bacteria gram-positiva como se describe en este documento, en la que uno o más genes exógenos codifican un producto, tal como una proteína, polipéptido o péptido, cuyo producto tiene un efecto terapéutico o

preventivo en un sujeto, preferiblemente para uso como un medicamento, preferiblemente para uso en administración o suministro de dicho producto al sujeto.

Se describe en este documento un método para suministro de un polipéptido codificado por uno o más genes exógenos, marco de lectura abierto, o secuencia de codificación comprendida en la bacteria gram-positiva de la invención a humano o animal en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de bacteria gram-positiva de acuerdo con la invención como se describe en este documento. El animal puede ser 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.

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 las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Un "humano o animal en necesidad de tratamiento" incluye aquellos que se beneficiarían del tratamiento de una afección dada.

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 o 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 bacterias gram-positivas, por ejemplo, en una dosis única o repetida.

Las bacterias gram-positivas de la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con uno o más compuestos activos. Este último se puede administrar antes, después o simultáneamente con la administración de las bacterias gram-positivas.

Existen varias divulgaciones de la técnica anterior sobre el suministro de antígenos y/o polipéptidos terapéuticamente activos, y debe apreciarse que dichas divulgaciones pueden modificarse adicionalmente ventajosamente con las bacterias gram-positivas de la presente invención. Por medio de ejemplo y no de limitación, suministro bacteriano de interleuquinas en particular IL-10 para tratar la colitis (por ejemplo WO 00/23471), IL-27 para modular una respuesta inflamatoria (WO 2004/069177), suministro de antígenos como vacunas (por ejemplo WO 97/14806), suministro de GLP-2 y análogos relacionados se puede utilizar para tratar la enfermedad del intestino corto, la enfermedad de Crohn, la osteoporosis y como terapia adyuvante durante la quimioterapia del cáncer, etc. Adicionalmente, la administración bacteriana de péptidos trébol se puede utilizar para tratar enfermedades del canal alimentario (por ejemplo WO 01/02570). En particular, el uso de proteínas o péptidos trébol para el tratamiento de trastornos y daños en el tubo digestivo, incluyendo la boca, el esófago, el estómago y el intestino grueso y delgado, así como para la protección y el tratamiento de los tejidos que se encuentran fuera del tubo digestivo se describe en los documentos WO 97/38712 y WO 92/14837. Estas proteínas se pueden utilizar para tratar lesiones en estas áreas o para inhibir la formación de lesiones. Estas lesiones pueden ser provocadas por: radioterapia o quimioterapia para el tratamiento del cáncer, cualquier otro fármaco que incluya alcohol que dañe el tubo digestivo, exposición accidental a la radiación o a una sustancia cáustica, infección, un trastorno digestivo que incluye pero no se limita a la mucositis oral, mucositis intestinal, esofagitis, proctitis, dispepsia no ulcerosa, gastritis, úlcera péptica o duodenal, cáncer gástrico, cáncer de colon, linfoma MALT, síndrome de Menetier, enfermedad por reflujo gastroesofágico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y colitis aguda de origen químico, bacteriano u oscuro. Los péptidos trébol son particularmente útiles para tratar la colitis aguda, mucositis oral, mucositis intestinal, esofagitis y la proctitis. Se prevén aplicaciones terapéuticas adicionales utilizando los promotores y las células anfitrionas de la invención.

Ejemplos no limitantes adicionales de los tipos de enfermedades tratables en humanos o animales mediante la administración de polipéptidos terapéuticos de acuerdo con la invención incluyen, entre otros, enfermedades inflamatorias del intestino que incluyen enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (tratables con, por ejemplo, IL-1ra, IL-10, IL-27 o péptidos trébol); enfermedades autoinmunitarias, que incluyen, pero no se limitan a, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso (tratable con, por ejemplo, IL-1ra, IL-27, IL-10 o el auto-antígeno 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); 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 cantidad de las composiciones o antígenos mencionados anteriormente); etc.

Las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para tratar enfermedades infecciosas. En una realización, se puede obtener inmunización pasiva contra la enfermedad asociada a *Clostridium*, preferiblemente la 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. Preferiblemente, dicha bacteria gram positiva es una *Lactococcus* sp., Más preferiblemente *Lactococcus lactis* o una subespecie o una cepa de la misma.

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 la secuencia de ADN o YP\_001087135.1 para la secuencia de la proteína). Ambas son proteínas de alta masa molecular que se unen a la superficie de las células epiteliales intestinales, en las que se internalizan y catalizan la glucosilación de las proteínas rho citoplásmicas, lo que lleva a muerte celular, inflamación y 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, y 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, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva como se describe en este documento, en la que la unidad de expresión policistrónica comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, preferiblemente un Fab, como se describe en este documento en otra parte, se dirige contra la toxina A y/o toxina B de *Clostridium*. Aún más preferiblemente, dicho anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo neutralizante. En una realización adicional, la invención se refiere a una bacteria gram-positiva, preferiblemente una *Lactococcus* sp. tal como *Lactococcus lactis* o una *Enterococcus* sp. tal como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*, que comprende una unidad de expresión policistrónica, preferiblemente integrada en el cromosoma bacteriano, dicha unidad de expresión policistrónica comprende un gen endógeno, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de *eno*, *usp45*, *gap*, *pyk*, *rpmB* y *rplS*, preferiblemente que se origina de un *Lactococcus* sp. o un *Enterococcus* sp., y uno o más genes exógenos que codifican a anticuerpo neutralizante o fragmento de anticuerpo, preferiblemente un Fab, contra la toxina A y/o toxina B de *Clostridium*, preferiblemente *Clostridium difficile*, dicha unidad de expresión policistrónica preferiblemente se integra cromosómicamente en el locus nativo de dicho gen endógeno, y dicho gen de toxina A y/o toxina B anticuerpo (fragmento) preferiblemente se acopla transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno, dicho acoplamiento transcripcional preferiblemente es afectado por una región intergénica, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de regiones intergénicas que preceden *rplW*, *rplP*, *rpmD*, *rplB*, *rpsG*, *rpsE*, *rplN*, *rplM*, *rplE*, y *rplF* de una bacteria gram-positiva, preferiblemente una *Lactococcus* sp. o una *Enterococcus* sp. Los anticuerpos de toxina A y toxina B de *Clostridium* como se describe en este documento se conocen en la técnica (véase por ejemplo Leung et al., *J Pediatr* 1991;118(4 Pt 1):633-637; Wilcox. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(5):882-884; Sougioultzis et al., *Gastroenterology* 2005;128(3):764-770; Kyne et al., *N Engl J Med* 2000;342(6):390-397; Lowy et al., *N Engl J Med*; 362(3):197-205). Ambos anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden ubicar sobre unidades de expresión policistrónicas separadas en la misma o diferente bacteria gram-positiva, pero preferiblemente se ubican sobre una unidad de expresión policistrónica única. La invención adicionalmente se refiere a un método para evitar y/o tratar CDAD, que comprende administrar dicha bacteria gram-positiva.

El lector experto apreciará que las enfermedades citadas específicamente en este documento son solo de ejemplo y su mención no pretende en modo alguno limitar el uso de los reactivos proporcionados por la invención, por ejemplo, los promotores, ácidos nucleicos, vectores y células anfitrionas de la invención, a estas enfermedades particulares. En cambio, un lector experto entiende que los reactivos de la invención se pueden 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 diversas enfermedades o afecciones adicionales de humanos y animales. En consecuencia, una vez que un producto de expresión adecuado, preferiblemente un polipéptido, por ejemplo, un antígeno, anticuerpo (fragmento) y/o un polipéptido terapéuticamente activo no vacunógeno, se ha elegido o determinado para una dolencia determinada, un experto sería capaz de lograr su expresión, aislamiento y/o suministro utilizando los reactivos de la invención.

La divulgación también contempla el tratamiento de enfermedades en otros animales, que incluye perros, caballos, gatos y aves. Las enfermedades en perros incluyen, pero no se limitan a, moquillo canino (paramixovirus), hepatitis canina (adenovirus Cav-1), tos de las perreras o laringotraqueítis (adenovirus Cav-2), enteritis canina infecciosa (coronavirus) y enteritis hemorrágica (parvovirus).

Las enfermedades en gatos incluyen, pero no se limitan a, rinotraqueítis viral (herpesvirus), enfermedad caliciviral felina (calicivirus), peritonitis infecciosa felina (parvovirus) y leucemia felina (virus de la leucemia felina). También se contemplan otras enfermedades virales en caballos y aves que son tratables utilizando los métodos y composiciones de

la invención. Para este propósito, se preferirá particularmente el uso de microorganismos que expresan interferones recombinantes.

Como se utiliza en este documento, la composición farmacéutica preferiblemente comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la bacteria gram-positiva de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno o más sustancias de vehículo farmacéuticamente aceptable 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.

Las bacterias gram-positivas de la invención se pueden suspender 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, bacterias gram-positivas vivas y un medio adecuado para la administración. Las bacterias gram-positivas se pueden liofilizar en presencia de excipientes comunes tales como lactosa, otros azúcares, estearato, carbonato y/o sulfato alcalino y/o alcalinotérrico (por ejemplo, estearato de magnesio, carbonato de sodio y sulfato de sodio), caolín, sílice, sabores y aromas. Las bacterias gram-positivas liofilizadas de esta manera se pueden preparar en forma de cápsulas, comprimidos, granulados y polvos (por ejemplo, un polvo de enjuague bucal), cada uno de los cuales se puede administrar por ruta oral. Alternativamente, algunas bacterias gram positivas pueden prepararse como suspensiones acuosas en medios adecuados, o las bacterias liofilizadas de esta manera se pueden suspender en un medio adecuado justo antes de su uso, dicho medio incluye los excipientes a los que se hace referencia en este 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 las bacterias gram-positivas y de ese modo proporcionan una liberación controlada de la proteína deseada codificada en ellas. Por ejemplo, la forma de dosificación oral (que incluye cápsulas, comprimidos, gránulos, granulados, polvos) puede recubrirse con una capa delgada de excipiente (generalmente polímeros, derivados celulósicos y/o materiales lipofílicos) que resiste la disolución o alteración en el estómago, pero no en el intestino, lo que permite el tránsito a través del estómago a favor de la desintegración, disolución y absorción en el intestino.

La forma de dosificación oral se puede diseñar para permitir la liberación lenta de las bacterias gram-positivas y de las proteínas exógenas producidas, por ejemplo, comprimidos o cápsulas de liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, acción sostenida. Estas formas de dosificación contienen usualmente excipientes convencionales y bien conocidos, tales como excipientes hinchables lipofílicos, poliméricos, celulósicos, insolubles. Las formulaciones de liberación controlada también se pueden utilizar para cualquier otro sitio de suministro que incluya suministro intestinal, de colon, bioadhesión o 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 ungüentos, supositorios y cremas. En este caso, las bacterias gram-positivas 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., *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, 5th edition, William and Wilkins, 1990; 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 usualmente se puede suministrar en recipientes de dosis única y contiene una o más sustancias activas disueltas o dispersas en agua, glicerol o macrogoles u otros solventes adecuados.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, en una realización preferida, las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención como se describe en este documento que codifican un gen exógeno deseado se pueden administrar al animal o al humano a través de la mucosa, por ejemplo, una ruta oral, nasal, rectal, vaginal o bronquial por cualquiera de las formulaciones del estado de la técnica aplicables a la ruta específica. Las dosificaciones de bacterias gram-positivas para administración 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 va a utilizar.

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 materia una vez que estén armadas con la presente invención. La dosificación podría determinarse de todos modos caso por caso al medir las concentraciones a nivel del suero de la proteína recombinante después de la administración de cantidades predeterminadas de células, utilizando métodos bien conocidos, tales como los conocidos como ELISA o Biacore (véase ejemplos). El análisis del perfil cinético y la semivida de la proteína recombinante suministrada proporcionan información suficiente para permitir la determinación de un rango de dosificación efectivo para las células anfitrionas transformadas.



Cuando las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención como se describe en este documento expresan un antígeno, la invención también puede proporcionar una vacuna.

5 El término "vacuna" identifica una composición farmacéuticamente aceptable que, cuando se administra en una cantidad efectiva 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.

10 La vacuna de la invención comprendería las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención como se describe en este documento 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 de superficie activa tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, y adyuvantes humanos potencialmente útiles farmacéuticamente aceptables tales como BCG (bacilo Calmetle-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los biomarcadores, usos y métodos descritos en este documento que proporcionan ventajas sustanciales en el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o monitorización de la cicatrización de fracturas dañadas.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de regiones intergénicas del genoma de *Lactococcus lactis*

20 Las proteínas celulares de un cultivo de placa final de cepa MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* se visualizaron sobre un gel de proteína con tinción de azul Coomassie, como se indica en la Figura 1. Los carriles A y B contenían proteínas MG1363 de 29 mg y 58 mg, respectivamente. 12 bandas de proteínas definidas del carril A se aislaron a partir del gel. Se aislaron las proteínas y se identificaron regiones intergénicas mediante:

- 1) Identificación de proteínas expresadas abundantemente en los fragmentos mediante secuenciación de péptidos parcial (MALDI-TOF/TOF) y búsqueda en base de datos utilizando masas de péptidos combinadas e información de secuencia
- 25 2) Identificación, utilizando la secuencia de cromosomas de la cepa MG1363 de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Wegmann et al), de genes que codifican las proteínas expresadas abundantemente (1) que están presentes en un operón, pero no como un "primer gen"
- 3) Identificación de regiones intergénicas que preceden estos genes expresados abundantemente

30 Por lo tanto la Tabla 3 enumera regiones intergénicas identificadas. Las secuencias subrayadas representan sitios de unión a ribosoma.

Tabla 3

Región intergénica	2do gen	Función de 2do gen
TAATG (SEQ ID NO: 1)	rplW	proteína ribosómica 50 S L23
TAATCCATG (SEQ ID NO: 2)	rplP	proteína ribosómica 50 S L16
<u>TAAGGAGG</u> AAAAATG (SEQ ID NO: 3)	rpmD	proteína ribosómica 50 S L30
TAAT <u>AGAGGAGG</u> AAATCGTG (SEQ ID NO: 4)	rplB	proteína ribosómica 50 S L2
<u>TAAGAAGGG</u> GAGATAAGTAAGAATG (SEQ ID NO: 5)	rpsG	proteína ribosómica 30 S S7
<u>TAAGGAAAGGG</u> GTAATTAACATG (SEQ ID NO: 6)	rpsE	proteína ribosómica 30 S S5
TAAGCAA <u>ACTAGGAGG</u> AATATAGCATG (SEQ ID NO: 7)	rplN	proteína ribosómica 30 S L14

Ejemplo 2: Selección de sitios para expresión bicistrónica

35 La Tabla 4 enumera promotores objetivo identificados en el Ejemplo 1 que llevan a alto nivel de expresión. Estos promotores se pueden utilizar como sitios objetivo para expresión policistrónica de genes exógenos.

Tabla 4

ES 2 676 877 T3

Banda	Gen que se anota en MG1363	Nombre
1	polimerasa de ARN dirigida a ADN, subunidad beta'/subunidad de 160 kD	rpoC
	polimerasa de ARN dirigida a ADN, subunidad beta/subunidad de 140 kD	rpoB
	ferritina de unión a hierro no hemo	dpsA
2	Piruvato quinasa	pyk
	glutamil -ARNt sintetetasas	gltX
3	fosfopiruvato hidratase	eno
	glutamina sintetasa	glnA
	represor de glutamina sintetasa	glnR
	dipeptidasa PepV	pepV
	subunidad beta de sintasa ATP tipo F0F1 (subunidad beta de sintasa ATP F1)	atpD
	subunidad alfa de sintasa ATP tipo F0F1	atpA
4	Proteína de unión a ATP múltiple de transportador de unión a azúcar	msmK
	subunidad alfa de componente de complejo E1 de acetoina deshidrogenasa (acoA)	pdhA
	proteína de división celular	ftsA
	UDP-galactopiranososa mutasa	glf1
	3-fosfoglicerato quinasa	pgk
	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	gapB
	acetato quinasa	ackA1
	3-oxoacil-(acil-vehículo-proteína) sintasa II	fabF
5	3-ketoacil-(acil-vehículo-proteína) reductasa	fabG
	polimerasa de ARN dirigida a ADN, subunidad alfa/subunidad de 40 kD	rpoA
	Proline dipeptidasa	pepQ
	glutamil aminopeptidasa	pepA
	Proteína relacionada con deshidrogenasa predicha	llmg_0272
6	proteína ribosómica 30S S2	rpsB
	proteína ribosómica 50S L4 (rplD)	rplD
	proteína ribosómica 50S L23	rplW
	proteína ribosómica 50S L2	rplB
	Cadena fenilalanil-ARNt sintetasa beta	pheT
	fructosa-bisfosfato aldolasa	fbaA
7	Proteína ribosómica 30S S4	rpsD
	factor de iniciación de traducción3 (IF-3)	infC
	factor de alargamiento de transcripción GreA	greA

ES 2 676 877 T3

Banda	Gen que se anota en MG1363	Nombre
	subunidad de proteasa de proteasa Clp dependiente de ATP	clpP
	superoxide dismutasa	sodA
8	Proteína ribosómica 30S S12	rpsL
	proteína ribosómica 30S S7	rpsG
	proteína ribosómica 50S L18	rplR
	proteína ribosómica 30S S5	rpsE
	proteína ribosómica 50S L30/L7E	rpmD
	S-ribosilhomocisteinasa	luxS
	proteína ribosómica 50S L15	rplO
	proteína ribosómica 50S L11	rplK
9	proteína ribosómica 30S S8	rpsH
	proteína ribosómica 50S L21	rplU
	proteína ribosómica 30S S13	rpsM
	proteína ribosómica 30S S19 (rpsS)	rpsS
	proteína ribosómica L22 (rplV)	rplV
	proteína ribosómica L16 (rplP)	rplP
	proteína ribosómica L14 (rplN)	rplN
	proteína ribosómica 30S L19	rplS
	proteína ribosómica 30S S11	rpsK
10	proteína ribosómica 30S S10	rpsJ
	co-chaperonina GroES	groES
	proteína ribosómica 50S L24	rplX
	proteína ribosómica 50S L10	rplJ
	proteína ribosómica 50S L7/L12	rplL
11	Proteína de unión a ADN similar a HU	hIIA
	proteína ribosómica 50S L28	rpmB
	Componente de sistema IIIB de fosfotransferasa	ptcB

5 El gen de  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*) de *E. coli* se introdujo como gen reportero en MG1363 de *Lactococcus lactis*. El producto génico *uidA*  $\beta$ -glucuronidasa, cataliza la división de una amplia variedad de  $\beta$ -glucurónidos que están comercialmente disponibles como sustratos histoquímicos y espectrofotométricos. La cepa sAGX0090 tiene el casete expresión de PhIIA>>*uidA* en el sitio *thyA* (Figura 2). Este promotor también se utilizó en cepas sAGX0037 y sAGX0085.

Como se representa en la Figura 2, construcciones de cistrón dobles se elaboraron al insertar *uidA* en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en el extremo 3' de diversos genes endógenos (gen X). Por lo cual, se utilizó *rpmD* como secuencia intergánica entre los genes endógenos de interés de la Tabla 4 y *uidA* para identificar sitios que resultan en mayor actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en comparación con sAGX0090.

10 Cultivos de *Lactococcus lactis* se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C en GM17 complementado con timidina cuando es necesario. Las células de 1 ml de cultivo se lavaron y resuspendieron en 1 ml de agua desmineralizada. Las

células se interrumpieron con matriz B de lisis MP Biomedicals y dispositivo Fasprep-24 a 6 m/s durante 40 segundos. Se centrifugaron los tubos y se elaboró una serie de dilución del sobrenadante celular. Se midió la actividad de GUS al agregar sustrato de p-nitrofenilo y β-mercaptoetanol que da a la solución un color amarillo tras la presencia de β-glucuronidasa. Se midió la actividad de GUS a 405 nm y se expresó relativamente con referencia a la cepa sAGX0090. Todas las cepas se trataron en paralelo.

La Figura 3 muestra actividad de GUS relativa de las construcciones de cistrón dobles del gen X >>rpmD>>uidA. La actividad de GUS se expresa relativamente con referencia a la cepa sAGX0090 que lleva el casete de expresión PhIIA >> uidA y se indica sobre el eje Y. Se encontró que la actividad de GUS en todas las cepas de cistrón doble es mayor que la cepa de referencia. En particular, la actividad de GUS en sAGX0168 (enoA>>rpmD>>uidA) y sAGX0222 (gapB>>rpmD>>uidA) se encontró que era 6.89 y 20.99 veces mayor que en comparación con sAGX0090, respectivamente.

Estos resultados claramente confirman que la expresión bicistrónica permite niveles de expresión de proteína mejorados sobre una amplia variedad de configuraciones.

#### Ejemplo 3: Expresión bicistrónica de proinsulina humana

El líder de secreción usp45 (SS) se fusionó a proinsulina humana (ins) para obtener secreción de proinsulina (SS::ins). El casete de expresión [SS::ins] se integró en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en el sitio thyA y se expresó directamente de PthyA (sAGX0121) o se insertó, junto con la región intergénica rpmD que precede SS::ins, como un segundo cistrón corriente abajo desde usp45 (sAGX0121) o enoA (sAGX0164) (Figura 4a). La capacidad de secreción de insulina se cuantificó mediante ELISA para evaluar la expresión bicistrónica de carga en comparación con la expresión dirigida por PthyA en el sitio thyA.

Han fallado los intentos para construir un plásmido de integración PhIIA >> SS:: Ins.

Se inocularon cepas de colonia única en 2 ml de GM17 complementado con timidina 200 μM cuando es necesario y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Para la cuantificación de secreción de proinsulina, estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17 fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BAM9 y se cultivaron durante otras 3 horas a 30°C. El BAM9 contiene sales M9, aminoplasmal al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 μM. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. La cantidad de proinsulina humana secretada en el sobrenadante de cultivo se cuantificó mediante ELISA proporcionado por Mercodia. Todas las cepas se trataron en paralelo.

La Figura 4b representa la cuantificación de secreción de proinsulina humana mediante cepas sAGX0122, sAGX0121 y sAGX0164 de *Lactococcus lactis*. La cantidad de proinsulina secretada se expresó como ng/ml y se indicó sobre el eje Y. La figura claramente demuestra que las cepas que comprenden un casete de expresión bicistrónica tienen una expresión de carga significativamente más alta que la cepa de referencia. En particular, la secreción de insulina fue más alta cuando SS::ins se acopló a través de rpmD a enoA.

#### Ejemplo 4: Expresión bicistrónica de Fab de cA2

Se generaron construcciones de expresión de cistrón dobles con cadena pesada y cadena ligera de Fab anti-hTNF de cA2. Todas las unidades de expresión se conducen por el promotor thyA y se ubicaron sobre plásmidos. Todos llevan genes para la cadena ligera, VLCL (L) y el fragmento FAB de la cadena pesada, VHCH1 (H), se deriva del anticuerpo monoclonal infliximab de cA2. Las configuraciones L>>H y H>>L se acoplan por regiones intergénicas que preceden rpmD, rplB, rpsG, rpsE o rplN. Todas las construcciones son de origen de plásmido.

La Figura 5 revela que ambas cadena pesada y cadena ligera se expresaron altamente por las construcciones de cistrón dobles, que llevan a niveles altos de Fab anti-TNF de cA2 funcional. La Figura 5 revela adicionalmente que la expresión de anti-TNF de cA2 aumenta cuando la cadena pesada se posicionó por encima de la cadena ligera, independientemente de la región intergénica.

Para la cuantificación de secreción de anti-hTNF, se inocularon cepas de colonia única en 2 ml de GM17 y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17 fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BAM9 y se cultivaron durante otras 3 horas a 30°C. El BAM9 contiene sales M9, aminoplasmal al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 μM. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se prepararon en paralelo y se ensayaron para la presencia de actividad de anti-TNF. Esto se hizo mediante ELISA directa utilizando TNF humano como proteína de captura. Las porciones de VLCL se detectaron mediante antisuero IgG antihumano de conejo y se revelaron mediante antisuero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina. La actividad de fosfatasa se midió mediante ensayo colorimétrico y se leyó como OD402. Todas las cepas se trataron en paralelo.

Ejemplo 5: Expresión bicistrónica de CDP870

Se generaron construcciones de expresión de cistrón dobles con cadena pesada y cadena ligera de Fab anti-TNF de CDP870. Todas las unidades de expresión se ubicaron sobre el cromosoma bacteriano.

5 La Figura 6a: El Fab de cadena ligera y pesada de CDP870 se fusiona a secuencias que codifican el líder de secreción usp45 (SS::CDP870 VLCL y SS::CDP870 VHCH1) que se insertaron como un segundo y tercer cistrón corriente abajo desde usp45 (sAGX0219, sAGX0220). En sAGX0219 y sAGX0220, se utilizó rpmD para acoplar genes SS::CD870 a usp45. Para evitar la inestabilidad genética, genes de cadena ligera y pesada se acoplaron a través de la región intergénica que precede rpIN. En sAGX0219, el gen de cadena ligera precede el gen de cadena pesada, mientras que en sAGX0220, el gen de cadena pesada precede el gen de cadena ligera.

10 Para la cuantificación de secreción de anti-hTNF, se inocularon cepas de colonia única en 2 ml de GM17 y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17 fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BAM9 y se cultivaron durante otras 3 horas a 30°C. El BAM9 contiene sales M9, aminoplasmal al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 µM. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se prepararon en paralelo y se ensayaron para la presencia de actividad de anti-TNF. Esto se hizo mediante ELISA directa utilizando TNF humano como proteína de captura con Remicade como un estándar de referencia. Las porciones de VLCL se detectaron mediante antisuero IgG antihumano de conejo y se revelaron mediante antisuero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina. La actividad de fosfatasa se midió mediante ensayo colorimétrico y se leyó como OD402. Todas las cepas se trataron en paralelo.

La Figura 6b revela que ambas cadena pesada y cadena ligera se expresaron altamente por las construcciones de cistrón dobles, que llevan a niveles altos de Fab anti-TNF de CDP870 funcional. La Figura 6b revela adicionalmente que la expresión de anti-TNF anti-TNF expresión sustancialmente aumenta cuando la cadena pesada se posicionó por encima de la cadena ligera.

Ejemplo 6: Expresión bicistrónica de factor de trébol humano 1 (hTFF1)

Las construcciones de expresión se generaron con la secuencia de codificación del líder de secreción usp45 fusionada a hTFF1 (SS::hTFF1). Todas las unidades de expresión se ubicaron sobre el cromosoma bacteriano. No fue posible construir plásmidos de integración para expresión de hTFF1 monocistrónica utilizando promotores más fuertes que PhIIA.

30 Figura 7a: La secuencia de codificación del líder de secreción usp45 (SS) se fusionó a hTFF1 para obtener secreción de hTFF1 (SS::hTFF1). El casete de expresión de SS::hTFF1 se integró en el cromosoma MG1363 de *Lactococcus lactis* en el sitio thyA y se expresó directamente de PhIIA (sAGX0085) o se insertó, junto con la región intergénica rpmD que precede SS::hTFF1, como un segundo cistrón corriente abajo desde gapB (sAGX0276).

35 Figura 7b: La capacidad de secreción de hTFF1 se cuantificó mediante ELISA para evaluar la expresión bicistrónica de carga en comparación con la expresión conducida por PhIIA en el sitio thyA. Para la cuantificación de secreción de hTFF1, se inocularon cepas de colonia única en 2 ml de GM17 y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17 fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BAM9 y se cultivaron durante otras 3 horas a 30°C. El BAM9 contiene sales M9, aminoplasmal al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 µM. En esta etapa, se determinaron las unidades formadoras de colonia (CFU) de todos los cultivos. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se prepararon en paralelo y se ensayaron mediante ELISA utilizando hTFF1 purificado como un estándar de referencia. La cantidad de hTFF1 secretada se expresó como ng/ml y ng/10<sup>9</sup> CFU. Todas las cepas se trataron en paralelo.

La Figura 7b claramente demuestra que la cepa que comprende un casete de expresión bicistrónica (sAGX0276) tiene una expresión de carga significativamente mayor que la cepa de referencia (sAGX0085). La cantidad de expresión de hTFF1 secretada se mejoró sustancialmente (>5 veces por ml; >12 veces per CFU) cuando se acopló hTFF1 a través de rpmD a gapB.

Ejemplo 7: Selección de regiones intergénicas del genoma de *Enterococcus faecium*

Las proteínas celulares de un cultivo de placa final de cepa LMG 15709 de *Enterococcus faecium* (*Enterococcus faecium* [Orla- Jensen 1919] Schleifer and Kilpper-Bälz 1984 VP; LMG 15709; ATCC 6057; DSM 2146; NCIMB 8842) se visualizaron sobre un gel de proteína con tinción de azul Coomassie, como se indica en la Figura 8. Los carriles A, B y C contenían las las proteínas celulares de la célula lisada equivalente de 284 µl, 142 µl y 56.8 µl de cultivo de placa final de LMG15709 de *Enterococcus faecium*, respectivamente. 12 bandas de proteínas definidas del carril C se aislaron a partir del gel. Se aislaron las proteínas y se identificaron regiones intergénicas mediante:

1) Identificación de proteínas expresadas abundantemente en los fragmentos mediante secuenciación de péptidos parcial (MALDI-TOF/TOF) y búsqueda en base de datos utilizando masas de péptidos combinadas e información de secuencia.

5 2) Identificación, utilizando la secuencia de cromosomas de *Enterococcus faecium* PC4.1 (recuperado del banco de datos NCBI Genome, número de acceso GenBank ADMM01000000), de genes que codifican las proteínas expresadas abundantemente (1) que están presentes en un operón, pero no como un "primer gen".

3) Identificación de regiones intergénicas que preceden estos genes expresados abundantemente (Tabla 5).

La Tabla 5 enumera regiones intergénicas identificadas en LMG15709 de *Enterococcus faecium*. Las secuencias subrayadas representan sitios de unión a ribosoma.

Tabla 5

Región intergénica	2do gen	Función de 2do gen
TAATC (SEQ ID NO: 8)	rplP	proteína ribosómica 50S L16
TA <u>AGGAGG</u> ACAACAATA (SEQ ID NO: 9)	rpmD	proteína ribosómica 50S L30
TAAT <u>AGGAGGGA</u> ATTTCA (SEQ ID NO: 10)	rplM	proteína ribosómica 50S L13
TTAGA <u>AGAAGGAGGA</u> ATACCATTC (SEQ ID NO: 11)	rpsE	proteína ribosómica 30S S5
TAAAGTTTA <u>AGGAAGGAGGGT</u> CCTACTGA (SEQ ID NO: 12)	rplE	proteína ribosómica 50S L5
TAATCAAGTAGAATCTACA <u>AGGAGGT</u> GTCTTTAA (SEQ ID NO: 13)	rplF	proteína ribosómica 50S L6

Ejemplo 8: Selección de sitios en el genoma de *Enterococcus faecium* para expresión bicistrónica

15 La Tabla 6 enumera los genes de *Enterococcus faecium* altamente expresados identificados en el Ejemplo 7 que conducen a alto nivel de expresión. Los promotores que conducen estos genes se pueden utilizar como sitios objetivo para expresión policistrónica de genes exógenos. Estos genes endógenos se pueden utilizar adicionalmente como primer gen en un módulo de expresión policistrónica, acoplado transcripcionalmente o traduccionalmente, a través de una región intergénica, a genes exógenos corriente abajo.

Tabla 6

Banda	Anotación de gen	Nombre
1	Enolasa [ <i>Enterococcus faecium</i> DO]; gi 69249235	eno
	Factor de alargamiento Tu [ <i>Enterococcus faecium</i> TX13330]; gi 227550718	tuf
2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [ <i>Enterococcus faecium</i> TX1330]; gi 227552066	gap
3	L-lactato deshidrogenasa [ <i>Enterococcus faecium</i> DO]; gi 69245441	ldh
	Aspartato carbamoiltransferasa [ <i>Enterococcus faecium</i> DO]; gi 69247601	pyrB
	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa [ <i>Enterococcus faecium</i> DO]; gi 69245416	
4	Piruvato quinasa [ <i>Enterococcus faecium</i> DO]; gi 69247355 Oligoendopeptidasa F [ <i>Enterococcus faecium</i> E1039]; gi 293553061 Aspartil-ARNt sintetasa bacteriana/ tipo mitocondrial [ <i>Enterococcus faecium</i> DO]; gi 69247937	pyk pepF aspS
5	Lisil-ARNt sintetasa [ <i>Enterococcus faecium</i> TX1330]; gi 227552660	lysS
	GroEL [ <i>Enterococcus faecium</i> ]; gi 35187728	groEL
6	Fosfoglicerato quinasa [ <i>Enterococcus faecium</i> E1039]; gi 293557157	pgk
7	Fructosa-bisfosfato aldolasa clase II [ <i>Enterococcus faecium</i> 1,230,933]; gi 293557157	

Banda	Anotación de gen	Nombre
	fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato [Enterococcus faecium E1039]; gi 293556592	
	Saicar sintetasa [Enterococcus faecium 1,141,733]; gi 257887626	purC
8	fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato [Enterococcus faecium E1039]; gi 293556592	
	Saicar sintetasa [Enterococcus faecium 1,231,501]; gi 257884790	purC
9	proteína ribosómica 50S L5 [Enterococcus faecium DO]; gi 69247181	rplE
	proteína ribosómica 50S L6 [Enterococcus faecium DeO]; gi 69247184	rplF
	Peroxiredoxina [Enterococcus faecium TX1330]; gi 227551517	aphC
	Xantina fosforibosiltransferasa [Enterococcus faecium 1,230,933]; gi 257878081	
10	Factor de alargamiento G [Enterococcus faecium TX1330]; gi 227550717	fusA
11	proteína ribosómica 30S S5, bacteriana y forma organelo [Enterococcus faecium DO]; gi 69247186	rpsE
	proteína ribosómica 50S L16 [Enterococcus faecium]; gi 9931590	rplP
	Familia de proteína de estrés universal [Enterococcus faecium E980]; gi 293571359	
	Ferritina [Enterococcus faecium 1,230,933]; gi 257880413	
	proteína ribosómica 30S S7 [Enterococcus faecium TX1330]; gi 227550716	rpsG
	proteína ribosómica 50S L13 [Enterococcus faecium 1,230,933]; gi 257880414	rplM
12	familia M20 de peptidasa PepV [Enterococcus faecium TX1330]; gi 227550917	pepV
	Glutamil-ARNt sintetasa bacteriana/mitocondrial [Enterococcus faecium DO]; gi 69245495	gltX
	Proteína de división celular FtsA [Enterococcus faecium DO]; gi 69244711	ftsA
	Asparaginil-ARNt sintetasa, clase IIb [Enterococcus faecium DO]; gi 69247321	asnC

5 En dicha forma, el gen de  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*) de *E. coli* se introdujo como gen reportero en LMG15709 de *Enterococcus faecium*. El producto génico *uidA*  $\beta$ -glucuronidasa, cataliza la división de una amplia variedad de  $\beta$ -glucurónidos que están comercialmente disponibles como sustratos histoquímicos y espectrofotométricos. Como se representa en la Figura 9, construcciones de cistrón dobles se elaboraron al insertar *uidA* en el cromosoma LMG15709 de *Enterococcus faecium* en el extremo 3' de diversos genes endógenos (gen X, *gap* y *eno* en este ejemplo; Figura 9). Por lo cual, *rpmD* de *Enterococcus faecium* se utilizó como región intergénica entre los genes endógenos de interés de la Tabla 6 y *uidA* para identificar sitios que resultan en mayor actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) (Figura 10).

10 Los cultivos *Enterococcus faecium* se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C en GM17 complementado con timidina. Las células de 1 ml de cultivo se lavaron y resuspendieron en 1 ml de agua desmineralizada. Las células se interrumpieron con matriz B de lisis MP Biomedicals y dispositivo Fasprep-24 a 6 m/s durante 40 segundos. Se centrifugaron los tubos y se elaboró una serie de dilución del sobrenadante celular. Se midió la actividad de GUS al agregar sustrato de p-nitrofenilo y  $\beta$ -mercaptoetanol que da a la solución un color amarillo tras la presencia de  $\beta$ -glucuronidasa. Se midió la actividad de GUS a 405 nm y se expresó relativamente con referencia a *Lactococcus lactis* cepa sAGX0090. Todas las cepas se trataron en paralelo.

15 La Figura 10 muestra actividad de GUS relativa de las construcciones de cistrón dobles del gen X >>*rpmD*>>*uidA*. La actividad de GUS se expresa relativamente con referencia a la cepa sAGX0090 que lleva el casete expresión de *PhIIA*>>*uidA* y se indica sobre el eje Y. Se encontró que la actividad de GUS en todas las cepas de cistrón doble es mayor que la cepa de referencia.

20 En particular, la actividad de GUS en sAGX0270 (*gap*>>*rpmD*>>*uidA*) y sAGX0271 (*eno*>>*rpmD*>>*uidA*) se encontró que era 30.6 y 26.9 veces mayor que en comparación con sAGX0090, respectivamente.

Estos resultados claramente confirman que la expresión bicistrónica permite niveles de expresión de proteína mejorados sobre una amplia variedad de configuraciones.

Ejemplo 9: Expresión bicistrónica de interleuquina-10 humana (hIL10) por *Enterococcus faecium*

5 La secuencia de codificación de ADN del líder de secreción usp45 de *Lactococcus lactis* (SS) se fusionó en marco a la secuencia de ADN de hIL10 maduro para obtener secreción de hIL10. El casete de expresión [SS::hIL10] se insertó, junto con la región intergénica rpmD de *Enterococcus faecium* que precede SS::hIL10, como un segundo cistrón corriente abajo desde gap (sAGX0279; Figura 11a). The hIL10 secreción capacity se cuantificó mediante ELISA para evaluar la expresión bicistrónica de carga en *Enterococcus faecium*. El *Enterococcus faecium* sAGX0270 sirvió como un control negativo.

10 Se inocularon cepas de colonia única en 10 ml de GM17 complementado con timidina 200 µM (GM17T) cuando es necesario y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Para la cuantificación de secreción de hIL10, estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17T fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BAM9T y se cultivaron durante otras 3 horas a 30°C. El BAM9T contiene sales M9, aminoplasmal al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 µM. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. La cantidad de hIL10 humano secretado en el sobrenadante de cultivo se cuantificó mediante ELISA de hIL10 intercalado. Todas las cepas se trataron en paralelo.

20 La Figura 11b representa la cuantificación de secreción de hIL10 humana mediante cepas sAGX0270 y sAGX0279 de *Enterococcus faecium*. La cantidad de hIL10 secretado se expresó como ng/10<sup>9</sup> CFU de células en 3 horas y se indicó sobre el eje Y. La figura claramente demuestra que las cepas de *Enterococcus faecium* que comprenden un casete de expresión bicistrónica son capaces de secretar cantidades considerables de la proteína hIL10 de carga.

Ejemplo 10: Expresión bicistrónica de interleuquina-27 humana (hIL27) por *Enterococcus faecium*

25 La secuencia de codificación de ADN del líder de secreción usp45 de *Lactococcus lactis* (SS) se fusionó en marco a la secuencia de ADN de hIL27 maduro para obtener secreción de hIL27. El casete de expresión [SS::hIL27] se insertó, junto con la región intergénica rpmD de *Enterococcus faecium* que precede SS::hIL27, como un segundo cistrón corriente abajo desde gap (sAGX0317; Figura 12a). La capacidad de secreción de hIL27 se cuantificó mediante ELISA para evaluar la expresión bicistrónica de hIL27. El *Enterococcus faecium* sAGX0270 sirvió como un control negativo,

30 Se inocularon cepas de colonia única en 10 ml de GM17 complementado con timidina 200 µM (GM17T) y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Para la cuantificación de secreción de hIL27, estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17T fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BM9T y se cultivaron durante otras 3 horas a 30°C. El BM9T contiene sales M9, casitona al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 µM. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. La cantidad de hIL27 humana secretada en el sobrenadante de cultivo se cuantificó mediante ELISA hIL27 intercalado (R&D systems). Todas las cepas se trataron en paralelo.

40 La Figura 12b representa la cuantificación de secreción de hIL27 humana por cepas sAGX0270 y sAGX0317 de *Enterococcus faecium*. La cantidad de hIL27 secretada se expresó como ng/10<sup>9</sup> CFU de células en 3 horas y se indicó sobre el eje Y. La figura claramente demuestra que la cepa sAGX0317 de *Enterococcus faecium* que comprende un casete de expresión bicistrónica ubicado corriente abajo del gen gap de *Enterococcus faecium* es capaz de secretar eficientemente cantidades considerables de hIL27 de proteína exógena.

Ejemplo 11: Expresión bicistrónica de Fab de CDP870 por *Enterococcus faecium*

45 Se generaron construcciones de expresión de cistrón dobles con genes de cadena pesada y cadena ligera de Fab de CDP870. Todas las unidades de expresión se ubicaron sobre el cromosoma bacteriano.

50 Figura 13a: El Fab cadena pesada y ligera de CDP870 se fusiona al líder de secreción de MG1363 usp45 de *Lactococcus lactis* (SS) que codifica secuencias [SS::CDP870 VHCH1] y [SS::CDP870 VLCL] que se insertaron como un segundo y tercer cistrón corriente abajo desde el gen gap LMG15709 de *Enterococcus faecium* (sAGX0278). En sAGX0278, la región intergénica de *Enterococcus faecium* se utilizó rpmD para acoplar casetes de expresión SS::CD870 a gap. Para evitar la inestabilidad genética, genes de cadena pesada y ligera se acoplaron a través de la región intergénica que precede rpmD de *Lactococcus lactis* y se utilizó diferente uso de codón en la señal de secreción de Usp45s de lo dos casetes de expresión SS::CD870. El casete de expresión de cadena pesada precede el casete de expresión de cadena ligera en sAGX0278.

55 Para la cuantificación de secreción de Fab de CDP870, se inocularon cepas de colonia única en 10 ml de GM17T y se hicieron crecer durante 16 horas a 30°C. Estos cultivos nocturnos saturados se diluyeron 1/25 en 5 ml de medio GM17T fresco y se hicieron crecer durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g



durante 10 minutos, se resuspendieron en una cantidad igual de medio BAM9T y se cultivaron durante otras 3 horas a 30 °C. El BAM9T contiene sales M9, aminoplasmal al 0.5%, glucosa al 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM y timidina 200 µM. Las células y sobrenadantes de cultivo se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se prepararon en paralelo y se ensayaron para la presencia de actividad de unión a TNF. Esto se hizo mediante ELISA directa utilizando TNF humano como proteína de captura con Cimzia® (fab de CDP870 unido a PEG) como un estándar de referencia. El Fab de CDP870 se detectó mediante antisuero Fab antihumano de cabra y se reveló mediante antisuero de anticabra de burro conjugado a HRP IgG(H+L). La actividad de HRP se visualizó mediante sustrato TMB. Se detuvo la reacción después de 30 minutos al agregar HCl. Se midió la absorbancia a 450 nm con 595 nm como longitud de onda de referencia. Todas las cepas se trataron en paralelo.

La Figura 13b revela que ambas cadena pesada y cadena ligera se expresaron mediante la construcción de cistrón múltiple en *Enterococcus faecium*, que lleva a la secreción de Fab anti-TNF de CDP870 funcional.

Ejemplo 12: Anti-hTNF que produce bacterias de *L. lactis* (de acuerdo con la invención) protege contra el daño intestinal inducido por hTNF en ratones A20IEC-KO.

15 Generación de ratones deficientes en A20 específicos de tejido.

Los ratones transgénicos A20/tnfai3 condicionales, en los que los exones IV y V del gen tnfai3 están flanqueados por dos sitios LoxP, se generaron como se describe (Piguet et al., 1999, Lab Invest 79, 495-500). Se cruzaron ratones A20 floxed con ratones transgénicos Villin-Cre que generaban ratones transgénicos A20 específicos a IEC (A20<sup>IEC-CO</sup>) (Madison et al., 2002, J Biol Chem 277, 33275-33283). Los experimentos se realizaron sobre ratones retrocruzados en el fondo genético C57BL/6 durante por lo menos cuatro generaciones.

Toxicidad de TNF in vivo.

Se inyectaron ratones i.p. con diferentes dosis de hTNF (50, 10, 8, 6, 4 y 2 µg de hTNF/20 g de peso corporal). El hTNF recombinante derivado de *E. coli* tenía una actividad específica de 6.8 X 10<sup>7</sup> IU/mg. El TNF humano se produjo y purificó a la homogeneidad en nuestro laboratorio, y los niveles de endotoxina no excedieron 1 ng/mg de proteína. La inyección de hTNF en ratones A20IEC-KO induce diversos cambios patológicos e inmunológicos que son indicativos de daño intestinal. La dosis baja de hTNF no induce efectos sistémicos graves y letalidad, pero induce la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que se puede medir tanto en el suero como en los homogeneizados del tejido intestinal. Los ratones se sacrificaron después de 4 o 5 h para análisis histológico. Para estudios terapéuticos, ratones A20<sup>IEC-CO</sup> recibieron bacterias *L. lactis* que producen anti-TNF (de acuerdo con la invención) por sonda oral 5 veces (5x10<sup>10</sup> CFU con rango de 30 min) antes de una inyección intraperitoneal con hTNF (2 µg y 6 µg de hTNF/20 g de peso corporal). Los grupos de control se trataron con la cepa MG1363 de *L. lactis* original o con el medio bacteriano BM9T (vehículo). Adicionalmente, un grupo de control positivo se trató con una única inyección de Remicade (30 mg/kg). Las temperaturas corporales se monitorizaron cada hora.

Preparación de muestra de tejido

35 Los segmentos colónicos e ileales recién aislados se lavaron con PBS para eliminar el contenido fecal y posteriormente se lavaron con formalina (formaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) y se fijaron mediante incubación durante la noche en un exceso de 10 veces de formalina a 4 °C. Se eliminó la formalina y los intestinos se lavaron dos veces con PBS antes de la incorporación en cera de parafina utilizando métodos estándar.

Histología.

40 Las secciones tisulares de 4 µm se cortaron y tiñeron con hematoxilina/eosina utilizando técnicas estándar. Para las tinciones combinadas de Alcian Blue (AB) y PAS, las secciones desparafinadas se hidrataron en agua destilada y se incubaron en Alcian Bleu durante 20 min. Las secciones se incubaron posteriormente en ácido peryódico al 1% durante 10 min, seguido de incubación en reactivo de Schiff durante 10 min. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. La detección de fosfatasa alcalina se realizó mediante la incubación de secciones de tejido desparafinado e hidratado en solución NBT/BCIP en la oscuridad (70 µl de NBT + 70µl de BCIP + 4860 µl de tampón A, NBT = solución de cloruro de tetratzolio Nitroblue al 1.5% en dimetil formamida de 70%, BCIP = 5-bromo-4-Cloro-3-indolil fosfatasa al 1% en dimetilformamida al 100%, Tampón A = TrisHCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 0.05 M, pH 9.5). Para la inmunquímica, las secciones se desparafinaron y se incubaron en solución de recuperación de antígeno Dako y se hirvieron durante 20 minutos en una unidad de cocción de células Pick y se enfriaron durante 2.5 h. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó al sumergir portaobjetos en tampón de bloqueo de peroxidasa (ácido cítrico 0.040 M, hidrogenofosfato de sodio 0.121 M, azida de sodio 0.030 M, peróxido de hidrógeno al 0.5%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 1% en PBS) a los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron anticuerpos primarios (anti-lisozima de conejo, dilución 1: 1.750 - Dako, anti- mucina 2 de conejo, 1:500 22) en tampón de bloqueo y las secciones de tejido se incubaron durante la noche. Se agregó anticuerpo secundario (anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante, Envision) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La peroxidasa se detectó al agregar sustrato de ácido diaminobuterico (DAB) durante 10 minutos a temperatura ambiente y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 2

minutos. La medición microscópica de radios de gránulo de células de Paneth se realizó con el software Leica Image manager 500.

Cuantificación de citoquinas.

5 Las citoquinas y las quimiocinas en homogeneizados de suero y tejido se cuantificaron mediante kits Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences) en un citómetro FACS Calibur equipado con software CellQuest Pro y CBA (BD Biosciences).

PCR cuantitativa en tiempo real.

10 Los segmentos ileales de 5 cm de largo se aislaron recientemente y se lavaron con PBS para eliminar el contenido fecal. Se ligó un extremo y los segmentos se llenaron con tampón de lisis de ARN (kit Aurum Total RNA Mini, Bio-Rad Laboratories) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. El ARN se purificó a partir de la solución de lisado utilizando el kit Aurum Total RNA Mini (Bio-Rad Laboratories). La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc de iScript (Bio-Rad Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 10 ng de ADNc para PCR cuantitativa en un volumen total de 10 µl con Mezcla Maestra LightCycler 480 SYBR Green I (Roche) y cebadores específicos en un LightCycler 480 (Roche). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado. Se utilizaron los siguientes cebadores específicos de ratón: ubiquitina directa, 5'-AGGTCAAACAG- GAAGACAGACGTA-3' (SEQ ID NO: 14); y ubiquitina inversa, 5'-TCACACCCAAGAACAAGCACA-3' (SEQ ID NO: 15). Lisozima-P directa, 5'-GCCAAGGTCTAACAATCGTTGTGAGTTG-3' (SEQ ID NO: 16); Lisozima-P inversa, 5'-CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG-3' (SEQ ID NO: 17); Criptidina-1 directa, 5'-TCAAGAGGCTGCAAAGGAAGAGAAC-3' (SEQ ID NO: 18); Criptidina-1 inversa, 5'-TGGTCTCCATGTTTCAGCGACAGC-3' (SEQ ID NO: 19).

Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como la media ± EEM. La significancia estadística entre los grupos experimentales se evaluó utilizando una prueba t de Student de dos muestras no pareada.

25 Caracterización de bacterias *L. lactis* que producen anti-hTNF para proteger contra alteraciones patológicas e inmunológicas inducidas por hTNF en ratones A20IEC-KO.

30 Ambos grupos de control inyectados con 2 µg de hTNF mostraron una caída más drástica de la temperatura corporal en comparación con los ratones A20IEC-KO tratados con bacterias anti-hTNF que producen *L. lactis* (Figura 14a, panel izquierdo). El efecto protector del tratamiento con sAGX0220 observado en ratones tratados con 2 µg de hTNF ya no se pudo observar cuando a los ratones se les inyectó una mayor concentración de hTNF (6 µg), mientras que el tratamiento con Remicade evidentemente tuvo un efecto protector (Figura 14a, panel derecho). El pretratamiento con sAGX0220 redujo significativamente los niveles de MCP-1, KC e IL-6 en homogenados ileales y de colon y en suero de ratones tratados con 2 µg de hTNF, en comparación con ratones tratados con vehículo (Figura 14b, c). Sin embargo, hubo una reducción comparable en los ratones tratados con la cepa MG1363 de *L. lactis* parental, lo que indica que la administración de bacterias sobre sí misma ya puede tener un efecto protector probiótico. Los ratones estimulados con 6 µg de hTNF mostraron una reducción similar en los niveles de citoquinas y citoquinas tisulares y séricas tras el pretratamiento con sAGX0220, en la misma medida que lo hace Remicade (figura 14d, e). En este contexto, sin embargo, el efecto protector de la cepa MG1363 parental se pierde principalmente (figura 14d, e).

Ejemplo 13: Inmunización pasiva contra la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* con anticuerpos neutralizantes de toxinas localmente producidos y secretados a través de *Lactococcus lactis*.

40 a) Síntesis génica de VLCL y VHCH 1 de mAb neutralizante toxina de *C. difficile* A y toxina B de *C. difficile*

45 La síntesis del gen de novo (optimizado para el uso del codón de *L. lactis*) se realiza en base a la información de la secuencia de aminoácidos VH y VL de acuerdo con un método de rutina (Stemmer et al., Gene 1995; 164 (1): 49-53). Este método utiliza oligonucleótidos de 40 mer sintéticos que abarcan toda la cadena codificadora así como la cadena no codificante, de tal forma que cada oligonucleótido de la cadena codificante será 100% complementario con respectivamente los últimos y los primeros 20 pares de bases de dos oligonucleótidos consecutivos en la cadena no codificante, y viceversa.

La información genética que codifica el líder de la secreción de la proteína de 45 kDa secretada no identificada de *L. lactis* (Usp45) se agrega al extremo 5' de los genes VLCL y VHCH1.

50 Para garantizar la expresión coordinada, estos genes sintéticos VLCL y VHCH1 se colocan en tándem y se unen mediante la región intergénica de rpmD. Esto conduce a la formación de operones VLCL>>VHCH1 funcionales. También se construyen variantes de los genes sintéticos descritos anteriormente que también codifican las etiquetas de péptido E y FLAG de terminal C. Esto visualiza productos de tamaño completo y/o posible degradación, y permite la verificación del ensamblaje de cadenas ligeras y cadenas pesadas y unión de toxinas.

Las construcciones génicas resultantes serán verificadas en secuencia.

b) Construcción de cepas de *L. lactis* que secretan el Fab neutralizante de toxina A/B: integración en el locus Usp45

Esta tarea consiste en las siguientes etapas:

1. Construcción de vectores de integración para la integración corriente abajo del locus usp45 de

- VLCL>>VHCH1 de Mab que neutraliza toxina A de *C. difficile*
- 5 • VLCL>>VHCH1 de Mab que neutraliza toxina B de *C. difficile*
- variantes etiquetadas 3' E y FLAG de los anteriores

Los operones VLCL>>VHCH1 sintéticos están flanqueados en el extremo 5' por 1 kb del extremo 3' del gen de *L. lactis* usp45 seguido de la región intergénica rpIN. Los operones VLCL>>VHCH1 están flanqueados en el extremo 3' por un fragmento de 1 kb de la región de flanqueo corriente abajo 3' del gen de *L. lactis* usp45. Las construcciones se realizan al superponer la hibridación del ADN PCR. Los plásmidos resultantes se verifican en secuencia.

2. Los plásmidos de integración generados anteriormente se utilizan para la integración a través del acoplamiento traslacional al gen usp45 de MG1363 de *L. lactis*. La integración se realiza mediante recombinación homóloga doble en las regiones flanqueantes 5' y 3' (correspondientes a regiones de flanqueo 1 kb el extremo 3' de usp45), y se verifica mediante PCR y secuenciación de ADN.

c) Construcción de cepas de *L. lactis* que secretan Fab que neutraliza toxina A/B: integración en el locus enoA

Esta tarea consiste en las siguientes etapas:

1. Construcción de vectores de integración para la integración corriente abajo del locus enoA de

- VLCL>>VHCH1 de Mab que neutraliza toxina A de *C. difficile*
- VLCL>>VHCH1 de Mab que neutraliza toxina B de *C. difficile*
- 20 • variantes etiquetadas 3' E y FLAG de los anteriores

Los operones VLCL>>VHCH1 sintéticos de la Tarea 7 están flanqueados en el extremo 5' por 1 Kb del extremo 3' del gen enoA de *L. lactis* seguido de la región intergénica rpIN. El operón VLCL>>VHCH1 está flanqueado en el extremo 3' por un fragmento de 1 Kb de la región de flanqueo corriente abajo 3' del gen enoA de *L. lactis*. Las construcciones se realizan al superponer hibridación de ADN PCR. Los plásmidos resultantes se verifican en secuencia.

2. Los plásmidos de integración generados anteriormente se utilizan para la integración a través del acoplamiento traduccional al gen enoA de MG1363 de *L. lactis*. La integración se realiza por recombinación homóloga doble en las regiones de flanqueo 5' y 3' (correspondientes a regiones de 1 kb que flanquean el extremo 3' de enoA), y se verifica por PCR y secuenciación de ADN.

d) Establecimiento de un modelo de hámster compatible con TopAct™ de CDAD

El modelo de hámster de CDAD es un modelo bien establecido para el estudio de la diarrea y colitis asociadas a antibióticos inducidas por toxinas. El modelo más extensamente estudiado de infección por *C. difficile* en hámsteres es el principal modelo de inoculación. Brevemente, los hámsteres se tratan previamente con clindamicina (10-30 mg/kg) orogástricamente 24 horas antes de la administración de esporas de *C. difficile* para alterar la flora colónica normal en el hámster. Las esporas de *C. difficile* (por ejemplo, 100 esporas de la cepa 630 o B1, véase Goulding et al., Infect Immun 2009; 77 (12): 5478-5485) se administran orogástricamente, y se observan los hámsteres (modelo de inoculación primario CDAD). Normalmente, el 100% de los hámsters sucumbe a la enfermedad entre 36 y 72 horas después de la administración de la espora. Antes de la mortalidad, los síntomas de la enfermedad incluyen diarrea y pérdida de peso. En general, los síntomas son mucho más graves que aquellos observados en humanos, pero el modelo de hámster responde a las maniobras terapéuticas utilizadas en la enfermedad clínica, como el tratamiento con vancomicina, y por lo tanto se utiliza ampliamente en el estudio de CDAD.

Con el fin de simular el control de recaída CDAD, se utiliza un modelo de hámster de enfermedad primaria modificado. La vancomicina protege a los hámster de la enfermedad de *C. difficile*, como lo hace en los humanos. Cuando se interrumpe el tratamiento con vancomicina, los hámster recaen con una enfermedad grave, pero la tasa de ataque varía. Brevemente, los hámsteres reciben una dosis única de clindamicina seguida de la administración orogástrica de las esporas de la cepa B1 de *C. difficile* 1 día después. El tratamiento con vancomicina comenzó el día de la exposición a la espora o 24 horas después y se continuó diariamente durante dos a cuatro días posteriores (modelo de recaída CDAD). Este protocolo se puede optimizar aún más para garantizar la recaída después del rescate con vancomicina.

Para evaluar el beneficio del Fab que neutraliza toxinas, liberado por *L. lactis* en el intestino, para prevenir la mortalidad en el modelo primario y/o de recaída de infección en el hámster, es importante documentar el impacto de clindamicina y

vancomicina sobre el crecimiento y la capacidad de producción de Fab de *L. lactis*. Por lo tanto, se realizan estudios in vitro/in vivo para determinar la viabilidad y actividad metabólica de las cepas de *L. lactis* que secretan Fab.

- 5 • Evaluación in vitro: la producción de Fab (mediante ELISA) y el crecimiento (mediante placas) de cultivos de *L. lactis* complementados con clindamicina/vancomicina se compara con un cultivo libre de antibióticos y un cultivo suplementado con cloranfenicol (Cm) a 5 µg/ml. A esta concentración, Cm es un inhibidor conocido de la síntesis y crecimiento de proteínas, al cual *L. lactis* es sensible.
  - Evaluación in vivo: la producción de Fab (a través de ELISA) y la viabilidad (a través de placas) se determina en el intestino delgado/grueso después de la alimentación por sonda oral de hámsteres y el tratamiento concomitante con diferentes dosis de clindamicina/vancomicina.
- 10 Estas evaluaciones permiten diseñar y adaptar el modelo de hámster (inoculación y recaída) de CDAD que es adecuado para la evaluación del sistema de administración de *L. lactis* por sus efectos preventivos y curativos: esto es utilizando concentraciones (inferiores) de clindamicina (y vancomicina) y/o un cóctel diferente de antibióticos que demuestran susceptibilidad a la infección por *C. difficile* sin efecto negativo sobre la viabilidad y actividad metabólica de *L. lactis*.

e) Validación del modelo de hámster de CDAD.

- 15 En el modelo de inoculación primario del hámster, los hámsteres dorados sirios (70 a 80 g) reciben diferentes dosis orales (qd, bid o tid) de *L. lactis* que secreta toxina A/B seleccionada (antitoxina A y antitoxina B sola y combinadas) o 1 ml de mAb anti-toxina A/B (como control positivo) por vía intraperitoneal durante 4 días comenzando 3 días antes de la administración de esporas de *C. difficile*. La clindamicina (dosis u otro cóctel de antibióticos como se definió anteriormente) se administra orogástricamente 24 horas antes de la exposición a esporas de *C. difficile* utilizando una
- 20 aguja estándar de alimentación de pequeños animales. Los animales se observan por morbilidad y mortalidad, los tejidos intestinales se puntúan por daño histológico y macroscópico, y se determina la producción de toxina C *difficile* en el contenido luminal y las heces.

- 25 En el modelo de recaída de hámster, los hámsteres dorados sirios (70 a 80 g) reciben clindamicina (dosis u otro cóctel de antibióticos como se define anteriormente) de forma orogástrica y 24 horas después se inoculan con esporas B1 de *C. difficile* orogástricamente. En el momento de la administración de la espora o 24 horas después, el tratamiento con vancomicina (la dosis como se define anteriormente) se inicia de forma orogástrica y continúa diariamente durante un total de 2-4 días. A partir de 1, 2, 3, 4 o 5 días después del tratamiento con vancomicina, diferentes dosis orales (qd, bid o tid) de *L. lactis* que secreta antitoxina A/B seleccionada (antitoxina A y antitoxina B sola y combinadas) o 1 ml de mAb anti-toxina A/B (como un control positivo, intraperitonealmente) se administra durante un total de 5-10 días. Los
- 30 animales se observan por morbilidad y mortalidad, los tejidos intestinales se puntúan por daño histológico y macroscópico, y se determina la producción de toxina de *C. difficile* en el contenido luminal y las heces.

Se puede concluir que las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención se pueden utilizar eficazmente para inmunizar contra CDAD. En particular, las bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención pueden prevenir la aparición de CDAD, prevenir la recaída de CDAD, así como tratar la CDAD.

- 35 Ejemplo 14: Polvo de enjuague bucal para reconstitución:

La sustancia de fármaco (DS) de una formulación de enjuague bucal es un polvo liofilizado homogéneo de una cepa modificada de acuerdo con la invención y se mezcla con crioprotectores (dextrina, sorbitol y glutamato de sodio).

- 40 El proceso de producción de la sustancia del fármaco incluye las siguientes etapas sucesivas: fermentación, concentración de biomasa (por diafiltración o centrifugación), formulación con crioprotectores, llenado en bandejas adecuadas y liofilización a granel. La homogeneización y tamizado de la torta liofilizada se realiza para producir un polvo homogéneo (la sustancia del fármaco) adecuado para mezclar con el excipiente y llenarlo en la forma de dosificación farmacéutica deseada.

- 45 El polvo de producto de fármaco (DP) de enjuague bucal para la reconstitución consiste en la bacteria *L. lactis*, secada por congelación mezclada con manitol como excipiente y presentada como un polvo (comprimido). La formulación clínica es una administración tópica oral en forma de enjuague bucal. Esta suspensión de enjuague bucal se prepara mediante la reconstitución del DP en una solución seleccionada.

El proceso de producción del polvo de enjuague bucal para la reconstitución incluye una serie de etapas sucesivas:

- Mezclar DS a granel con manitol,
- comprimir de 500 mg de la mezcla de polvo DP en comprimidos de polvo dispersables de 500 mg,
- 50 • cargar el polvo comprimido en viales de vidrio,
- cerrar los viales con tapones de rosca a prueba de manipulaciones y a prueba de niños, y
- empacar viales en bolsas de aluminio (Alu).

## Ejemplo 15: Expresión bicistrónica de CDP870

Se generaron construcciones de expresión de cistrón dobles con cadena pesada y cadena ligera de Fab de CDP870 anti-TNF. Todas las unidades de expresión se ubicaron sobre el cromosoma bacteriano.

5 Figura 15 A, descripción esquemática de las unidades de expresión anti-TNF de CDF870 en diversas cepas: Fab de  
 10 cadena ligera y pesada de CDP870 se fusiona a secuencias que codifican el líder de secreción *usp45* (SS::CDP870  
 VLCL y SS::CDP870 VHCH1) que se insertaron como un segundo y tercer cistrón corriente abajo desde *usp45*  
 (sAGX0309, sAGX0319), *enoA* (sAGX0275) y *gapB* (sAGX0323, sAGX0326). En estas cepas, se utilizó *rpmD* para  
 acoplar genes SS::CD870 a *usp45*, *enoA* o *gapB* respectivamente. Para evitar la inestabilidad genética, genes de  
 cadena ligera y pesada se acoplaron a través de la región intergénica que precede *rplN*. En la figura 15B y C 4 se  
 analizaron y reportaron clones idénticos de sAGX0326 (clon 1-4). Las cepas se procesaron en paralelo durante todos  
 los experimentos.

15 Para la visualización cuantificación de secreción de anti-hTNF de CDP870, se inocularon cepas de colonia única en 10  
 ml de GM17T (Difco™M17, BD, Sparks, MD, + glucosa al 0.5% + timidina 200 µM) y se hicieron crecer durante 16 horas  
 a 30 °C. Las Bacterias de estos cultivos nocturnos saturados se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante  
 10 minutos y se resuspendieron en 10 ml de medio GM17T fresco y se hicieron crecer durante 2 horas a 30 °C. Las  
 bacterias y sobrenadantes de cultivo crudos se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. Los  
 sobrenadantes crudos de todas las cepas se prepararon en paralelo y se dividieron por cepa para análisis (Figura 15B y  
 C).

20 El contenido total de proteína de volúmenes de 5 ml de sobrenadantes de cultivo crudos se extrajo con fenol, se  
 precipitó con etanol y se resuspendió en tampón de muestra SDS-PAGE. Equivalentes de 1 ml de sobrenadantes de  
 cultivo crudos se analizaron mediante transferencia western utilizando Fab antihumano de cabra como antisuero  
 primario y se revelaron mediante tinción anti-cabra AP y NBT/BCIP de conejo (Figura 15 B; las cepas se indican a la  
 derecha de los respectivos carriles).

25 Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se ensayaron para la presencia de  
 actividad de unión a hTNF. Esto se hizo mediante ELISA directa utilizando hTNF como proteína de captura con Cimzia  
 como un estándar de referencia. Las porciones de VLCL se detectaron mediante antisuero IgG antihumano de cabra y  
 se revelaron mediante antisuero anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La actividad de HRP se  
 midió mediante ensayo colorimétrico. Los datos se presentan en la Figura 15C, las cepas se indican debajo de las  
 barras respectivas.

30 La Figura 15 (B y C) revela que ambas cadena pesada y cadena ligera se expresaron altamente por las construcciones  
 de cistrón dobles, que llevan a niveles altos de Fab anti-TNF de CDP870 funcional. La Figura 15 (B y C) revela que la  
 expresión anti- TNF de CDP870 aumenta ligeramente cuando genes de cadena pesada y ligera se insertaron como un  
 segundo y tercer cistrón corriente abajo desde *enoA* cuando se compara con la inserción corriente abajo de *usp45*. La  
 Figura 15 (B y C) revela adicionalmente que la expresión de anti-TNF de CDP870 se aumentó sustancialmente cuando  
 genes de cadena pesada y ligera se insertaron como un segundo y tercer cistrón corriente abajo desde *gapB* cuando se  
 compara con la inserción corriente abajo de *usp45* o *enoA*.

35 Para la determinación de la capacidad de neutralización de hTNF específico (actividad biológica por cantidad de  
 proteína de unión a TNF), se inocularon cepas de colonia única en 5 ml de GM17T y se hicieron crecer durante 16 horas  
 a 30 °C. Las bacterias de estos cultivos nocturnos saturados se recolectaron mediante centrifugación a 3220 x g durante  
 40 10 minutos y se resuspendieron en 5 ml de medio BM9T y se hicieron crecer durante 2 horas a 30 °C. Las bacterias  
 sobrenadantes de cultivo crudos se separaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 10 minutos. Los  
 sobrenadantes crudos de cepas que llevan las cepas individuales se prepararon en paralelo y se dividieron por cepa  
 para análisis (Figura 15D y E).

45 Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se ensayaron para la presencia de  
 actividad de unión a TNF. Esto se hizo mediante ELISA directa utilizando TNF humano como proteína de captura con  
 Cimzia como un estándar de referencia. Las porciones de VLCL se detectaron mediante antisuero IgG antihumano de  
 cabra y se revelaron mediante antisuero anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La actividad de  
 HRP se midió mediante ensayo colorimétrico. Todas las cepas se trataron en paralelo. Los datos se presentan en la  
 Figura 15D, las cepas se indican debajo de las barras respectivas.

50 Los sobrenadantes crudos de cepas que llevan las construcciones individuales se ensayaron para la presencia de  
 actividad de unión a TNF. Esto se realizó mediante incubación de células WEHI susceptibles a hTNF con TNF humano y  
 adición de anti- TNF. El anti-TNF depurará el hTNF y protegerá las células WEHI de la muerte celular. Una serie de 1/2  
 dilución de los sobrenadantes crudos así como también estándar de referencia (Cimzia a 63 ng/ml) se agregó a los  
 cultivos celulares sometidos a hTNF. Se determinó el impacto sobre la muerte celular. Los datos se presentan en la  
 55 Figura 15E, las cepas se indican debajo de las barras respectivas.

La Figura 15D revela que ambas cadena pesada y cadena ligera se expresaron altamente por las construcciones de  
 cistrón dobles, que llevan a niveles altos de Fab anti-TNF de CDP870 funcional. La Figura 15D revela adicionalmente  
 que la expresión de anti-TNF de CDP870 sustancialmente aumenta cuando genes de cadena pesada y ligera se

insertaron como un segundo y tercer cistrón corriente abajo desde gapB cuando se compara con la inserción corriente abajo de usp45.

La Figura 15D y E muestran esa capacidad de neutralización del TNF específica (actividad biológica por cantidad de proteína de unión a TNF) de anti-TNF de CDP870 en los sobrenadantes de cultivo crudos de cepas sAGX0323 y sAGX0326 que es idéntica a aquella de Cimzia.

Ejemplo 16: Eficacia de *L. lactis* que secreta el fragmento Fab anti-hTNF $\alpha$

La configuración experimental se basa en el ratón Tg1278TNFko, un ratón transgénico con expresión de TNF humano regulada normalmente en ausencia de TNF de ratón (Keffer y col., EMBO.J 10, 4025-4031, 1991). La colitis fue inducida por la inoculación de administración rectal de TNBS al 4% en etanol al 40% después de una presensibilización cutánea. Brevemente, los ratones se sensibilizaron 7 días (día -7) antes de la exposición intrarrectal al aplicar 1 volumen de TNBS al 5% + 4 volúmenes 4:1 de acetona: aceite de oliva a un área de piel afeitada de 1.5 x 1.5 cm en la espalda. El día de la inoculación (Día 0), los ratones se anestesiaron primero con ketamina/xilazina, posteriormente se administraron 100  $\mu$ l de TNBS al 4%/EtOH al 40% por el recto mediante un catéter flexible insertado a 4 cm en el recto. Para garantizar la distribución equitativa del enema dentro del colon, los ratones se mantuvieron en posición vertical durante 30 segundos directamente después de la inoculación rectal.

El tratamiento se inició 1 día antes de la exposición rectal con TNBS (día -1) y se continuó durante otros 4 días (día +3). Tres grupos de ratones recibieron inoculaciones intragástricas una vez al día con  $10^{10}$  CFU de MG1363 (control negativo),  $10^{10}$  dCFU de SAGX0309 o 10  $\mu$ g de Cimzia (control positivo). Comenzando desde el día 0 y diariamente, los ratones se monitorizaron por el peso corporal, la morbilidad y la supervivencia. El día +3 se sacrificaron los ratones y se recogieron muestras de colon y suero para análisis de histología (colon) y citoquina (colon y suero).

El tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención (cepa sAGX0309 de *L. lactis* que secreta anti-de hTNF) dio como resultado una supervivencia mejorada (Figura 16 y Tabla 7), en comparación con la cepa MG1363 de *L. lactis* de tipo silvestre y sorprendentemente incluso un mayor porcentaje de supervivencia que los ratones tratados con Cimzia.

Tabla 7

SUPERVIVENCIA	sAGX0309 de <i>L. lactis</i>	MG1363 de <i>L. Lactis</i>	Cimzia
Día 1	100% (7/7)	100% (9/9)	100% (9/9)
Día 2	86% (6/7)	89% (8/9)	89% (8/9)
Día 3	86% (6/7)	56% (5/9)	78% (7/9)

El peso corporal de los ratones también se siguió durante el tratamiento, y se representa en la Figura 17. A partir de la Figura 17, es evidente que la pérdida de peso es menor después del tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención en comparación con el tratamiento con Cimzia.

El estado histológico del colon también se analizó y se atribuyó un puntaje histológico de acuerdo con la Tabla 8. Los resultados se indican en la Figura 18. A partir de la Figura 18, es evidente una mejora significativa en el puntaje histológico y, por lo tanto, una patología colítica disminuida después del tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención.

Tabla 8

Puntuación histológica	Descripción
0	Sin inflamación sin daño epitelial
1	Inflamación en la mucosa alrededor de las bases de la cripta; sin daño epitelial
2	Inflamación en la submucosa; daño epitelial leve con pérdida de células caliciformes
3	Inflamación en la submucosa; pérdida local de la arquitectura de las criptas
4	Inflamación en la submucosa; pérdida de la arquitectura de las criptas en áreas extendidas de la mucosa

Finalmente, a partir de la Figura 19, es evidente que el tratamiento con una cepa de acuerdo con una realización de la invención dio como resultado una supresión de la secreción de citoquina proinflamatoria colónica.

LISTADO DE SECUENCIA

- <110> Actogenix N.V.
- 5 <120> Sistema de expresión policistronica para bacterias
- <130> AGX-030-PCT
- <150> 11168495.7
- <151> 2011-06-01
- <150> 11173588.2
- 10 <151> 2011-07-12
- <160> 19
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 5
- 15 <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis
- <400> 1
- taatg 5
- <210> 2
- 20 <211> 9
- <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis
- <400> 2
- taatccatg 9
- 25 <210> 3
- <211> 16
- <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis
- <400> 3
- 30 taaggaggaa aaaatg 16
- <210> 4
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis
- 35 <400> 4
- taatagagga ggaaaatcgt g 21
- <210> 5

- <211> 24  
<212> ADN  
<213> Lactococcus lactis  
<400> 5
- 5 taagaagga gataagtaag aatg 24  
<210> 6  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Lactococcus lactis
- 10 <400> 6  
taaggaaagg ggaattaa catg 24  
<210> 7  
<211> 28  
<212> ADN
- 15 <213> Lactococcus lactis  
<400> 7  
taagcaaac taggaggaat atagcatg 28  
<210> 8  
<211> 5
- 20 <212> ADN  
<213> Enterococcus faecium  
<400> 8  
taatc 5  
<210> 9
- 25 <211> 17  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecium  
<400> 9  
taaggaggac aacaata 17
- 30 <210> 10  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecium  
<400> 10
- 35 taataggagg gaattca 18  
<210> 11  
<211> 24



<212> ADN  
<213> Enterococcus faecium  
<400> 11  
ttagaagaag gaggaatacc attc 24

5 <210> 12  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecium  
<400> 12

10 taaaagtta aggaaggagg gtcttactga 30  
<210> 13  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecium

15 <400> 13  
taatcaagta gaatctaca ggaggtgtct ttaa 34  
<210> 14  
<211> 24  
<212> ADN

20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 14  
aggtcaaaca ggaagacaga cgta 24

25 <210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>

30 <223> Cebador  
<400> 15  
tcacaccaa gaacaagcac a 21  
<210> 16  
<211> 28

35 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>

<223> Cebador  
<400> 16  
gccaaagtct aacaatcggt gtgagttg 28  
<210> 17  
5 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador  
10 <400> 17  
cagtcagcca gcttgacacc acg 23  
<210> 18  
<211> 25  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 18  
tcaagaggct gcaaaggaag agaac 25  
20 <210> 19  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
25 <223> Cebador  
<400> 19  
tggtctccat gttcagcgac agc 23

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una bacteria gram-positiva que comprende una unidad de expresión policistrónica, comprendiendo dicha unidad de expresión policistrónica un gen endógeno y uno o más genes exógenos, en la que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva.
- 10 2. Un ácido nucleico recombinante que comprende una unidad de expresión policistrónica, comprendiendo dicha unidad de expresión policistrónica un gen endógeno a una bacteria gram-positiva y uno o más genes exógenos a la bacteria gram-positiva, en el que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se controlan transcripcionalmente por un promotor endógeno a la bacteria gram-positiva, en el que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de enolasa (eno), un promotor usp45, un promotor gapB, un promotor pyk, un promotor rpmB, y un promotor rplS de dicha bacteria gram-positiva.
3. Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 2.
- 15 4. La bacteria gram-positiva de acuerdo con la reivindicación 1 o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho uno o más genes exógenos se acopla transcripcionalmente al extremo 3' de dicho gen endógeno.
5. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, en la que uno de dichos genes exógenos es el gen más 3' de la unidad de expresión policistrónica.
- 20 6. La bacteria gram-positiva de acuerdo con la reivindicación 1, o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho gen endógeno y dicho uno o más genes exógenos se acoplan transcripcionalmente mediante una región intergénica o regiones intergénicas activas en la bacteria gram-positiva, en la que dicha región intergénica o regiones intergénicas se seleccionan del grupo que consiste de:
- a) secuencias que comprenden o que consisten de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-13;
- 25 b) secuencias que exhiben un emparejamiento incorrecto o una eliminación o inserción de un nucleótido vs. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8;
- c) secuencias que exhiben uno, dos o tres emparejamientos incorrectos, o una eliminación o inserción de uno, dos o tres nucleótidos vs. SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; o
- 30 d) secuencias que exhiben uno, dos, tres o cuatro emparejamientos incorrectos o una eliminación o inserción de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos vs. SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
7. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la región o regiones intergénicas son endógenas a dicha bacteria gram-positiva.
8. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho promotor se selecciona de un promotor eno y un promotor gapB.
- 35 9. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha región intergénica se selecciona de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-13.
10. La bacteria gram-positiva de acuerdo con la reivindicación 1, o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho uno o más genes exógenos codifican un producto, cuyo producto es una proteína, polipéptido y/o péptido que tiene un efecto terapéutico o preventivo en un sujeto, un antígeno para inducir inmunidad o inmunotolerancia, un polipéptido terapéuticamente activo no vacunógeno, un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo tal como Fab, una proteína de fusión o una proteína multimérica.
- 40 11. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho uno o más genes exógenos codifican un anticuerpo de dominio único.
- 45 12. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho uno o más genes exógenos codifican un anticuerpo anti-TNFa, preferiblemente un fragmento de anticuerpo anti-TNFa, más preferiblemente un dominio variable de anticuerpo único anti-TNFa.
13. La bacteria gram-positiva o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, para uso como un medicamento, preferiblemente para uso en administración o suministro de dicho producto al sujeto.
- 50 14. La bacteria gram-positiva de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen endógeno se ubica en su sitio cromosómico nativo en la bacteria gram-positiva.

15. La bacteria gram-positiva de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el gen endógeno se acopla transcripcionalmente a uno o más genes exógenos al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos a dicho sitio, preferiblemente al integrar de forma cromosómica uno o más genes exógenos 3' del gen endógeno en dicho sitio.
- 5 16. Un ácido nucleico recombinante que comprende una región intergénica activa en una bacteria gram-positiva unida de forma operativa a un gen exógeno a dicha bacteria gram-positiva, en la que dicha región intergénica se selecciona del grupo que consiste de:
- a) secuencias que comprenden o que consisten de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-13;
- 10 b) secuencias que exhiben un emparejamiento incorrecto o una eliminación o inserción de un nucleótido vs. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8;
- c) secuencias que exhiben uno, dos o tres emparejamientos incorrectos, o una eliminación o inserción de uno, dos o tres nucleótidos vs. SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; o
- 15 d) secuencias que exhiben uno, dos, tres o cuatro emparejamientos incorrectos o una eliminación o inserción de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos vs. SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
17. El ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la región intergénica es una región intergénica endógena de dicha bacteria gram-positiva.
18. La bacteria gram-positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 14 o 15, o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 16, en la 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.
- 20 19. La bacteria gram-positiva o ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el gen exógeno que codifica V<sub>L</sub> o un fragmento funcional del mismo se acopla transcripcionalmente al extremo 3' del gen exógeno que codifica V<sub>H</sub> o un fragmento funcional del mismo.
- 25 20. La bacteria gram-positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 14 o 15, o el ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 16, en la que la bacteria gram-positiva es una bacteria de ácido láctico.
- 30 21. La bacteria gram-positiva de acuerdo con la reivindicación 20, en la que la bacteria de ácido láctico es *Lactococcus*, *Lactobacillus*, o *Enterococcus*, preferiblemente *Lactococcus lactis* o *Enterococcus faecium*, o en la que la bacteria gram-positiva es una *Bifidobacteria*.
22. Una composición farmacéutica que comprende la bacteria gram-positiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 14 o 15.

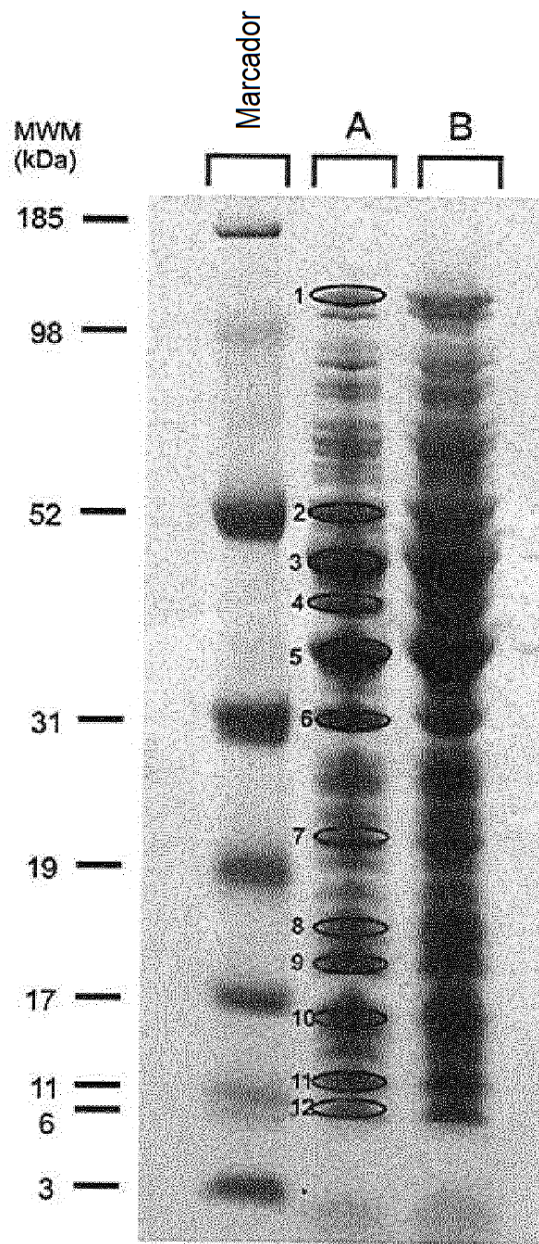


FIG 1

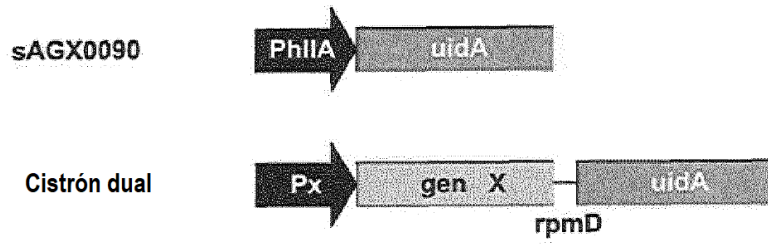


FIG 2

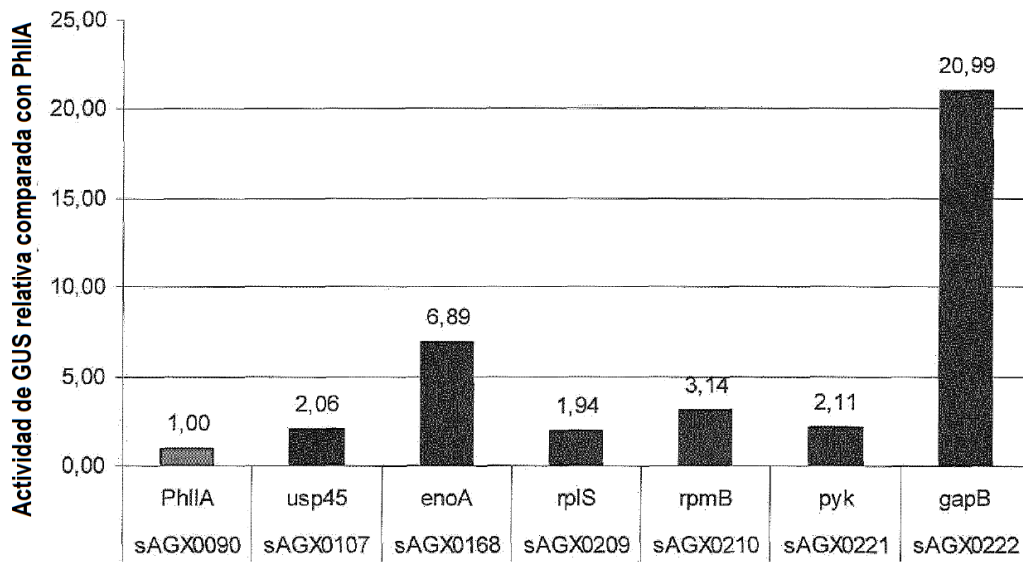
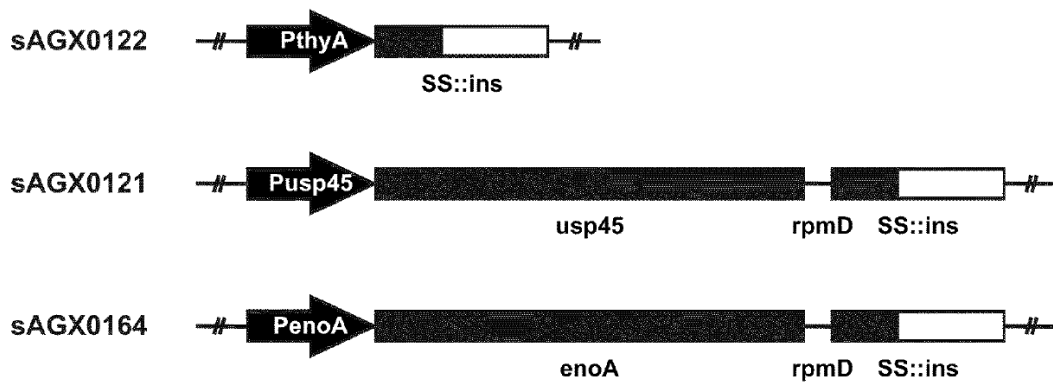


FIG 3

A



B

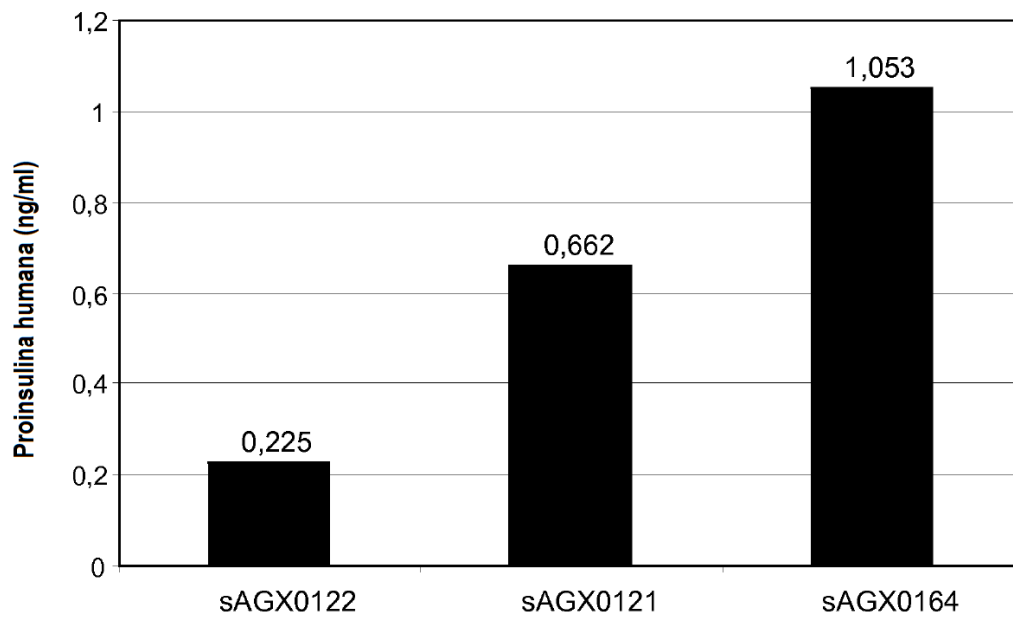
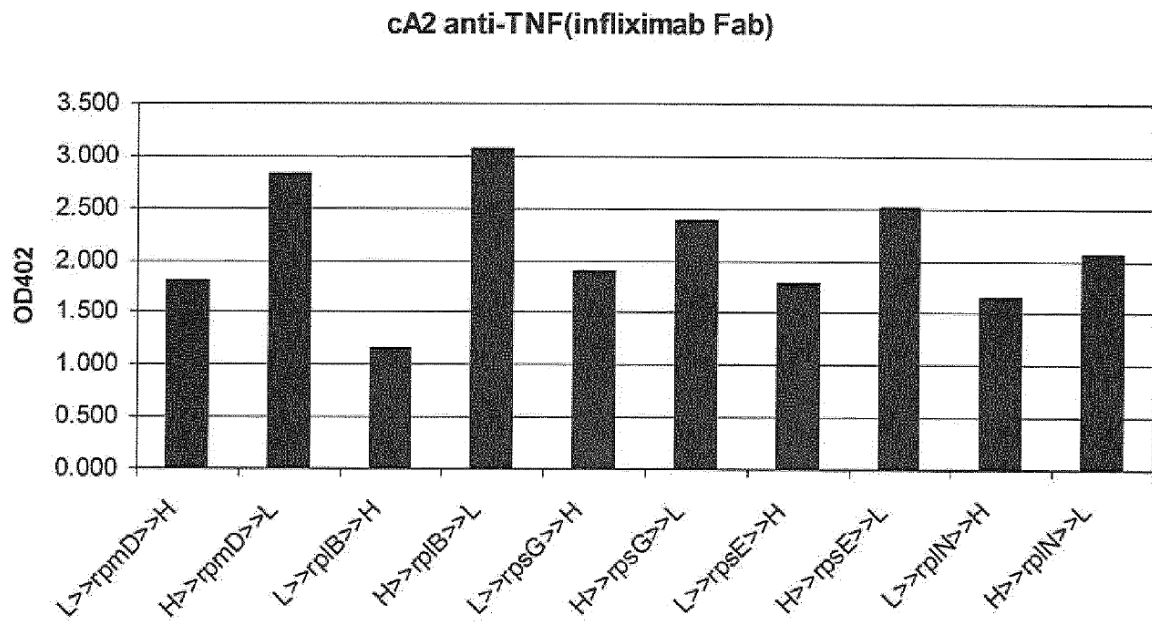


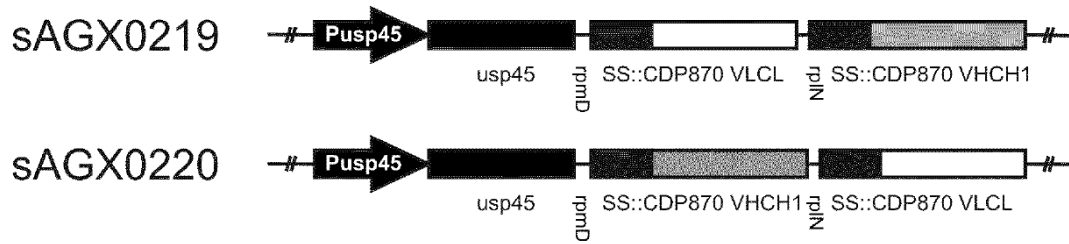
FIG 4



**FIG 5**



A



B

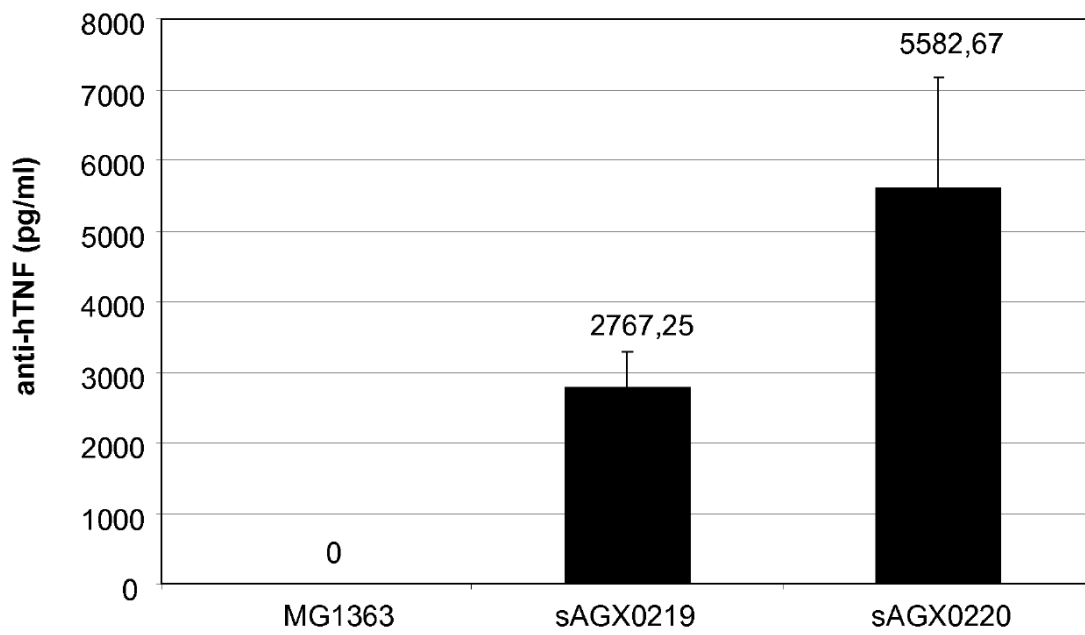
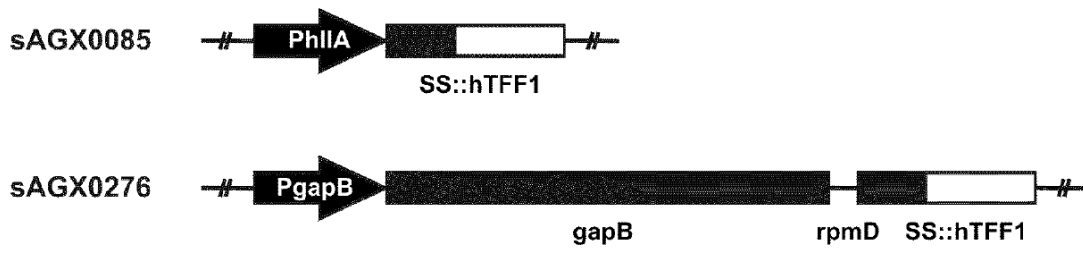


FIG 6

A



B

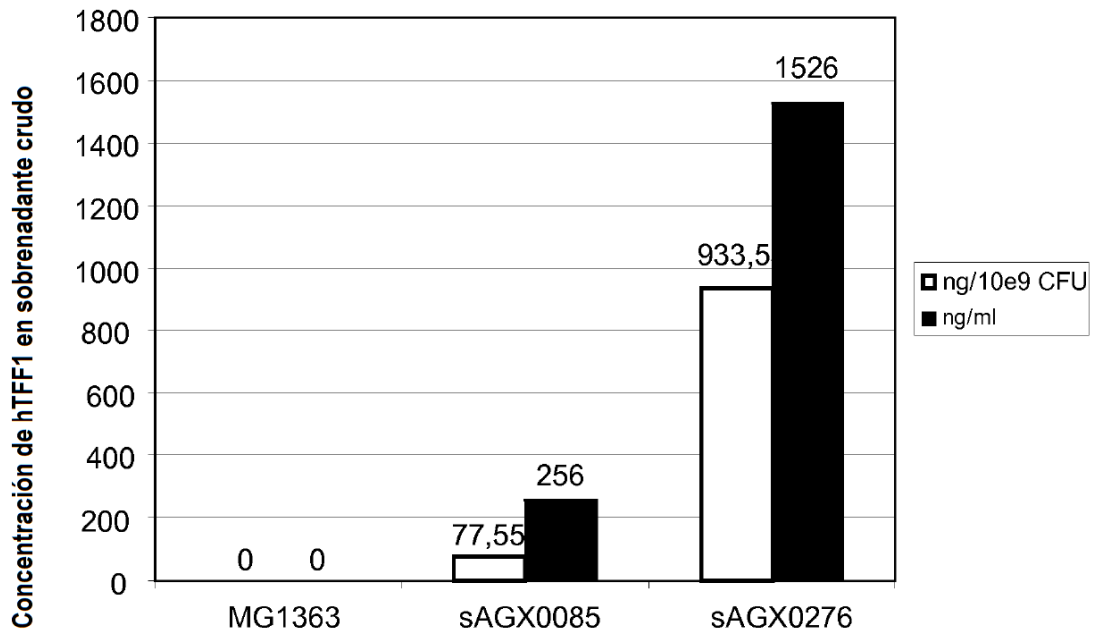
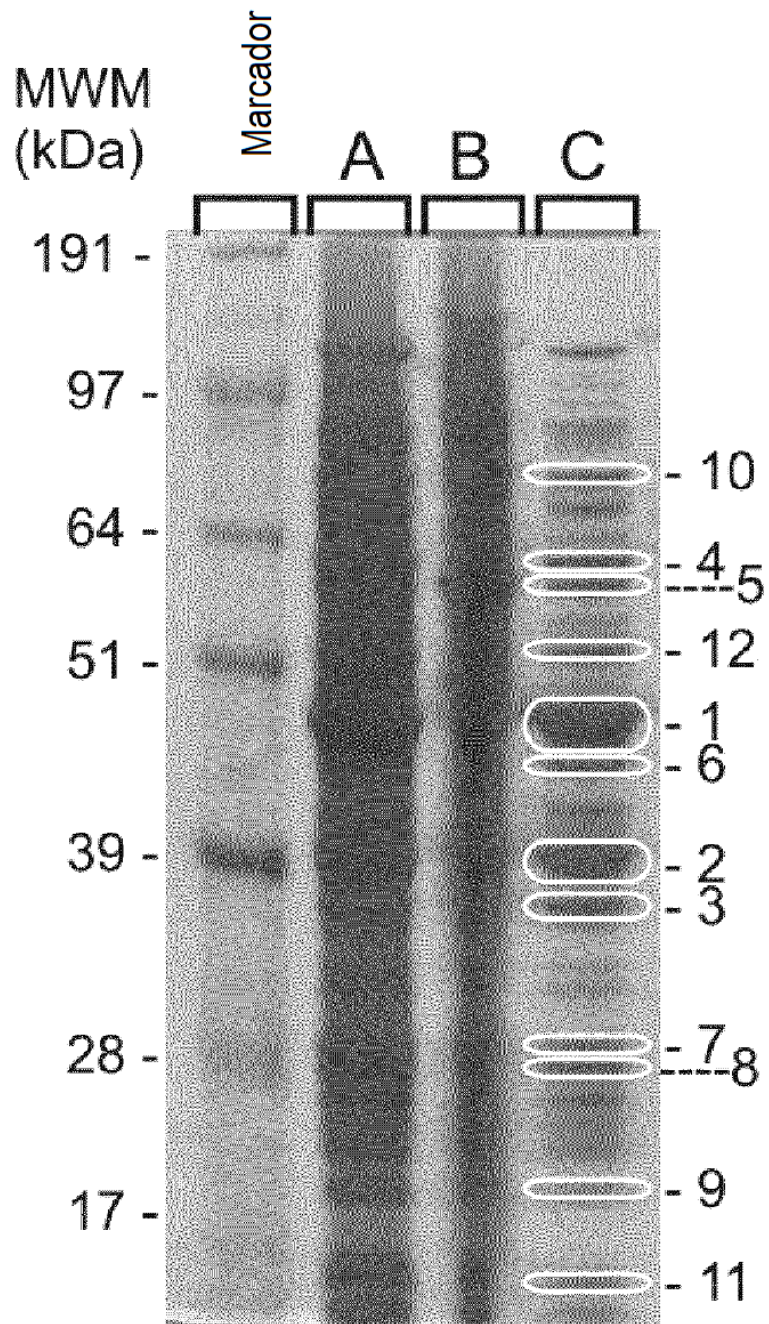
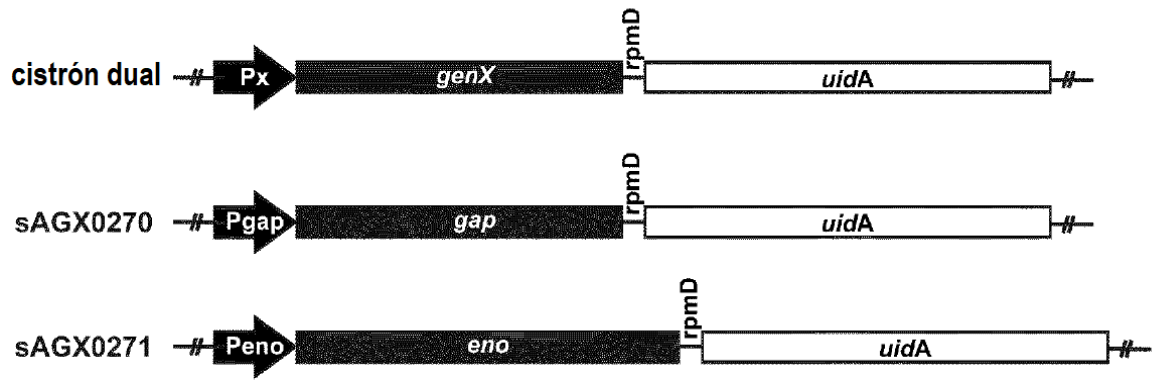


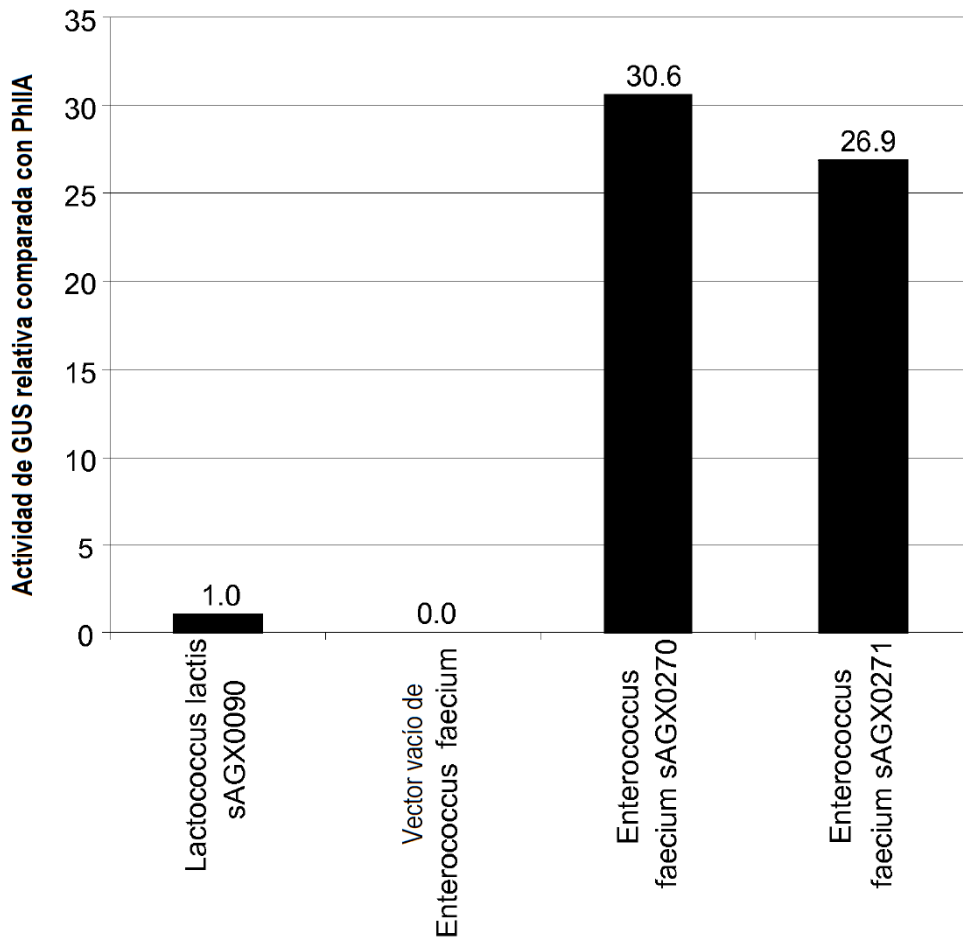
FIG 7



**FIG 8**



**FIG 9**

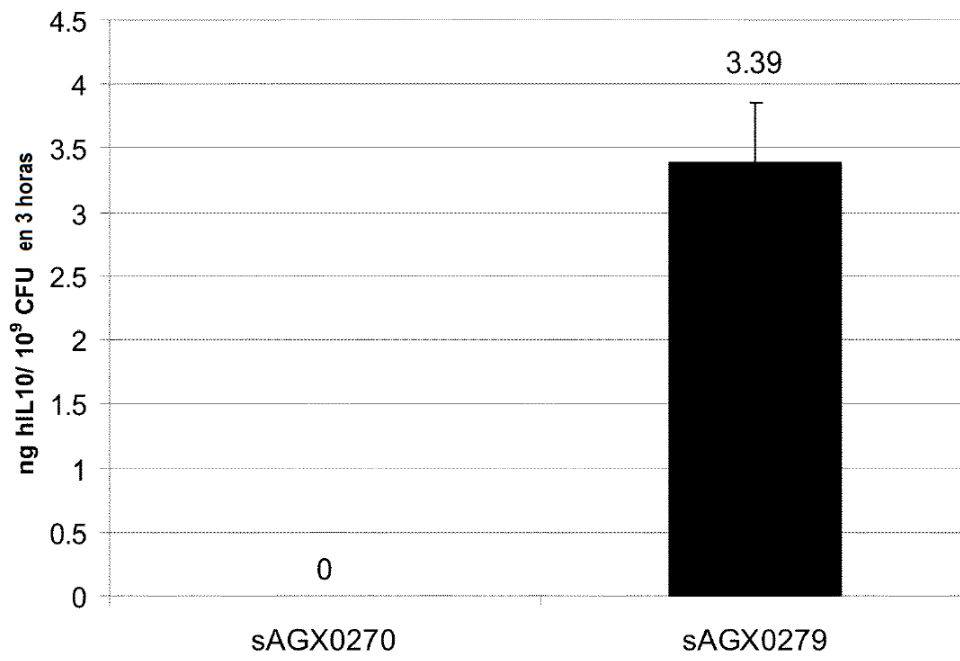


**FIG 10**

**A**



**B**

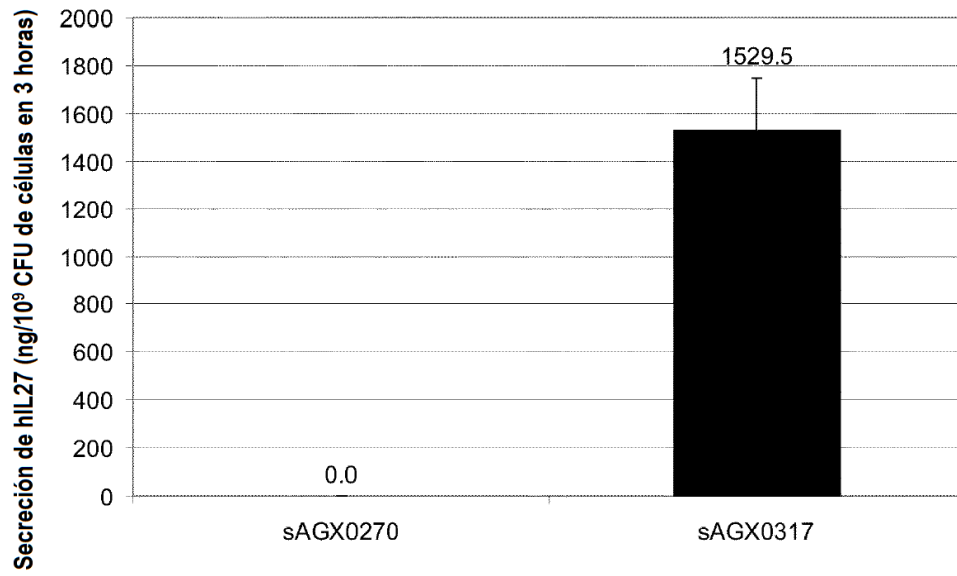


**FIG 11**

**A**



**B**



**FIG 12**

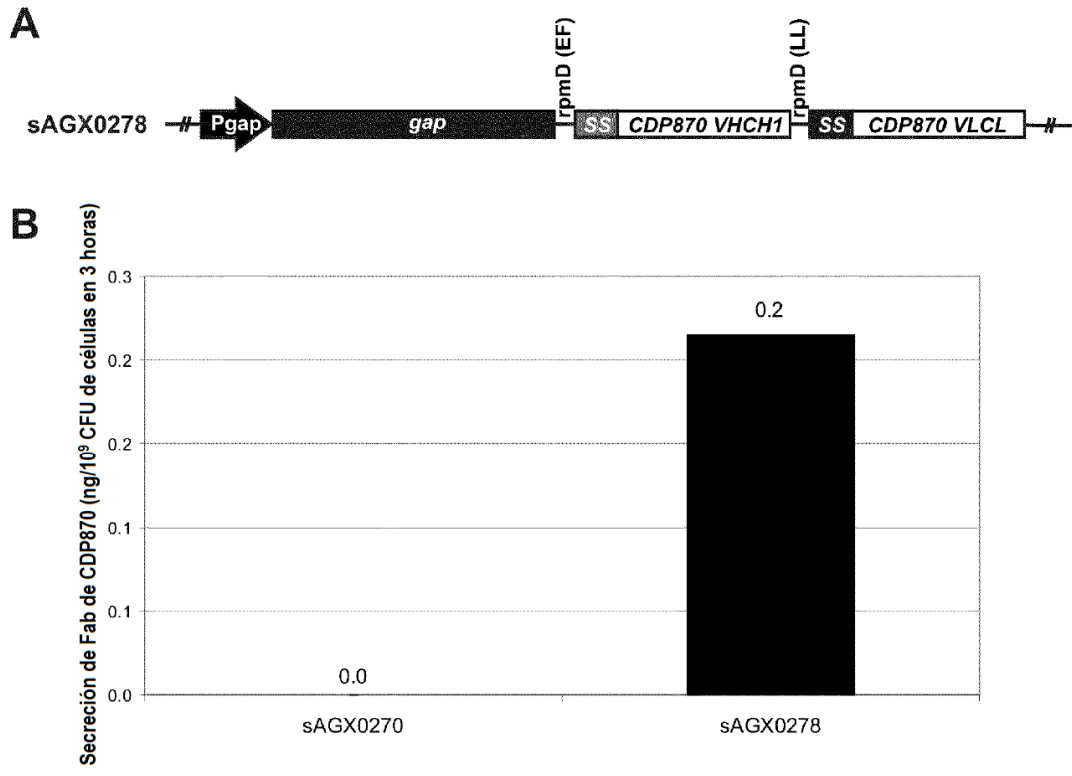
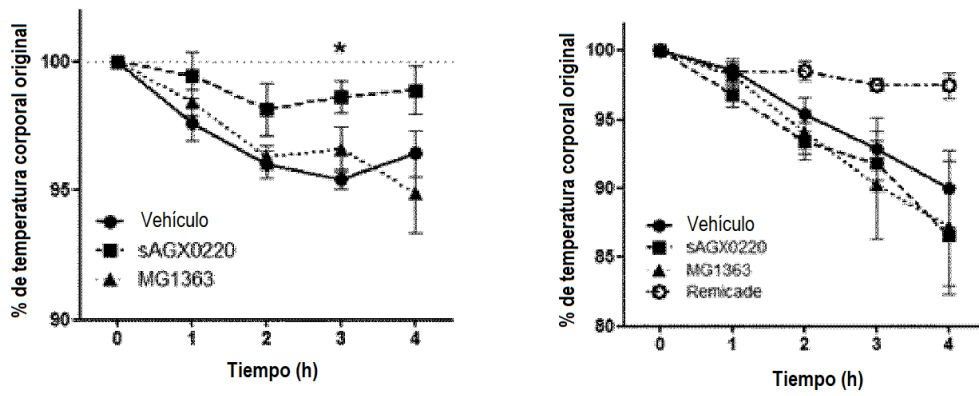


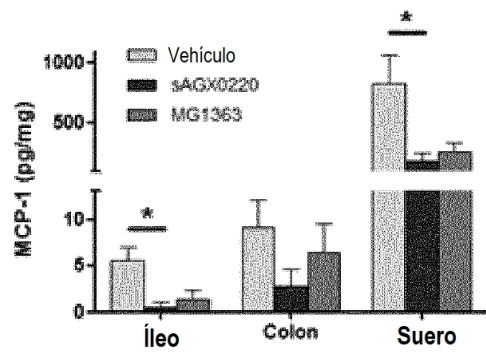
FIG 13



A



B



C

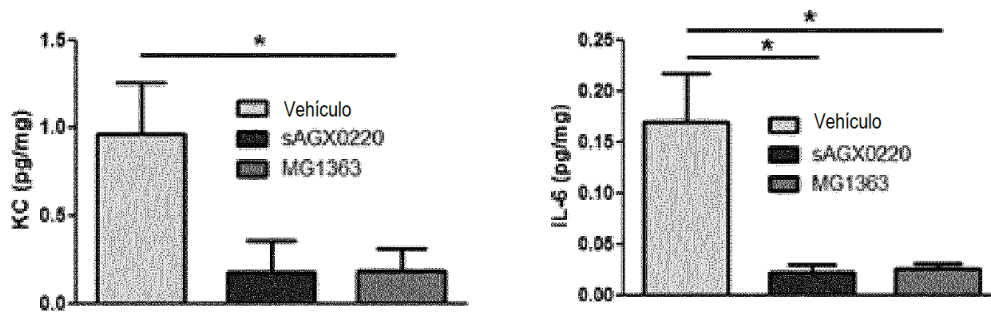
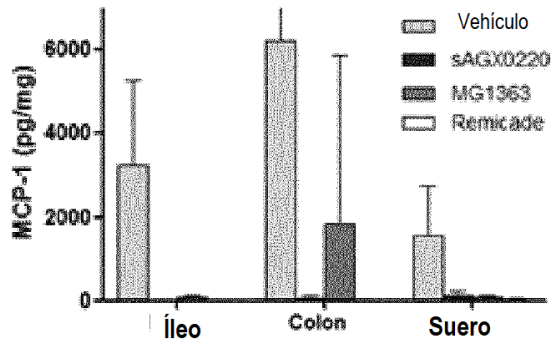


FIG 14

D



E

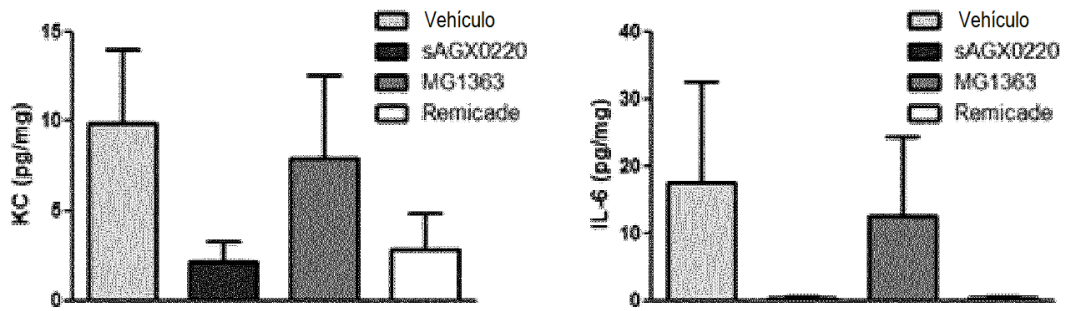
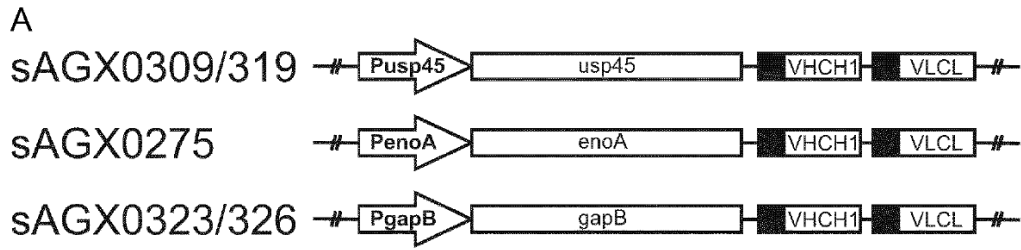
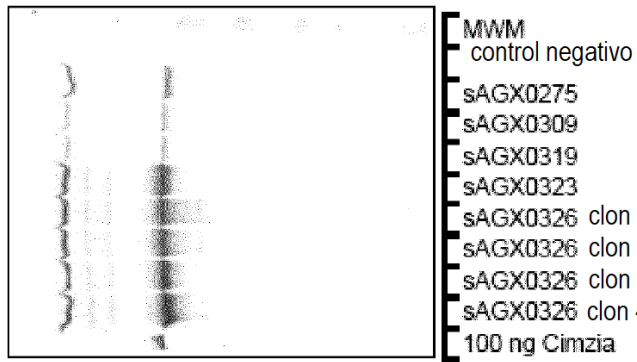


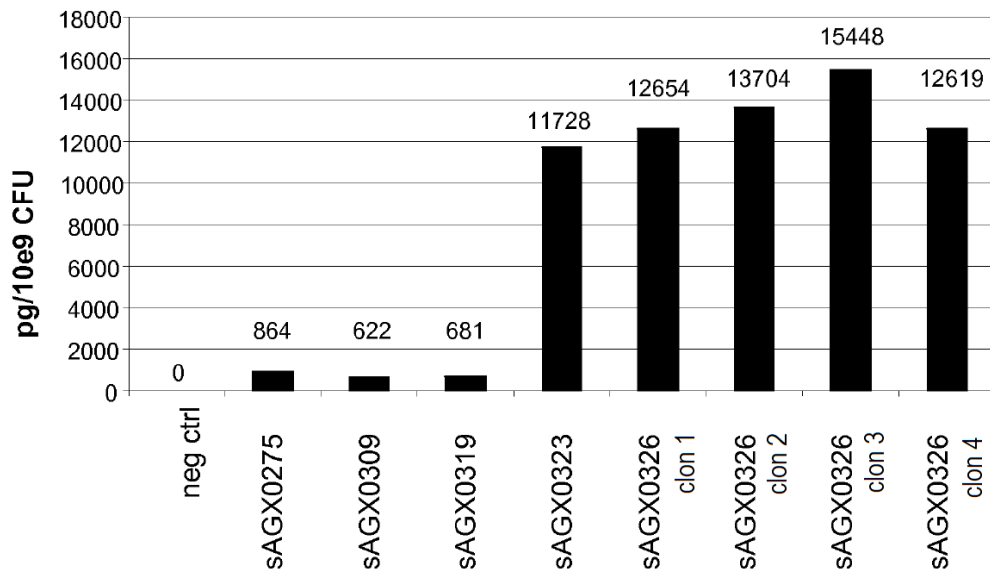
FIG 14 (continuación)



**B**

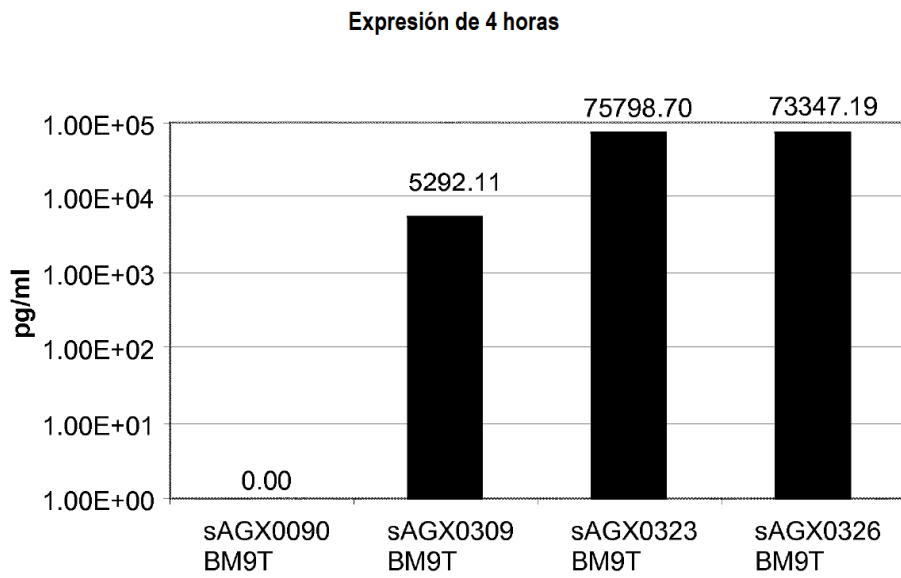
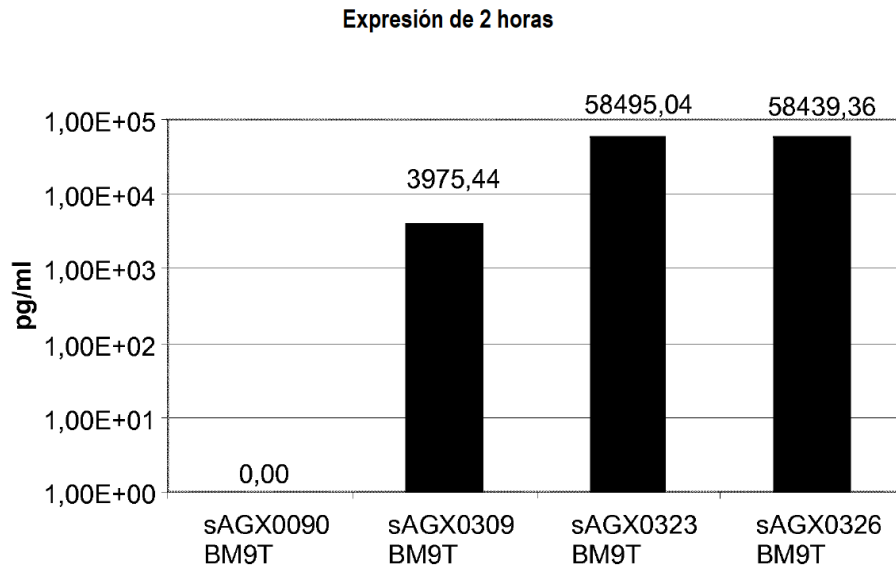


**C**



**FIG 15**

D



**FIG 15 (continuación)**

F

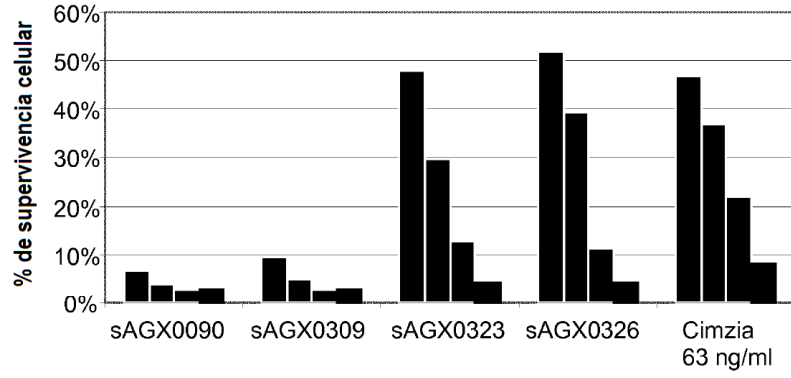


FIG 15 (continuación)

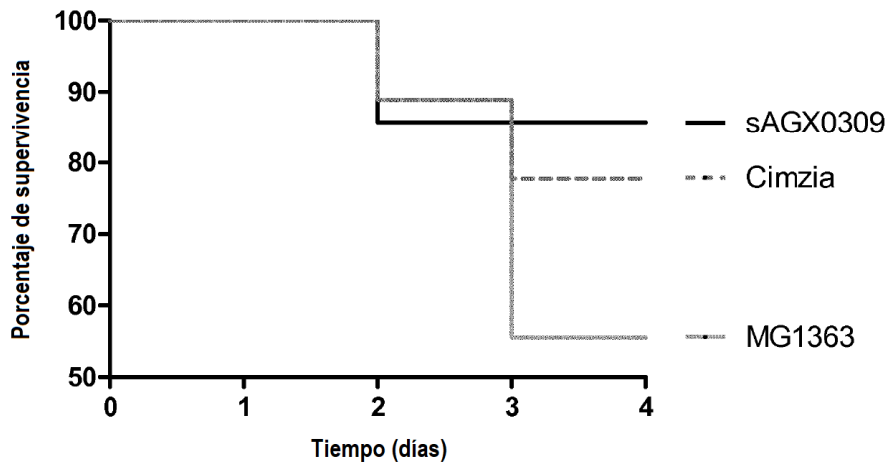


FIG 16

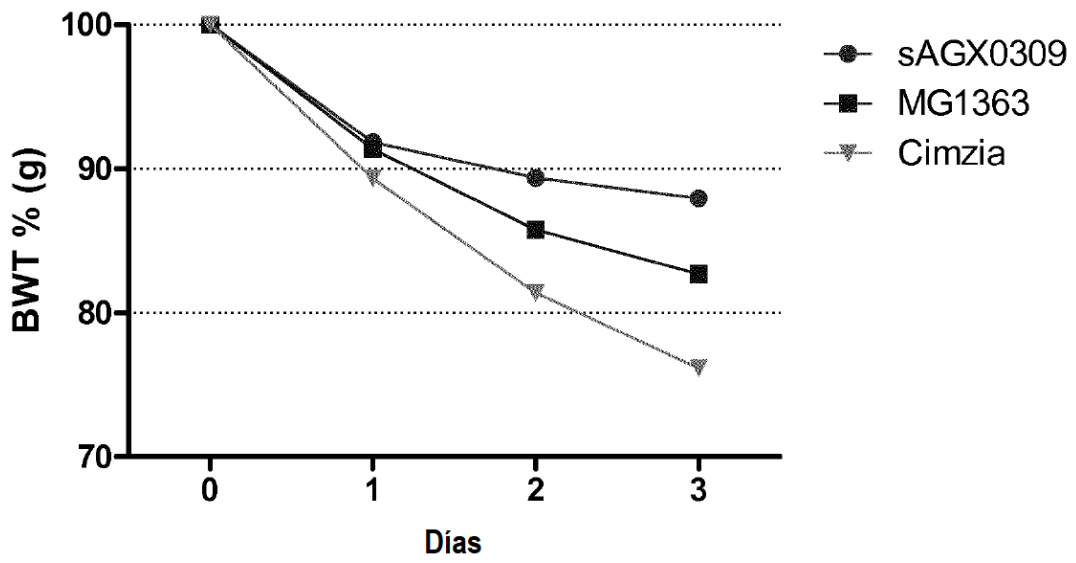
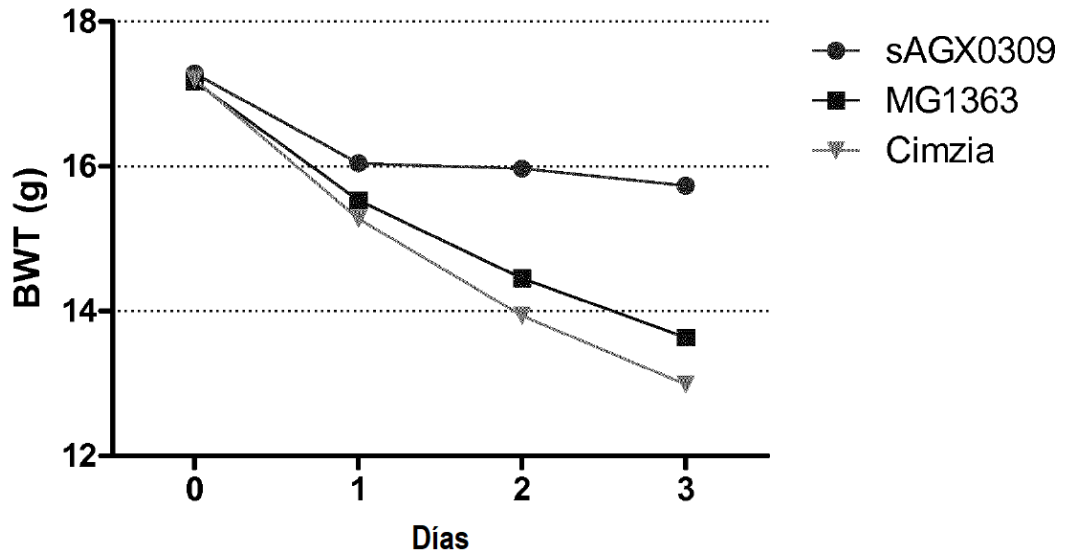


FIG 17

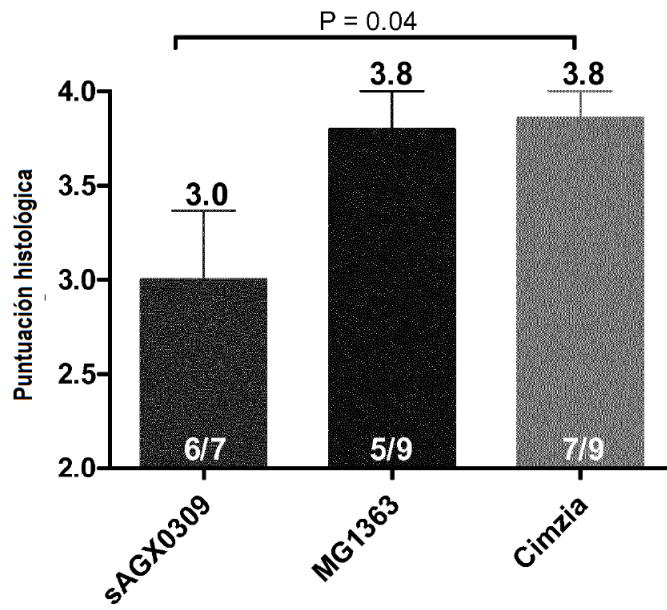


FIG 18

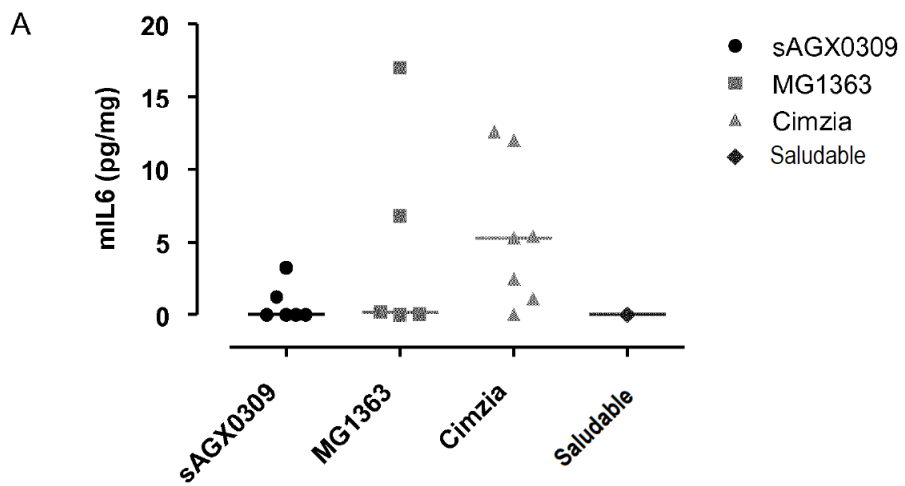


FIG 19

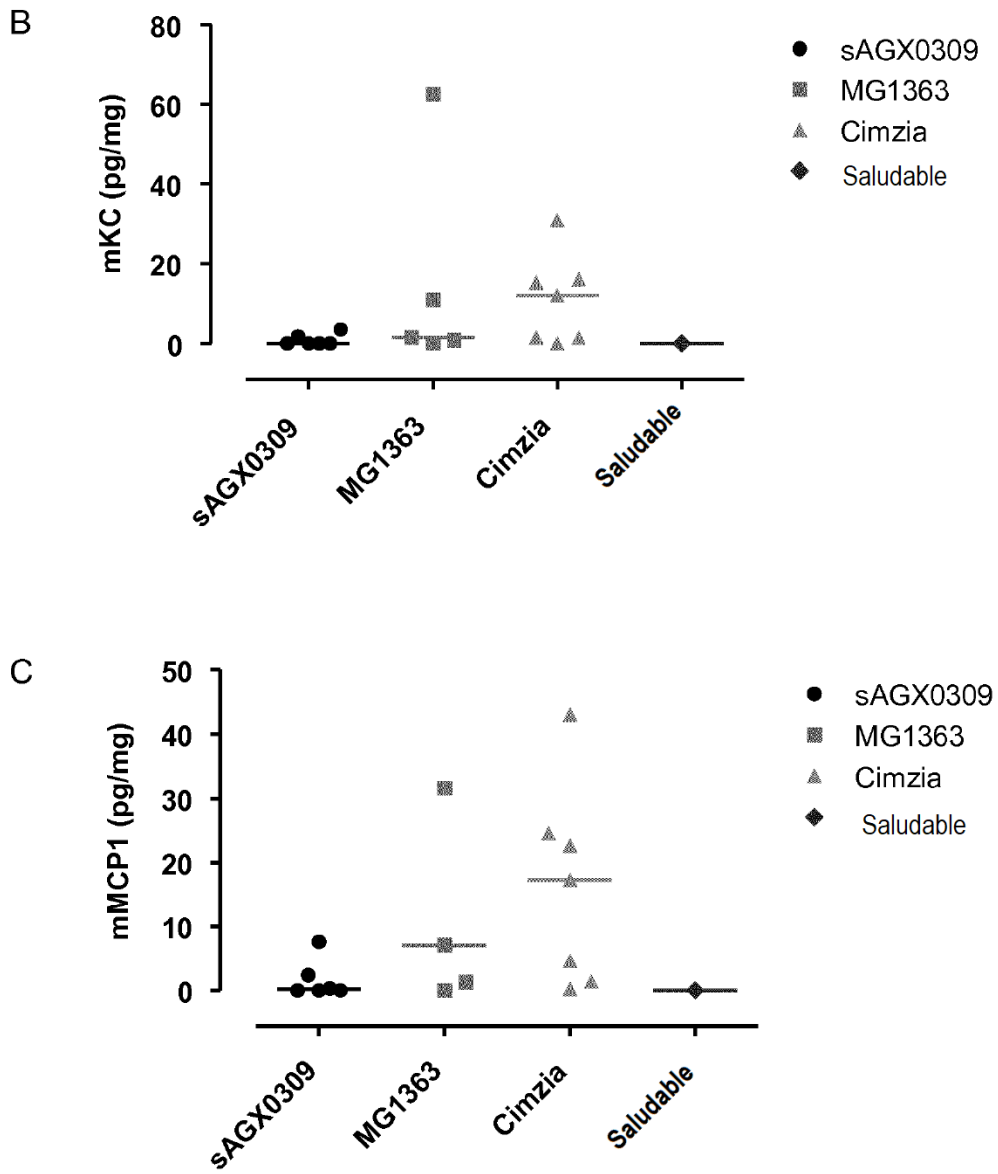


FIG 19 (continuación)