



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 721**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/74** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06701043 .9**

96 Fecha de presentación : **24.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1841875**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2007**

54 Título: **Administración y producción controladas de agentes biológicamente activos mediante bacterias intestinales.**

30 Prioridad: **25.01.2005 GB 0501540**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.03.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.03.2011**

73 Titular/es: **University of Leeds  
Belgrave Hall Belgrave Street  
Leeds LS2 8DD, GB  
PLANT BIOSCIENCE LIMITED**

72 Inventor/es: **Carding, Simon y  
Farrar, Mark**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

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

La presente invención se refiere a la producción y secreción de proteína(s) o polipéptido(s) biológicamente activo(s) por la microflora intestinal, a métodos de administración de los mismos y a métodos de control de la producción y secreción de dicha(s) proteína(s) o polipéptido(s) biológicamente activo(s). La presente invención es particularmente útil en el desarrollo de nuevas inmunoterapias y especialmente para el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias.

### ANTECEDENTES

La comunidad microbiana en el intestino grueso humano consiste en una gama diversa de bacterias que son predominantemente anaerobios obligados. Estas bacterias actúan juntas degradando sustratos de la dieta que alcanzan el colon (incluyendo insulina, fructo-oligosacáridos y almidón resistente), produciendo una gama de productos que son importantes para la enfermedad y la salud humana.

La respuesta inmunitaria de la mucosa puede verse influida por la manipulación de la flora bacteriana residente normal. Esta flora posee una gran variedad de propiedades biológicas e inmunomoduladoras que pueden influir, directa o indirectamente, en el desarrollo y la función del sistema inmunitario de la mucosa. Trastornos crónicos del intestino, por ejemplo la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) que incluye los trastornos de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, afectan a una proporción significativa de la población en países desarrollados. Se han usado modelos animales de inflamación de la mucosa para probar y determinar los mecanismos inmunitarios implicados en la patogenia de estas enfermedades. La colitis ulcerosa se desarrolla de manera espontánea en ratones interleucina (IL) 2<sup>-/-</sup> e IL10<sup>-/-</sup> ambos de los cuales se usan como modelos de EII. Se han descrito también muchos otros modelos de ratón de EII, la

mayoría de los cuales tienen delecciones seleccionadas como diana de genes de respuesta inmunitaria. El tratamiento actual de EII se limita a terapias con fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores incluyendo IL10 recombinante y anticuerpos frente al factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Sin embargo, estas terapias no son curativas y pueden provocar efectos secundarios adversos tales como toxicidad e inmunosupresión. Por tanto, existe una necesidad de una forma de inmunoterapia más controlada y dirigida.

Se sabe de la técnica anterior usar bacterias comensales, o bacterias que se producen de manera natural en el canal alimentario, tales como *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus spp.* para tratar la inflamación intestinal y ciertas formas de EII en seres humanos (Shanahan 2001), sin embargo estos resultados tienen pruebas de éxito limitadas y eficacia inconstante. Se sabe de la técnica anterior usar *Lactococcus lactis* de grado alimentario modificada por ingeniería genética para secretar interleucina-10 (IL10), que cuando se administra por vía intragástrica a dos modelos murinos de EII se demostró que era tan eficaz tanto en la prevención como en el tratamiento de la enfermedad que la terapia con esteroides más convencional (Steidler et al. 2000). Este sistema de *Lactococcus* se ha usado también para producir IL2 e IL6 biológicamente activa (Steidler et al. 1995; Steidler et al. 1998). Sin embargo, una desventaja importante asociada con estos sistemas de la técnica anterior es que *L. lactis* no puede colonizar el intestino debido a la incapacidad del organismo para unirse al epitelio del intestino y/o su dependencia nutricional de la provisión de aminoácidos y péptidos que no están disponibles *in vivo*. Por consiguiente, cualquier terapia o tratamiento *in vivo* requeriría la dosificación repetida al sitio apropiado con el organismo modificado.

Otra desventaja y preocupación de bioseguridad del uso de esta bacteria aerobia particular es que podría sobrevivir

fuera del huésped/paciente durante un tiempo suficiente para transmitirse a otros.

Una desventaja aún adicional de los sistemas de la técnica anterior es que no hay ningún medio de controlar la expresión constitutiva de las moléculas de interleucina inmunológicamente activas y estas moléculas activas por sí mismas, cuando se producen en exceso, pueden tener efectos adversos. Por consiguiente, los sistemas probióticos genéticamente modificados de la técnica anterior carecen de control y regulación de la actividad de las bacterias probióticas tras su administración. Esto representa un problema de seguridad grave para la terapia en seres humanos.

Para abordar las deficiencias en la técnica anterior y para desarrollar adicionalmente bacterias comensales como sistemas de administración novedosos para moléculas biológicamente activas, se han desarrollado organismos probióticos modificados por ingeniería genética en los que la producción de agentes inmunoterapéuticos por bacterias comensales *in situ* puede regularse y controlarse mediante factores de la dieta.

Es un objeto de la presente invención modificar por ingeniería genética una bacteria comensal intestinal de modo que produzca y secrete proteína(s) o polipéptido(s) biológicamente activo(s) de una manera regulada como base para inmunoterapias novedosas para trastornos intestinales crónicos.

#### **BREVE SUMARIO DE LA DESCRIPCIÓN**

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante que comprende y expresa una proteína o un polipéptido biológicamente activo, comprendiendo la bacteria un operón xilanasas que comprende un promotor de xilanasas de *Bacteroides ovatus* y una secuencia de ácido nucleico que

codifica para la proteína o el polipéptido terapéutico heterólogo biológicamente activo.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprenden" y "contienen" y variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "incluyendo pero sin limitarse a", y no pretenden excluir (ni excluyen) otros restos, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, debe entenderse que la memoria descriptiva contempla la pluralidad así como la singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Debe entenderse que los rasgos distintivos, los números enteros, las características, los compuestos, los restos o los grupos químicos descritos conjuntamente con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención pueden aplicarse a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento a menos que sea incompatible con el mismo.

Un operón puede definirse como una unidad funcional que consiste en un promotor, un operador y varios genes estructurales. Un ejemplo es el operón xilanasas. Los genes estructurales codifican comúnmente para varias enzimas funcionalmente relacionadas, y aunque se transcriben como un ARNm (policistrónico), cada uno tiene su sitio de iniciación de la traducción separado. En el operón típico, la región operadora actúa como elemento de control de la activación o desactivación de la síntesis de ARNm. El operón xilanasas se activa en presencia de xilano.

Preferiblemente, el promotor es constitutivo y más preferiblemente es el promotor de xilanasas. Por tanto, se apreciará que la expresión de una o más proteínas o polipéptidos biológicamente activos se controla mediante la

presencia de xilano en la dieta. Por tanto, puede decirse que las bacterias comprenden un elemento regulador inducible por xilano.

Preferiblemente, el operón xilanasa de la bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* incluye además una secuencia señal de secreción de enterotoxina de *Bacteroides fragilis*.

El xilano es un polisacárido soluble en agua, gomoso, que se encuentra en paredes de células vegetales y que produce xilosa tras su hidrólisis. Por tanto, es un componente o factor común de la dieta, por consiguiente la inclusión o exclusión del xilano en la dieta controla la expresión de la proteína o el polipéptido biológicamente activo. Por tanto, las bacterias modificadas de la presente invención proporcionan ventajosamente un sistema de expresión fácilmente controlable que evita la dosificación invasiva repetida de un individuo puesto que las bacterias modificadas de la presente invención también pueden colonizar el intestino mientras que se minimiza de manera concomitante cualquier efecto secundario adverso.

Preferiblemente, la bacteria es un anaerobio obligado.

Preferiblemente, la bacteria no es patógena para el hombre.

"Biológicamente activo" se refiere a la capacidad de realizar una función biológica. La proteína o el polipéptido biológicamente activo usado en la presente invención puede ser o bien homólogo para la bacteria o bien heterólogo para la misma, derivado de fuentes o bien virales o bien procariotas o bien eucariotas.

Los ejemplos específicos de tales polipéptidos y proteínas usados en la presente invención incluyen preferiblemente insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, somatostatina, hormona estimulante del tiroides, polipéptido intestinal vasoactivo, factores trébol, factores de reparación

celulares y tisulares, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor de crecimiento de queratinocitos, una citocina de grupo estructural 1 que adopta una estructura de haz de 4 hélices  $\alpha$  antiparalelas tal como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- $\gamma$ , EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL o IFN $\alpha/\beta$ , una citocina de grupo estructural 2 que a menudo están asociadas a la superficie celular, forman homotrómeros simétricos y las subunidades adoptan la conformación de "barril  $\beta$ " (" $\beta$ -jelly roll") descrita para ciertas proteínas de la envuelta viral tales como la familia TNF de citocinas, por ejemplo TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , ligandos de CD40, CD27 o FAS, la familia IL-1 de citocinas, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, factor de crecimiento transformante  $\beta$  y factores de crecimiento nerviosos, una citocina de grupo estructural 3 que comprende moléculas  $\alpha/\beta$  de cadena corta, que se producen como moléculas precursoras transmembrana grandes que contienen cada una al menos un dominio EGF en la región extracelular, por ejemplo la familia de citocinas del factor de crecimiento epidérmico, las quimiocinas caracterizadas por su posesión de secuencias de aminoácidos agrupadas alrededor de residuos de cisteína conservados (los subgrupos de quimiocinas C-C o C-X-C) o las citocinas relacionadas con la insulina, una citocina de grupo estructural 4 que presenta estructuras en mosaico tales como las heregulinas o neuregulinas compuestas por diferentes dominios, por ejemplo dominios EGF, de tipo inmunoglobulina y kringle.

Alternativamente, el polipéptido biológicamente activo puede ser un receptor o antagonista para polipéptidos biológicamente activos tal como se definió anteriormente.

La bacteria expresa la proteína o el polipéptido biológicamente activo y el antígeno a partir del ácido nucleico contenido dentro de la misma. El ácido nucleico puede

comprender uno o más constructos de ácido nucleico en los que el ácido nucleico que codifica para el polipéptido biológicamente activo y el ácido nucleico que codifica para el antígeno están bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas para su expresión en la bacteria.

La bacteria también puede expresar la proteína o el polipéptido biológicamente activo como una vacuna.

Preferiblemente, la bacteria de la presente invención puede modificarse para expresar una pluralidad de proteínas o polipéptidos biológicamente activos.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante que comprende y expresa una proteína o un polipéptido biológicamente activo, comprendiendo la bacteria operón xilanasas que comprende un promotor de xilanasas de *Bacteroides ovatus* y una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína o el polipéptido terapéutico heterólogo biológicamente activo.

Preferiblemente, la composición farmacéutica se proporciona como una composición en un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable

Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende una cualquiera o más de las características mencionadas anteriormente en el presente documento.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante tal como se describió anteriormente en el presente documento para el tratamiento de una enfermedad intestinal inflamatoria, en la que el polipéptido o la proteína se selecciona del grupo que comprende una hormona del crecimiento, un factor trébol, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor de crecimiento de queratinocitos, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , un



miembro de la familia IL-1 de citocinas, un miembro de la familia de citocinas del factor de crecimiento epidérmico, o una quimiocina.

Preferiblemente, el uso comprende además una cualquiera o más de las características mencionadas anteriormente en el presente documento.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante tal como se describió anteriormente en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad intestinal inflamatoria, en la que el polipéptido o la proteína se selecciona del grupo que comprende una hormona del crecimiento, un factor trébol, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor de crecimiento de queratinocitos, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , un miembro de la familia IL-1 de citocinas, un miembro de la familia de citocinas del factor de crecimiento epidérmico, o una quimiocina.

Preferiblemente, la bacteria expresa más de un polipéptido o proteína o antígeno o enzima o vacuna biológicamente activo o una combinación de los mismos.

Por tanto, se apreciará que en esta realización de la invención se proporcionan, por ejemplo y sin limitación, bacterias que pueden expresar IL2 y bacterias que pueden expresar IL12 y/o IL9 y opcionalmente bacterias que pueden expresar un factor de reparación celular y tisular

Preferiblemente, la bacteria incluye una cualquiera o más de las características descritas anteriormente en el presente documento.

*Bacteroides ovatus* es una bacteria Gram-negativa del colon comensal principal en seres humanos y roedores para la que están disponibles sistemas de clonación que permiten la introducción de ADN foráneo en el organismo y su integración en el genoma (Tancula et al. 1992). Este organismo es también

uno de los pocos que pueden degradar el polisacárido xilano. Se proporcionan pruebas de la modificación por ingeniería genética satisfactoria de *B. ovatus* para producir IL2 murina (MuIL2) intracelularmente bajo el control del promotor de xilanasa que es activo en presencia de xilano. Estos resultados demuestran que *B. ovatus* puede inducirse para que produzca MuIL2 biológicamente activa en respuesta a xilano. También se ha modificado por ingeniería genética una segunda cepa para que secreta MuIL2 añadiendo la secuencia señal de secreción de enterotoxina de *B. fragilis* a la proteína. Las cepas recombinantes producían MuIL2 sólo en presencia de xilano tal como se determinó mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de lisados celulares y sobrenadantes de cultivo. Se usó la línea celular dependiente de IL2, CTLL-2, para demostrar que MuIL2 producida por ambas cepas de *B. ovatus* era biológicamente activa. Además, esta actividad podía bloquearse mediante un anticuerpo neutralizante anti-IL2.

El uso de las bacterias de la invención como vehículos de administración de fármacos ofrece un medio de administración de factores inmunomoduladores, tales como citocinas, y otras moléculas biológicamente activas directamente al sitio de acción para tratar la inflamación crónica del intestino.

Las ventajas de esta forma única de administración terapéutica es que es un medio conveniente y sencillo de administrar proteínas biológicamente activas directamente a su sitio de acción, evitando los inconvenientes y la exposición sistémica asociados con la terapia parenteral.

La presente invención se describirá a modo de ejemplo sólo con una breve referencia a las siguientes figuras en las que:

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 muestra una construcción esquemática del plásmido pBOMuIL2.

La figura 2 muestra un gráfico de barras de los niveles de de MuIL2 en lisados celulares (LS) y sobrenadantes de cultivo (SN) de cepas BOMuIL2 de *B. ovatus*, BOMuIL2-S de *B. ovatus* y cepas control (V975 y BT2) hechas crecer con xilano durante 24 h (+X) o sin xilano.

La figura 3 muestra el resultado de un bioensayo de MuIL2 en sobrenadantes de cultivo de BOMuIL2-S de *B. ovatus* hecha crecer con xilano.

La figura 4 muestra un gel del aumento de la expresión de ARNm de MuIL2 en respuesta a xilano determinado mediante RT-PCR con cepas de prueba (BOMuIL2 y BOMuIL2-S) o cepas control (V975 y BT2) de *B. ovatus* hechas crecer durante 24 h en RGM sin xilano seguido por 1 h con xilano.

La figura 5 muestra el mapa del constructo de *B. ovatus* que expresa o bien KGF o bien TGF $\beta$  humano.

La figura 6A muestra la producción de citocinas humanas por *B. ovatus* que expresa TGF $\beta$  humano en respuesta a xilano y la figura 6B muestra la producción de citocinas humanas por *B. ovatus* que expresa KFG humano en respuesta a xilano.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### **Cepas bacterianas, plásmidos y manipulaciones generales del ADN**

Se hicieron crecer DH5 $\alpha$  y J53/R751 de *E. coli* en medio LB. Se complementaron cultivos de J53/R751 de *E. coli* con 200  $\mu$ g de trimetoprim ml<sup>-1</sup>. Se hizo crecer de manera anaerobia V975 de *B. ovatus* a 37°C en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) complementado con 10  $\mu$ g de hemina ml<sup>-1</sup> o en medio de crecimiento rutinario (RGM) preparado tal como se describe por Hespell et al. (1987) y complementado con glucosa al 0,1% (p/v). Cuando se requería xilano, se preparó una fracción soluble en agua caliente de xilano de avena-escanda mediante el método de Hespell y O'Bryan (1992) y se añadió al

medio a una concentración del 0,2% (p/v). Se llevó a cabo la transferencia de plásmidos a *B. ovatus* a partir de J53/R751 de *E. coli* mediante conjugación tal como se describe por Valentine *et al.* (1992). Se seleccionó pBT2 (Tancula *et al.* 1992) en *E. coli* usando 50 µg de kanamicina ml<sup>-1</sup>. Se seleccionaron transconjugantes de *B. ovatus* en agar BHI-hemina que contenía 200 µg de gentamicina ml<sup>-1</sup> y 5 µg de tetraciclina ml<sup>-1</sup>. Posteriormente, se hicieron crecer los transconjugantes en medio que contenía 1 µg de tetraciclina ml<sup>-1</sup>. Se transformó *E. coli* mediante el método de Hanahan (1983). Se llevaron a cabo las manipulaciones generales del ADN tal como se describe por Sambrook *et al.* (1990).

#### **Construcción de cepas de *B. ovatus* control y productoras de MuIL2**

Cepa BOMuIL2 productora de MuIL2. Se amplificó por PCR el gen de MuIL2 a partir de ADNc clonado en pUC13 usando cebadores MuIL2F1 (GCG**CATATG**GCACCCACTTC AAGCTCCAC; SEQ ID NO:1 sitio *NdeI* en negrita) y MuIL2R1 (GCG**GGGATC**CTT ATTGAGGGCTTGTTGAGATGATG; SEQ ID NO:2 sitio *BamHI* en negrita). Se amplificó una parte del operón xilanasas de *B. ovatus* que abarcaba la mitad 3' del gen *orf* y la región entre este gen y el gen *xyl* a partir del plásmido pOX1 (Whitehead y Hespell 1990) usando los cebadores ORFF1 (GCG**GGGATC**CATGGAGCA TGAATGCGTCA; SEQ ID NO:3 sitio *BamHI* en negrita) y ORFR1 (**CATATG**TTA TATTTTGTAGTAATAAACATTCTAC; SEQ ID NO:4 sitio *NdeI* en negrita). Se clonaron los productos de PCR MuIL2 y ORF en pGEM-T (Promega) para crear los plásmidos pGEM-MuIL2 y pGEM-ORF respectivamente. Se eliminó MuIL2 de pGEM-MuIL2 con *NdeI* y se ligó en pGEM-ORF digerido con *NdeI* para crear pORF-MuIL2. Se secuenció el inserto para verificar el constructo. Se eliminó el constructo ORF-MuIL2 de pORF-MuIL2 mediante digestión con *BamHI* y se clonó en el sitio *BamHI* de pBT2 para crear pBOMuIL2. Se transfirió este plásmido a *B. ovatus*

mediante conjugación y se confirmó la integración del plásmido en el genoma de transconjugantes mediante PCR.

*Cepa BOMuIL2-S secretora de MuIL2.* Se construyó la cepa BOMuIL2-S de *B. ovatus* del mismo modo que la cepa BOMuIL2 excepto porque se amplificó por PCR el gen de MuIL2 usando los cebadores BFTSIGIL2F (GACATATGAAGAATGTAAAGTTACTTTTAA  
TGCTAGGAACCGCGGCATTATTAGCTGCAGCACCCACTTCAAGCTCCAC; SEQ ID NO:5 la región que codifica para la secuencia señal está subrayada, sitio NdeI en negrita) y MuIL2R1. Esto condujo a la creación de los plásmidos pGEM-MuIL2-S, pORF-MuIL2-S y pBOMuIL2-S.

*Cepa control BT2.* Se construyó la cepa control que contenía pBT2 sin el gen de MuIL2 tal como sigue. La misma parte del gen *orf* que se usó anteriormente se amplificó por PCR con los cebadores ORFF1 y ORFR2 (**GGATCCTTATATTTTGGAGTAAT**  
**AAACATTCTAC**; SEQ ID NO:6 sitio *Bam*HI en negrita) y se clonó en pGEM-T para crear pGEM-ORFB. Se eliminó el inserto con *Bam*HI y se clonó en el sitio *Bam*HI de pBT2 para crear pBT-ORF. Se transfirió este plásmido a *B. ovatus* tal como se describió anteriormente.

#### **Preparación de muestras de *B. ovatus* que producen MuIL2.**

Se hicieron crecer las cepas V975, BT2, BOMuIL2 y BOMuIL2-S de *B. ovatus* en 10 ml de RGM con o sin xilano durante 24 h. Se hicieron crecer también las cepas BOMuIL2 y BOMuIL2-S durante 16 h sin xilano y luego con xilano durante otras 8 h. Tras la incubación, se recogieron las células (5000 g, 30 min., 4°C). Se retiraron los sobrenadantes y se congelaron. Se lavaron las células una vez en 10 ml de RGM y se resuspendieron en 5 ml de agua destilada. Se rompieron las células mediante sonicación sobre hielo durante 4 x 20 s a 12 µm (Soniprep 150, MSE). Se eliminaron mediante centrifugación las células que no se rompieron y los residuos celulares (13.000 g, 20 min., 4°C). Se liofilizaron los lisados y sobrenadantes y se resuspendieron en 0,5 ml de agua destilada.

**Ensayos para la detección de MuIL2**

Se usó un ELISA que incorporaba anticuerpo de rata nativo anti-IL2 de ratón (clon JES6-1A12) y anticuerpo de rata biotinilado anti-IL2 de ratón (clon JES65H4) como anticuerpos de captura y detección respectivamente, para cuantificar los niveles de MuIL2 producidos por cepas recombinantes de *B. ovatus* y se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen). Se usó MuIL2 recombinante (rMuIL2; Sigma) como control para obtener una curva patrón. Se usó un bioensayo de IL2 usando la línea celular indicadora CTLL-2 (Gillis *et al.* 1978) para detectar la presencia de MuIL2 biológicamente activa en muestras (Wadhwa *et al.* 2000). En resumen, se incubaron las células con diluciones de muestras de prueba o rMuIL2 de control en placas de 96 pocillos por duplicado durante 18 h. Entonces se pulsaron las células con 0,5  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]timidina, se recogieron tras 4 h y se estimó la radiactividad incorporada al ADN mediante recuento por centelleo. Se realizó también el ensayo en presencia de un anticuerpo neutralizante de IL2 (clon JES6-1A12). Se añadió éste a las muestras a una concentración de 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  1 h antes de la adición de células.

**Detección de la transcripción de MuIL2 mediante RT-PCR**

Se hicieron crecer *B. ovatus* V975, BT2, BOMuIL2 y BOMuIL2-S en RGM sin xilano durante 16 h. Se tomó una muestra de preinducción de los cultivos de BOMuIL2 y BOMuIL2-S antes de que se añadiese xilano para inducir la transcripción del operón xilanasas. Se tomaron muestras de los cuatro cultivos tras 1 h. Se extrajo el ARN total de las muestras celulares usando el kit RNeasy (Qiagen) seguido por tratamiento con TURBO DNA-free<sup>TM</sup> (Ambion) para eliminar cualquier ADN contaminante residual. Se realizó la RT-PCR usando el sistema de RT-PCR AccessQuick<sup>TM</sup> (Promega) y cebadores para la fusión *orf-Muil2* (CCGATGGTACCTGCCATTAAA (SEQ ID NO:7) y

CTGTGCTTCCGCTGAGG) SEQ ID NO:8 o el gen *gyrA* (CTCCATGTCGG TCATCGTTTC (SEQ ID NO:9) y CAAAGGATAACGCATTGCCCA (SEQ ID NO:10)) como control positivo. Como control negativo, se realizó la reacción sin la adición de transcriptasa inversa.

5

### **Construcción de cepas de *B. ovatus***

Con el fin de construir una cepa de *B. ovatus* que pueda expresar MuIL2 de una manera inducible por xilano, se amplificaron por PCR el gen de MuIL2 (menos la secuencia señal nativa) y la parte en 3' del gen *orf* del operón xilanasa y se ligaron en pGEM-T para dar el plásmido pORF-MuIL2. Se colocó un codón de iniciación ATG antes de la secuencia que codifica para MuIL2 madura como parte de un sitio *NdeI*. Esto garantizó la traducción de la proteína. El uso de este sitio *NdeI* para la clonación dio como resultado un único cambio de bases (G a A) en la región no codificante entre *orf* y el gen de MuIL2 en comparación con la región de tipo natural entre *orf* y *xyl*. Sin embargo, no se esperaba que esto afectase a la expresión de MuIL2. La construcción del plásmido pBOMuIL2 en la figura 1 comprende la parte en 3' del gen *orf* de *B. ovatus* y el gen de MuIL2 completo amplificado mediante PCR, ligados entre sí en pBluescript y luego subclonados en pBT2 para crear pBOMuIL2. Sólo se muestran en la figura los sitios de restricción usados para la clonación. *tet*, resistencia a tetraciclina para la selección en *B. ovatus*; *kan*, resistencia a kanamicina para la selección en *E. coli*; *oriV*, origen de replicación; *repA*, *repB*, *repC* codifican para funciones de replicación y *mob* se requiere para la movilización de *E. coli* a *B. ovatus*. Se transfirió entonces el plásmido pBOMuIL2 (figura 1) satisfactoriamente a V975 de *B. ovatus*. Se construyó la cepa secretora de MuIL2, BOMuIL2-S de *B. ovatus*, del mismo modo excepto porque el cebador directo usado para amplificar por PCR el gen de MuIL2 contenía la secuencia que codificaba para la secuencia señal de secreción de enterotoxina de *B. fragilis*. Se construyó también una cepa control, BT2 de *B. ovatus*, clonando sólo el

10

15

20

25

30

35

gen *orf* en pBT2. Se confirmó la construcción satisfactoria de las cepas de expresión MuIL2 y MuIL2-S, y la cepa control BT2 mediante PCR y secuenciación de nucleótidos (datos no mostrados).

5

**EJEMPLO 1**

Se emprendió un estudio para evaluar la capacidad para colonizar el intestino de ratón de la cepa de *B. ovatus* modificada genéticamente, *B. ovatus*-MuIL2, diseñada para producir el factor de crecimiento murino interleucina-2 (IL-2) en presencia de xilano.

10

Puesto que la utilidad del uso de *B. ovatus*-MuIL2 para tratar ratones IL2<sup>-/-</sup> depende de la demostración de que puede colonizar el colon de ratón, se determinó si *B. ovatus*-MuIL2 podía colonizar el colon de ratones de tipo natural. Se infectaron ratones C57BU6, libres de patógenos específicos (SPF), de tipo natural, mantenidos con una dieta convencional (que contenía xilano), con un único inóculo de  $\sim 1^{10}$  ufc de *B. ovatus*-MuIL2 mediante sonda nasogástrica oral. Se evaluó la colonización 7, 14, 21 y 28 días más tarde mediante cultivo de sedimentos fecales en condiciones anaerobias en presencia de antibióticos permisivos para el crecimiento de todos los *Bacteroides sp.*, o para el crecimiento de *B. ovatus*-MuIL2 sola. En futuros experimentos, la identidad de *B. ovatus*-MuIL2 en cultivos fecales se verificará más exhaustivamente mediante técnicas de hibridación en filtro de colonias usando un clon de ADNc de IL2 murina de longitud completa como sonda. Tal como se muestra en la tabla 1, *B. ovatus*-MuIL2 estaba presente en los sedimentos fecales de 3/5 animales hasta 28 días tras la inoculación, lo que concuerda con su capacidad para colonizar al menos transitoriamente el colon de ratón. Los cólones de los animales 2, 3 y 5 analizados a los 28 días tras la inoculación contenían grandes números ( $2-8 \times 10^7$  ufc/g que teóricamente podrían producir 20-80 pg de MuIL2) de *B. ovatus*-MuIL2, lo que concuerda con los recuentos de bacterias

15

20

25

30

35



fecales. En cambio, los cólones de los ratones n.º 1 y 4 no contenían *B. ovatus*-MuIL2, lo que concuerda con un fallo en la colonización. La eficacia y duración de la colonización podría mejorarse aumentando el número de bacterias en el inóculo infeccioso, o mediante la administración repetida de bacterias.

Tabla 1. Recuentos de bacterias anaerobias fecales de ratones "infectados" con *B. ovatus*-MuIL2

<b><i>Bacteroides</i> totales (x10<sup>8</sup> ufc/g)</b>						<b><i>B. ovatus</i>-MuIL2 (x10<sup>4</sup> ufc/g)</b>				
Ratón	T0	T7	T14	T21	T28	T0	T7	T14	T21	T28
1	12	1,6	7,5	5,4	5,8	-	nd	nd	nd	nd
2	17	3,6	4,8	2,9	8,3	-	0,67	2,74	5,4	10,1
3	15	4,1	3,7	3,5	3,7	-	0,53	3,2	4,9	9,3
4	18	7,8	1,1	6,0	1,3	-	nd	nd	nd	nd
5	13	5,1	2,5	7,0	3,4	-	0,21	4,61	7,9	12,2

nd, no detectable.

## EJEMPLO 2

Se emprendió un estudio para evaluar la capacidad de la cepa modificada por ingeniería genética de *B. ovatus*, *B. ovatus*-MuIL2, diseñada para producir el factor de crecimiento murino interleucina-2 (IL-2) en presencia de xilano, para afectar de manera adversa a la aparición o la gravedad de la inflamación intestinal que se produce espontáneamente en ratones genéticamente deficientes en IL-2 (ratones IL-2<sup>-/-</sup>).

Un problema al usar bacterias comensales en protocolos de inmunoterapia para EII es que las bacterias elegidas, en animales y pacientes inmunocomprometidos, pueden ser "patógenas" y promover, amplificar o sostener la inflamación intestinal. *Bacteroides*, y en particular *B. fragilis* y *B. vulgatis*, se han asociado con el desarrollo de inflamación intestinal en modelos animales experimentales para EII y en pacientes con EII. Un estudio también ha identificado un

aumento de los títulos de anticuerpos IgA e IgG reactivos con antígenos de *B. ovatus* en los sueros de pacientes con EII<sup>5</sup>. Sin embargo, no está claro si esto era una causa de la inflamación intestinal, o era secundario a la entrada de *Bacteroides* y otras bacterias comensales en la circulación sistémica y al desencadenamiento de respuestas inmunitarias como resultado del daño a la barrera epitelial. En vista de estos hallazgos, se creyó que es necesario determinar si *B. ovatus* tiene algún efecto adverso sobre el desarrollo de la colitis en ratones IL2<sup>-/-</sup>, que de lo contrario confundiría o contrarrestaría cualquier beneficio potencial que el tratamiento con *B. ovatus*-MuIL2 pudiese tener en estos animales.

Se infectaron dos grupos (n=6 cada uno) de ratones IL2<sup>-/-</sup> SPF de igual sexo y edad, de 3 semanas de edad, libres de colitis mantenidos con una dieta convencional, con ~10<sup>10</sup> ufc de *B. ovatus* (V975) en 200 ul de PBS, o PBS solo cada 7 días durante 6 semanas, momento en el que los ratones IL2<sup>-/-</sup> no tratados han desarrollado enfermedad grave. A las 3 y 6 semanas tras la infección, se sacrificaron los animales y se analizaron macroscópica e histológicamente los tejidos (bazo, ganglios linfáticos y colon) para determinar la patología de la enfermedad. Se usó una puntuación inflamatoria histológica validada para la evaluación ciega de la inflamación intestinal.

Estos hallazgos indican que *B. ovatus* ni acelera la aparición ni aumenta la gravedad de la colitis que se desarrolla normalmente en ratones IL2<sup>-/-</sup>. Sin embargo, esta evaluación macroscópica e histológica no excluye la posibilidad de que haya otros cambios más sutiles en, por ejemplo, el número, la distribución y/o la actividad de células inmunitarias en los tejidos y el colon de animales tratados con *B. ovatus*. Por tanto, se llevarán acabo análisis inmunológicos más detallados.

**EJEMPLO 3**

Para evaluar la producción de MuIL2 por las cepas BOMuIL2 y BOMuIL2-S, se hicieron crecer cepas recombinantes (BOMuIL2, BOMuIL2-S y BT2) y la cepa de tipo natural (V975) en medio con o sin xilano. Además, se hicieron crecer BOMuIL2 y BOMuIL2-S durante 16 h sin xilano (RGM con glucosa) seguido por otras 8 h con xilano para demostrar la naturaleza inducible de la producción. Se sometieron a ensayo los lisados celulares y los sobrenadantes de cultivo para detectar MuIL2 mediante ELISA y bioensayo. En la figura 2 se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes, los niveles de MuIL2 en lisados celulares (LC) y sobrenadantes de cultivo (SN) de cepas BOMuIL2 de *B. ovatus*, BOMuIL2-S de *B. ovatus* y cepas control (V975 y BT2) hechas crecer con xilano durante 24 h (+X) o sin xilano. Se hizo crecer también BOMuIL2-S sin xilano durante 16 h seguido por 8 h con xilano (+X8). Se hicieron crecer cepas control y de prueba de *B. ovatus* en RGM con o sin xilano. Se recogieron las células y se lisaron y se determinó la cantidad de MuIL2 en lisados y sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Se cuantificó MuIL2 mediante comparación con una serie de dilución de MuIL2 recombinante. Los puntos de datos son la media +/-error estándar. Se detectó MuIL2 en el lisado celular de BOMuIL2 de *B. ovatus* hecha crecer con xilano ( $539,5 \text{ pg ml}^{-1}$ ) y a una concentración inferior ( $44,2 \text{ pg ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes de cultivo. Para la cepa BOMuIL2-S, se detectó 19,3 veces más MuIL2 ( $849,9 \text{ pg ml}^{-1}$ ) en el sobrenadante del cultivo hecho crecer en presencia de xilano en comparación con BOMuIL2. Se detectó una concentración inferior de MuIL2 ( $184,3 \text{ pg ml}^{-1}$ ) en el lisado celular de BOMuIL2-S. No se detectó MuIL2 en lisados celulares o sobrenadantes de cultivo de las dos cepas control o de BOMuIL2 o BOMuIL2-S de *B. ovatus* cultivadas en ausencia de xilano.

**EJEMPLO 4**

Un bioensayo de IL2 demostró que la MuIL2 producida por BOMuIL2-S era biológicamente activa (figura 3). La figura 3 muestra los resultados de un bioensayo de MuIL2 en sobrenadantes de cultivo de BOMuIL2-S de *B. ovatus* hecha crecer con xilano. Se midió la proliferación de células CTLL-2 mediante la captación de [<sup>3</sup>H]timidina tras la incubación con diluciones de duplicación de: ■, sobrenadante de BOMuIL2-S de *B. ovatus* solo; □, sobrenadante de BOMuIL2-S de *B. ovatus* con anticuerpo anti-MuIL2. Se cuantificó MuIL2 mediante comparación con una serie de dilución de MuIL2 recombinante. Los puntos de datos son la media +/-error estándar. No se detectó actividad biológica en sobrenadantes de las cepas control ni en medio de cultivo solo (datos no mostrados). El bloqueo de la proliferación de la línea celular indicadora mediante la adición de un anticuerpo anti-MuIL2 demostró que la actividad de estimulación del crecimiento en sobrenadantes de cultivo de pBOMuIL2-S de *B. ovatus* se debía a MuIL2. En la cepa BOMuIL2-S, se añadió un codón ATG al extremo en 5' del gen de MuIL2 con el fin de facilitar la traducción. En consecuencia, estaba presente un residuo de metionina en el extremo N-terminal de la proteína madura. Los resultados del bioensayo demostraron que esto no suprimía la actividad biológica de la proteína. Asimismo, la secreción de MuIL2 dirigida por la secuencia señal de secreción de enterotoxina de *B. fragilis* no eliminaba la actividad biológica de MuIL2. Las concentraciones superiores de lisados celulares y sobrenadantes demostraron ser inhibitorias para la línea celular indicadora, de ahí la concentración inferior de MuIL2 medida en la dilución 1/40 de sobrenadante de BOMuIL2-S.

**EJEMPLO 5**

Para confirmar la transcripción de la fusión génica orf-MuIL2, se realizó una RT-PCR. Se hicieron crecer BOMuIL2 y BOMuIL2-S de *B. ovatus* en RGM con glucosa durante 16 h y se

tomó una muestra de células. Entonces se añadió xilano y se tomaron muestras tras 1 h. Se tomaron también muestras de cultivos de cepas control tras la inducción con xilano. Se extrajo el ARN total de las células y se realizó una RT-PCR con cebadores específicos para el constructo *orf-MuIL2* y para *gyrA*, un gen de control expresado de manera constitutiva comúnmente usado. Pudo detectarse que el nivel basal de transcripción en ambas cepas BOMuIL2 y BOMuIL2-S antes de la adición de xilano que aumentó 1 h tras la adición de xilano (figura 4). La figura 4 muestra el aumento de la expresión de ARNm de MuIL2 en respuesta al xilano tal como se determina mediante RT-PCR. Cepas de prueba (BOMuIL2 y BOMuIL2-S) o control (V975 y BT2) de *B. ovatus* que se hicieron crecer durante 24 h en RGM sin xilano. Entonces se añadió xilano y se continuó la incubación durante 1 h. Se recogieron las células, se extrajo el ARN total y se realizó la RT-PCR para detectar transcritos de MuIL2 y MuIL2-S. Se usó *gyrA* como control positivo. Carriles: 1, V975 hecha crecer con xilano durante 1 h; 2, BT2 hecha crecer con xilano durante 1 h; 3, BOMuIL2 hecha crecer sin xilano; 4, BOMuIL2 hecha crecer con xilano durante 1 h; 5, BOMuIL2-S hecha crecer sin xilano; 6, BOMuIL2-S hecha crecer con xilano durante 1 h.

No se detectó transcripción del gen de MuIL2 en las dos cepas control. Aunque se detectó transcripción en las cepas productoras de MuIL2 antes de la adición de xilano, no fue posible detectar la proteína MuIL2 en lisados celulares o sobrenadantes de cultivo (figura 2).

Los datos presentados en el presente documento demuestran que puede producirse MuIL2 biológicamente activa bajo una estricta regulación del operón xilanasa en *B. ovatus*, un miembro de la microflora intestinal residente. Además, también pudo secretarse MuIL2 biológicamente activa por *B. ovatus* incorporando la secuencia señal de secreción de enterotoxina de *B. fragilis*. El nivel de MuIL2 en el sobrenadante de cultivo de la cepa BOMuIL2 era relativamente

bajo pero aumentó 19,3 veces mediante la adición de la secuencia señal de secreción (cepa BOMuIL2-S). El operón xilanasasa se ha utilizado ventajosamente para lograr expresión génica regulada en virtud de la naturaleza inducible de este operón en presencia de xilano. Aunque el promotor de este operón no se ha clonado ni caracterizado, se ha mostrado que la actividad de enzimas codificadas por genes en el operón está regulada por incremento en respuesta a xilano. El sistema de la presente invención también proporciona el control o la regulación *in vivo* mediante ingesta en la dieta de xilano. Esta característica de la invención tiene la ventaja con respecto a otros sistemas inducibles de que el xilano permanece sin digerir a medida que pasa través del intestino hasta el colon y sólo se degrada en el colon por la acción de enzimas microbianas.

Aunque se detectó un nivel basal de transcripción en células hechas crecer sin xilano, la producción de MuIL2 estaba a un nivel demasiado bajo ( $< 20 \text{ pg ml}^{-1}$ ) para su detección mediante ELISA en lisados celulares o sobrenadantes de cultivo. La incapacidad para detectar cualquier MuIL2 en cultivos de pBOMuIL2 de *B. ovatus* inducidos con xilano tras la retirada del xilano demostró la rigurosidad del operón xilanasasa y la necesidad de la presencia continuada de xilano para la producción de MuIL2 (datos no mostrados). Los niveles de MuIL2 producidos y secretados por *B. ovatus* son bajos, pero dentro del intervalo fisiológico. Esto es crucial si va a usarse este sistema terapéuticamente puesto que debe producirse suficiente MuIL2 para que tenga un efecto biológico pero los niveles no deben ser tan grandes como para tener un efecto perjudicial. Se intenta ahora someter a prueba las cepas de *B. ovatus* secretoras y productoras de MuIL2 en modelos de ratón de EII para determinar su capacidad para tratar y prevenir la enfermedad.

**EJEMPLO 6**

Se administró a ratones C57BU6 adultos una única dosis de cepa recombinante de *B. ovatus* que expresaba el gen de IL2 murina mediante sonda nasogástrica oral ( $10^8$  ufc en PBS) y 3 y 7 días (T) más tarde se cultivaron las deposiciones para determinar la presencia de todos los *Bacteroides* sp. nativos y los *B. ovatus* recombinantes usando condiciones de cultivo selectivas y el uso de antibióticos. Se cuantificaron las colonias bacterianas (ufc) tras 24 h.

Los resultados muestran que la cepa de *B. ovatus* recombinante coloniza el colon de la mayoría (4/5) de los ratones durante hasta una semana tras una única dosis de bacterias. La presencia del *B. ovatus* recombinante no tiene un impacto apreciable sobre el tamaño de las poblaciones endógenas de *Bacteroides*.

Tabla 2: Colonización de ratones por cepas recombinantes de *B. ovatus*

Ratón	<i>Bacteroides</i> totales ufc g <sup>-1</sup>			<i>B. ovatus</i> recombinante ufc g <sup>-1</sup>		
	T0	T3	T7	T0	T3	T7
1	1,16 x 10 <sup>9</sup>	1,61 x 10 <sup>9</sup>	7,54 x 10 <sup>8</sup>	-	1208	1555
2	1,66 x 10 <sup>9</sup>	3,61 x 10 <sup>8</sup>	4,75 x 10 <sup>8</sup>	-	997	1054
3	1,50 x 10 <sup>9</sup>	4,06 x 10 <sup>8</sup>	3,73 x 10 <sup>8</sup>	-	5263	5409
4	3,81 x 10 <sup>9</sup>	7,77 x 10 <sup>8</sup>	1,08 x 10 <sup>9</sup>	-	0	0
5	1,32 x 10 <sup>9</sup>	5,05 x 10 <sup>8</sup>	2,50 x 10 <sup>8</sup>	-	2105	1636

**EJEMPLO 7**

La figura 5 muestra el mapa de constructo de *B. ovatus* que expresa o bien KGF o bien TGFβ humano. Se cultivaron cepas

recombinantes de *B. ovatus* que expresaban genes que codificaban para o bien KGF (BoHuKGF) o bien TGF $\beta$  (BoHuTGF) humano o cepas control (BoBTS) que no contenían genes heterólogos, en medios completos solos (medios) o en medios que contenían xilano durante 8 ó 24 h antes de someter a ensayo los sobrenadantes de cultivo para detectar TGF $\beta$  y KGF mediante ELISA. Se cultivaron algunos cultivos de *B. ovatus* recombinante con xilano durante 8 h antes de eliminar los medios y cultivar durante otras 24 h en medios completos solos (BoHuKGF/TGF  $\pm$  xilano). La figura 6A muestra las gráficas de las cantidades promedio ( $\pm$ EEM) de citocina presente en los sobrenadantes de cultivo detectadas en 3 experimentos independientes con *B. ovatus* que expresa el gen que codifica para KGF TGF $\beta$  humano (BoHuTGF). La figura 6B muestra los mismos datos experimentales de *B. ovatus* que expresa el gen que codifica para KFG humano (BoHuKGF).

En resumen, la capacidad para modificar por ingeniería genética bacterias comensales para producir moléculas inmnomoduladoras bajo el control de factores de la dieta, tal como se describió anteriormente en el presente documento, ofrece la posibilidad de proporcionar una terapia más medida, específica y controlada para trastornos intestinales crónicos tales como EII. Este enfoque puede usarse para administrar una variedad de moléculas biológicamente relevantes, incluyendo citocinas, enzimas y vacunas, con aplicaciones en el tratamiento y la prevención de una variedad de trastornos.

#### BIBLIOGRAFÍA

Gillis, S., Ferm, M.M. y Smith, K.A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *Journal of Immunology* 120, 2027-2032.



Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

Hespell, R.B. y O'Bryan, P.J. (1992) Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1082-1088.

Hespell, R.B., Wolf, R. y Bohast, R.J. (1987) Fermentation of xylans by *Butyrovibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2849-2853.

Saitoh, S., Noda, S., Aiba, Y., Takagi, A., Sakamoto, M., Benno, Y. y Koga, Y (2002) *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.*, 9, 54.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1990) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shanahan, F. (2001) Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 120, 622-635.

Steidler, L. (2001) Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Microbes and Infection* 3, 1157-1166.

Steidler, L., Wells, J.M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W. y Remaut, E. (1995) Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1627-1629.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K.M., Remaut, E., Le Page, R.W.F. & Wells, J.M. (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing

antigen and cytokine. *Infection and Immunity* 66, 3183-3189.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. y Remaut, E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin 10. *Science* 289, 1352-1355.

Tancula, E., Feldhaus, M.J., Bedzyk, L.A. y Salyers, A.A. (1992) Location and characterization of genes involved in binding of starch to the surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology* 174, 5609-5616.

Valentine, P.J., Arnold, P. y Salyers, A.A. (1992) Cloning and partial characterization of two chromosomal loci from *Bacteroides ovatus* that contain genes essential for growth on guar gum. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1541-1548.

Wadhwa, M., Bird, C., Dilger, P., Mire-Sluis, T. y Thorpe, R. (2000) Quantitative biological assays for individual cytokines. En *Cytokine Cell Biology*, 3ª edición, ed. Balkwill, F. págs. 207-212. Oxford: Oxford University Press.

Whitehead, T.R. y Hespell, R.B. (1990) The genes for three xilano-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3,8-kilobase region. *Journal of Bacteriology* 172, 2408-2412.

## REIVINDICACIONES

1. Bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante que comprende y expresa una proteína o un polipéptido biológicamente activo, comprendiendo la bacteria un operón xilanasa que comprende un promotor de xilanasa de *Bacteroides ovatus* que dirige la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína o el polipéptido terapéutico heterólogo biológicamente activo.
2. Bacteria según la reivindicación 1, en la que el operón xilanasa incluye además una secuencia señal de secreción de enterotoxina de *Bacteroides fragilis*.
3. Bacteria según cualquier reivindicación anterior, en la que la proteína o el polipéptido biológicamente activo usado se deriva de fuentes o bien virales, o bien procariotas o bien eucariotas.
4. Bacteria según cualquier reivindicación anterior, en la que la proteína o el polipéptido biológicamente activo se selecciona del grupo que comprende insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, somatostatina, hormona estimulante del tiroides, vacunas, antígenos, polipéptido intestinal vasoactivo, factores trébol, factores de reparación celulares y tisulares, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor de crecimiento de queratinocitos, una citocina de grupo estructural 1 que adopta un haz de 4 hélices  $\alpha$  antiparalelas seleccionada del grupo que comprende IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- $\gamma$ , EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL o IFN $\alpha/\beta$ , una citocina de grupo estructural 2 seleccionada del grupo que comprende TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , ligandos de CD40, CD27 o FAS, familia IL-1 de citocinas, familia del factor de crecimiento de fibroblastos, factores de

crecimiento derivados de las plaquetas, factor de crecimiento transformante  $\beta$  y factores de crecimiento nerviosos, una citocina de grupo estructural 3, familia de citocinas del factor de crecimiento epidérmico, quimiocinas, citocinas relacionadas con la insulina, y una citocina de grupo estructural 4 seleccionada del grupo que comprende EGF, dominios kringle y de tipo inmunoglobulina.

5

10

5. Bacteria según la reivindicación 4, en la que la proteína o el polipéptido biológicamente activo es un receptor o antagonista para proteínas o polipéptidos biológicamente activos enumerados en la reivindicación 4.

15

6. Bacteria según cualquier reivindicación anterior modificada para expresar una pluralidad de proteínas o polipéptidos biológicamente activos.

20

7. Composición farmacéutica que comprende una bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante según cualquier reivindicación anterior.

25

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable.

30

9. Bacteria comensal intestinal de *Bacteroides ovatus* recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad intestinal inflamatoria, en la que el polipéptido o la proteína se selecciona del grupo que comprende una hormona del crecimiento, un factor trébol, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor de crecimiento de queratinocitos, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , un miembro de la familia IL-1 de citocinas, un miembro de la familia de

citocinas del factor de crecimiento epidérmico, o una quimiocina.

FIGURA 1

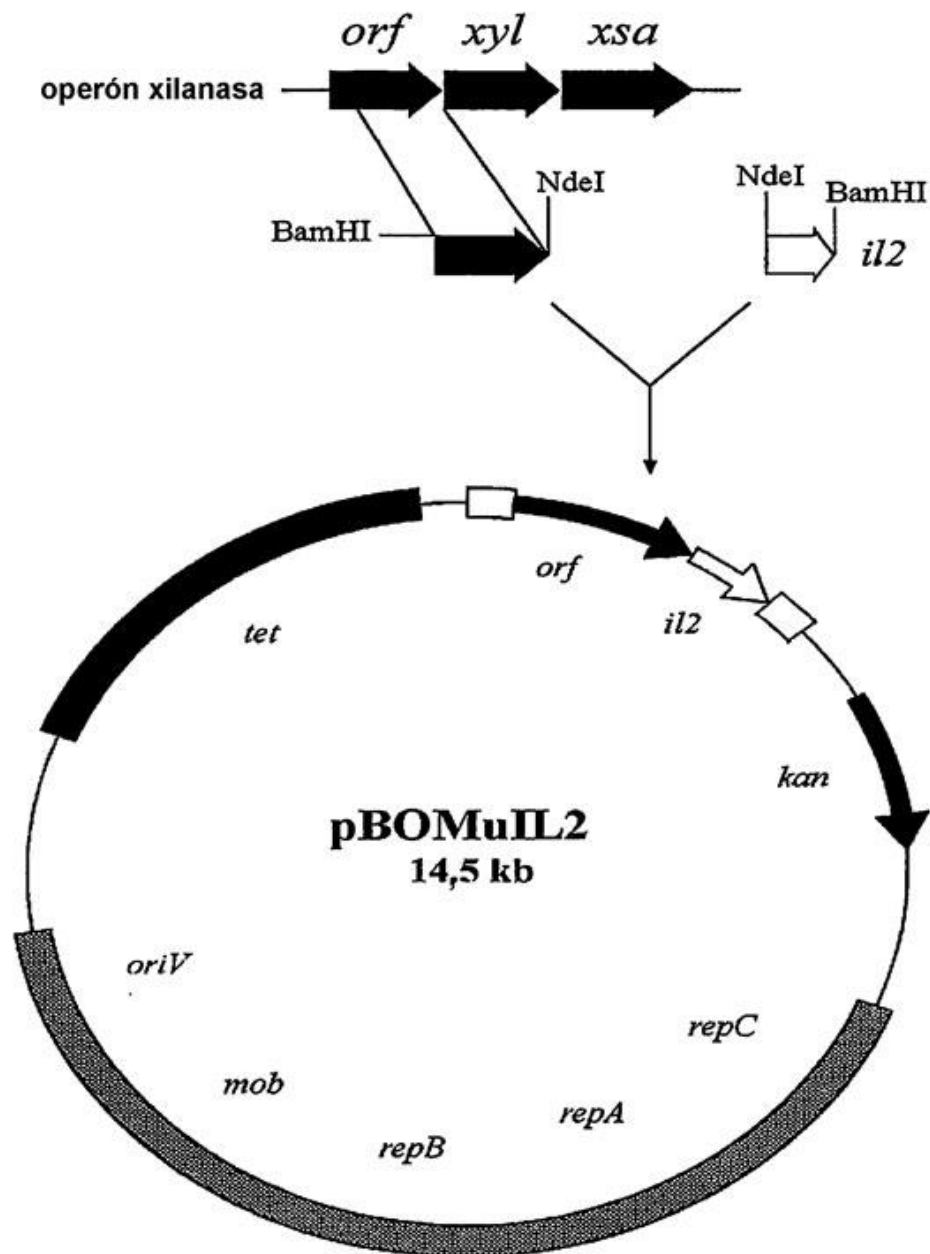


Figura 2

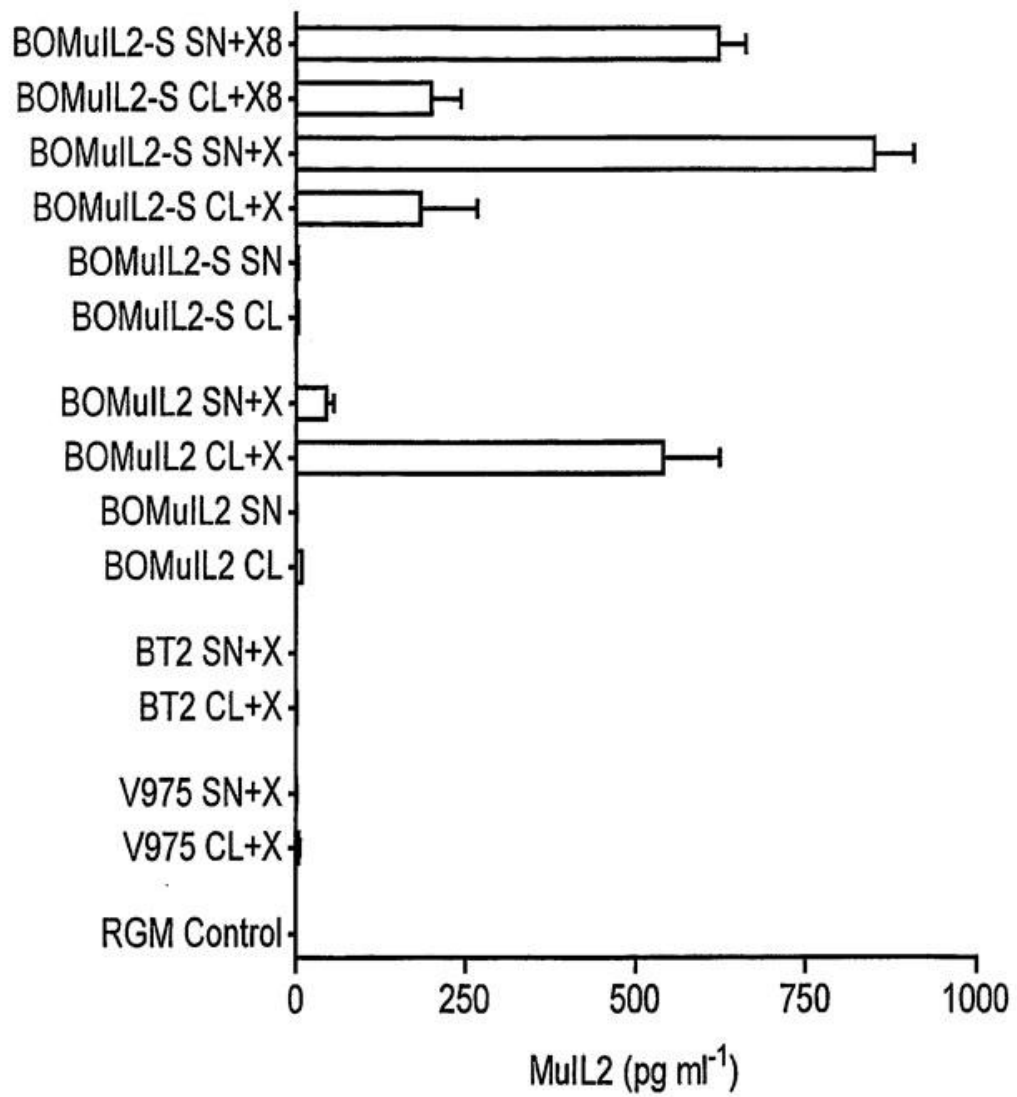


Figura 3

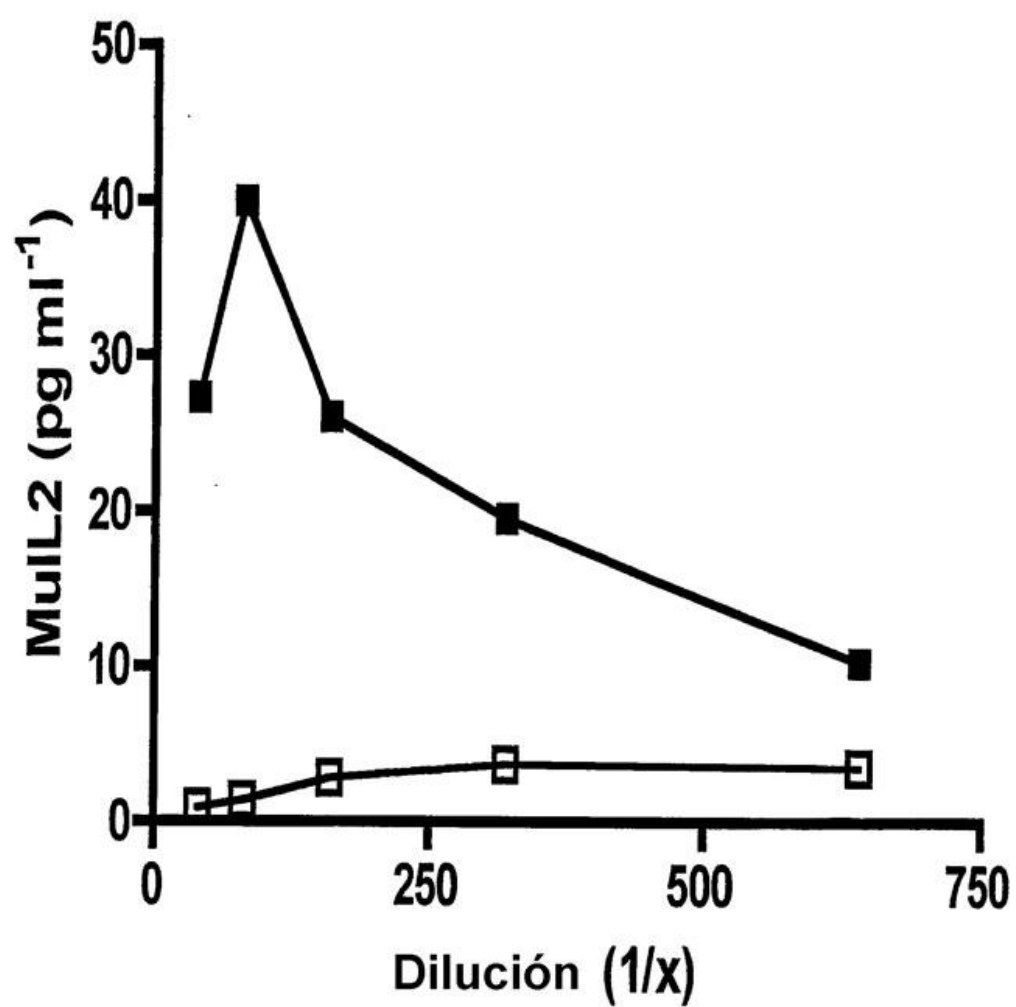




Figura 4

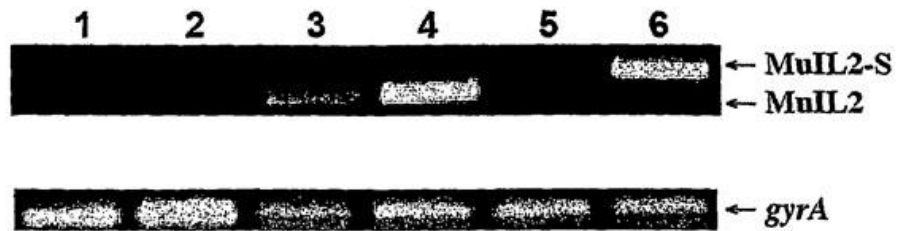


Figura 5

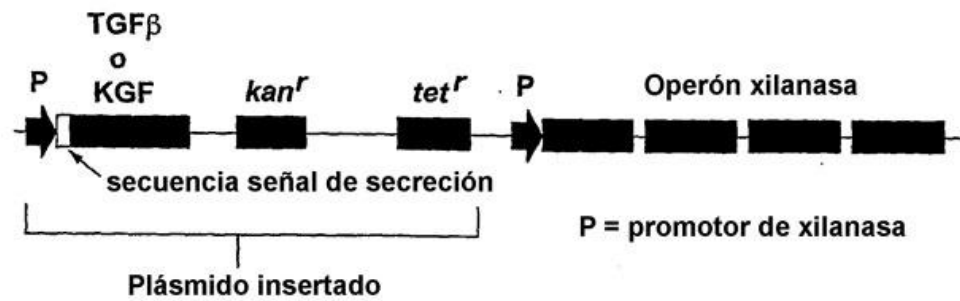


FIGURA 6A

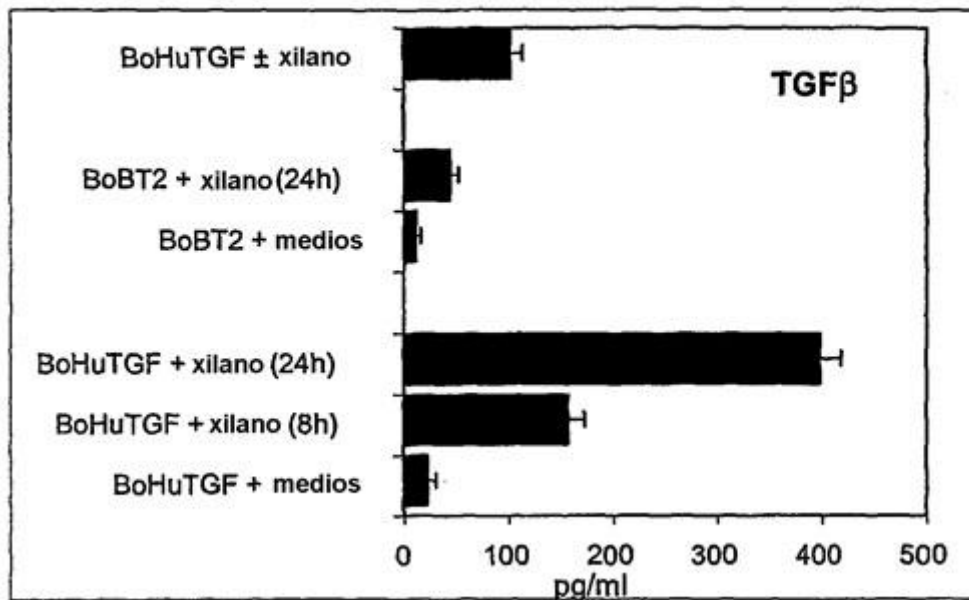


FIGURA 6B

