

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 049**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2016** **PCT/US2016/062369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017** **WO17087580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2016** **E 16810138 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022** **EP 3377518**

54 Título: **Bacterias manipuladas para reducir la hiperfenilalaninemia**

30 Prioridad:

16.11.2015 US 201562256052 P
13.05.2016 WO PCT/US2016/032562

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2022

73 Titular/es:

SYNLOGIC OPERATING COMPANY, INC.
(100.0%)
301 Binney Street, Suite 402
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

FALB, DEAN;
ISABELLA, VINCENT, M.;
KOTULA, JONATHAN, W.;
MILLER, PAUL, F.;
ROWE, SARAH y
MILLET, YVES

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 925 049 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bacterias manipuladas para reducir la hiperfenilalaninemia

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N.º 62/256.052, presentada el 16 de noviembre de 2015 y el documento PCT/US2016/032562, presentada el 13 de mayo de 2016.

10 La presente descripción se refiere a composiciones y procedimientos terapéuticos para reducir la hiperfenilalaninemia. En determinados aspectos, la divulgación se refiere a bacterias manipuladas genéticamente, que son capaces de reducir la hiperfenilalaninemia en un mamífero. En determinados aspectos, las composiciones y los procedimientos descritos en esta invención se pueden utilizar para tratar enfermedades asociadas con la hiperfenilalaninemia, por ejemplo, fenilcetonuria.

15 La fenilalanina es un aminoácido esencial, que se encuentra principalmente en proteína dietética. Típicamente, se utiliza una cantidad pequeña para la síntesis de proteínas y el resto se hidroxila con tirosina en una ruta enzimática, que requiere fenilalanina hidroxilasa (PAH) y el cofactor de tetrahidrobiopterina. La hiperfenilalaninemia es un grupo de
20 enfermedades asociadas con niveles excesivos de fenilalanina, que pueden ser tóxicos y causar daño cerebral. La hiperfenilalaninemia primaria está causada por deficiencias en la actividad de PAH, que es el resultado de mutaciones en el gen PAH y/o un bloqueo en el metabolismo de cofactor.

25 La fenilcetonuria (PKU) es una forma grave de hiperfenilalaninemia causada por mutaciones en el gen PAH. La PKU es una enfermedad genética recesiva autosómica, que se clasifica como el error congénito más común de metabolismo a nivel mundial (1 en 3.000 nacimientos), y afecta a aproximadamente 13.000 pacientes en Estados Unidos. Se han identificado más de 400 diferentes mutaciones genéticas de PAH (Hoeks et al., 2009). Una
30 acumulación de fenilalanina (phe) en la sangre puede causar un daño profundo al sistema nervioso central en niños y adultos. Si no se trata en recién nacidos, la PKU puede causar daño cerebral irreversible. Actualmente, el tratamiento de la PKU implica la exclusión completa de la fenilalanina de la dieta. La mayoría de las fuentes naturales de proteínas contienen fenilalanina, que es un aminoácido esencial y necesario para el crecimiento. En
35 pacientes con PKU, esto significa que dependen de alimentos médicos y complementos de proteínas sin phe junto con complementos de aminoácidos para proporcionar la fenilalanina suficiente para el crecimiento. Esta dieta es difícil para los pacientes y tiene un impacto en la calidad de vida.

40 Como se analiza, las terapias actuales de PKU requieren dietas modificadas sustancialmente, que consisten en restricción de proteínas. El tratamiento desde el nacimiento reduce de manera general el daño cerebral y el retraso mental (Hoeks et al., 2009; Sarkissian et al., 1999). Sin embargo, la dieta restringida en proteínas debe controlarse cuidadosamente y los aminoácidos esenciales, así como las vitaminas, deben
45 complementarse en la dieta. Es más, el acceso a alimentos bajos en proteínas es un reto, ya que son más caros que sus homólogos no modificados altos en proteínas (Vockley et al., 2014).

50 En niños con PKU, es frecuente el retraso del crecimiento en una dieta baja en fenilalanina (Dobbelaere et al., 2003). En la edad adulta, pueden aparecer nuevos problemas, tales como osteoporosis, PKU materna y deficiencias de vitaminas (Hoeks et al., 2009). Los niveles elevados de fenilalanina en la sangre, que puede penetrar libremente la barrera hematoencefálica, también, pueden causar deficiencia neurológica, problemas de conducta

(por ejemplo, irritabilidad, fatiga) y/o síntomas físicos (por ejemplo, convulsiones, erupciones cutáneas, olor corporal rancio). Las pautas internacionales recomiendan la restricción dietética de fenilalanina de por vida, lo que se considera difícil y poco realista (Sarkissian et al., 1999), y "se necesitan esfuerzos continuos para superar el mayor desafío de vivir con PKU: la adherencia de por vida a la dieta baja en phe" (Macleod et al., 2010).

En un subconjunto de pacientes con actividad de PAH residual, se puede utilizar la administración oral del cofactor tetrahidrobiopterina (también denominado THB, BH₄, Kuvan o sapropterina) conjuntamente con restricción dietética para bajar los niveles de fenilalanina en sangre. Sin embargo, la terapia de cofactor es costosa y solamente es adecuada para leves formas de fenilcetonuria. El coste anual de Kuvan, por ejemplo, puede ser tanto como 57.000 \$ por paciente. Además, los efectos secundarios de Kuvan pueden incluir gastritis y reacciones alérgicas graves (por ejemplo, sibilancias, mareos, náuseas, enrojecimiento de la piel).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es capaz de metabolizar fenilalanina hasta niveles no tóxicos de amoníaco y ácido transcinámico. A diferencia de PAH, PAL no requiere actividad del cofactor THB para metabolizar fenilalanina. Se han llevado a cabo estudios de terapia enzimática por vía oral utilizando PAL, pero "los estudios en seres humanos e incluso en animales no se han realizado debido a que PAL no estaba disponible en cantidades suficientes a precios razonables" (Sarkissian et al., 1999). También está en desarrollo una forma pegilada de PAL recombinante (PEG-PAL) como una forma inyectable de tratamiento. Sin embargo, la mayoría de sujetos administrados con una dosis de PEG-PAL han sufrido reacciones en el sitio de inyección y/o han desarrollado anticuerpos a esta enzima terapéutica (Longo et al., 2014). Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha significativa de un tratamiento eficaz, fiable y/o a largo plazo para enfermedades asociadas con la hiperfenilalaninemia, incluida la PKU. Existe la necesidad insatisfecha de un tratamiento que controle los niveles de Phe en la sangre de los pacientes al mismo tiempo que permita el consumo de más proteína natural.

El documento WO 2014/066945 A1 se refiere a un probiótico modificado genéticamente útil para tratar, por ejemplo, la fenilcetonuria.

El documento WO 2013/192543 A2 se refiere a enzimas y procedimientos para la biosíntesis de estireno.

Christodoulou et al. "Abstr. 166. Enzyme substitution therapy for fenilcetonuria delivered orally using a genetically modified probiotic: proof of principle", 62ND Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 6-10 November 2012, San Francisco, vol. 62, 8 de noviembre de 2012 (2012-11-08), - 10 de noviembre de 2012 (2012-11-10), páginas 1-1, se refieren a la entrega de PAL funcional utilizando un probiótico modificado genéticamente.

Resumen

La invención proporciona una bacteria manipulada genéticamente que comprende:

(a) uno o más genes que codifican una fenilalanina amonio liasa (PAL), donde el gen o genes que codifican la PAL están unidos de manera operativa a (i) un promotor termorregulado que no está asociado con el gen PAL en la naturaleza, o (ii) un promotor inducible por isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); y

(b) uno o más genes que codifican un transportador de fenilalanina capaz de transportar fenilalanina a células bacterianas, donde el gen o genes que codifican el transportador de

fenilalanina están unidos de manera operativa a un promotor inducible que no está asociado con el gen transportador de fenilalanina en la naturaleza.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la bacteria de la invención; y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona la composición de la invención para su uso en un procedimiento para reducir la hiperfenilalaninemia o tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia.

La presente descripción se refiere a bacterias manipuladas genéticamente que codifican y expresan una enzima metabolizadora de fenilalanina (PME). En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente que codifican y expresan fenilalanina amonio liasa y/o fenilalanina hidroxilasa y/o L-aminoácido desaminasa y son capaces de reducir la hiperfenilalaninemia.

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es capaz de metabolizar fenilalanina hasta niveles no tóxicos de amoníaco y ácido transcinámico. A diferencia de PAH, PAL no requiere actividad del cofactor THB para metabolizar fenilalanina. La L-aminoácido desaminasa (LAAD) cataliza desaminación oxidativa de fenilalanina para generar fenilpiruvato y rastrea las cantidades de amoníaco y peróxido de hidrógeno. El ácido fenilpirúvico (PPA) se usa ampliamente en las industrias farmacéuticas, alimenticias y químicas, y PPA es el material de partida para la síntesis de D-fenilalanina, un intermediario sin procesar en la producción de muchos fármacos quirales y aditivos alimentarios. Por lo tanto, LAAD se ha estudiado en el contexto de producción de PPA industrial (Hou et al. 2015, Appl Microbiol Biotechnol. octubre de 2015; 99(20):8391-402; "Production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine using an L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*: comparison of enzymatic and whole-cell biotransformation approaches"). El fenilpiruvato es incapaz de traspasar la barrera hematoencefálica (Steele, Fed Proc. junio de 1986; 45(7):2060-4, "Blood-brain barrier transport of the alpha-keto acid analogs of amino acids", lo que indica que esta transformación es útil para controlar los fenotipos neurológicos de PKU.

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente que codifican y expresan una enzima metabolizadora de fenilalanina (PME). En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente que codifican y expresan fenilalanina amonio liasa (PAL) y/o fenilalanina hidroxilasa (PAH) y/o L-aminoácido desaminasa (L-AAD) y son capaces de reducir la hiperfenilalaninemia.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen que codifica fenilalanina amonio liasa (PAL) no nativa y son capaces de procesar y reducir la fenilalanina en un mamífero. Según la invención, las bacterias manipuladas comprenden además un gen que codifica un transportador de fenilalanina, por ejemplo, PheP. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas también pueden comprender un gen que codifica L-AAD. Las bacterias manipuladas también pueden contener una o más secuencias génicas relacionadas con la bioseguridad y/o la biocontención, por ejemplo, un interruptor de destrucción, un sistema de protección de genes y/o auxotrofia. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas pueden contener un gen de resistencia a antibióticos. La expresión de cualquiera de estas secuencias génicas puede regularse usando una diversidad de sistemas promotores, tales como cualquiera de los sistemas promotores divulgados en esta invención, cuyo sistema promotor puede implicar el uso del mismo promotor para regular uno o más genes diferentes, puede implicar el uso de una copia diferente del mismo promotor para regular diferentes genes, y/o puede implicar el uso de diferentes promotores usados en combinación para regular la expresión de diferentes genes. El uso de diferentes

sistemas reguladores o promotores para controlar la expresión génica proporciona flexibilidad (por ejemplo, la capacidad de controlar diferencialmente la expresión génica en diferentes condiciones ambientales y/o la capacidad de controlar diferencialmente la expresión génica temporalmente) y también proporciona la capacidad de "ajustar con precisión" la expresión génica, cuya regulación puede servir para optimizar la expresión génica y/o el crecimiento de las bacterias.

En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente no son patógenas y pueden introducirse en el intestino para reducir los niveles tóxicos de fenilalanina. En determinadas realizaciones, la fenilalanina amonio liasa y/o la fenilalanina hidroxilasa y/o la L-aminoácido desaminasa se producen de manera estable por las bacterias manipuladas genéticamente, y/o las bacterias manipuladas genéticamente se mantienen de manera estable *in vivo* y/o *in vitro*. Según la invención, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además un gen transportador de fenilalanina para aumentar su absorción de fenilalanina. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden bacterias manipuladas genéticamente y procedimientos para modular y tratar trastornos asociados con la hiperfenilalaninemia.

La divulgación también proporciona procedimientos para medir y controlar la actividad de la fenilalanina amonio liasa, y procedimientos para medir y controlar la actividad terapéutica de las bacterias manipuladas genéticamente que expresan la fenilalanina amonio liasa.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** representa una biótica sintética para tratar la fenilcetonuria (PKU) y trastornos caracterizados por hiperfenilalaninemia.

La **figura 2A** representa un esquema de acción de la fenilalanina hidroxilasa en la fenilcetonuria (PKU). La **figura 2B** representa un esquema de acción de la fenilalanina hidroxilasa (PAH). La **figura 2C** representa un esquema de acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL). La **figura 2D** representa un esquema de acción de la L-aminoácido desaminasa (LAAD; por ejemplo, de *Proteus mirabilis*).

La **figura 3** representa una biótica sintética de ejemplo para tratar la fenilcetonuria (PKU) y trastornos caracterizados por hiperfenilalaninemia.

La **figura 4** representa una biótica sintética de ejemplo para tratar la fenilcetonuria (PKU) y trastornos caracterizados por hiperfenilalaninemia.

La **figura 5** representa una biótica sintética de ejemplo para tratar la fenilcetonuria (PKU) y trastornos caracterizados por hiperfenilalaninemia.

La **figura 6** representa la organización génica de una construcción de ejemplo, que comprende un gen, que codifica PAL3 y un secuencia promotora Tet en un plásmido con alto número de copias, por ejemplo, según lo comprendido en SYN-PKU202, SYN-PKU303.

La **figura 7** representa la organización génica de una construcción de ejemplo, que comprende un gen, que codifica PAL3 y un secuencia promotora FNR en un plásmido con bajo número de copias, por ejemplo, según lo comprendido en SYN-PKU304, SYN-PKU307, SYN-PKU305, SYN-PKU306.

La **figura 8** representa la organización génica de una construcción de ejemplo, que comprende un gen, que codifica PAL3 y un secuencia promotora Tet en un plásmido con

bajo número de copias, por ejemplo, SYN-PKU302, SYNPKU201.

La **figura 9** representa la organización génica de una construcción de ejemplo, por ejemplo, comprendida en SYN-PKU401, que comprende un gen LAAD clonado bajo el control de una secuencia promotora Tet y un gen represor Tet.

La **figura 10** muestra una representación esquemática de la construcción de una cepa con inserción génica (*knock-in*) *pheP*, donde se utiliza recombinación para insertar una segunda copia de *pheP* en el gen Nissle *lacZ*.

La **figura 11** representa la organización génica de una construcción de ejemplo, que comprende un gen, que codifica PheP, un gen, que codifica TetR, y una secuencia promotora Tet para inserción cromosómica, por ejemplo, según lo comprendido, por ejemplo, en SYN-PKU203, SYN-PKU401, SYN-PKU402, SYN-PKU302 y SYN-PKU303.

La **figura 12A** representa la organización génica de una construcción de ejemplo, que comprende un gen PAL3 clonado bajo el control de una secuencia promotora FNR, sobre un plásmido de bajo número de copias, resistente a kanamicina. (origen de replicación de pSC101. En condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, PAL3 degrada la fenilalanina en trans-cinamato no tóxico. La **figura 12B** representa una copia adicional del transportador de fenilalanina con alta afinidad por *E. coli* endógeno, *pheP*, impulsado por el promotor PfnrS e insertado en el locus *lacZ* en el cromosoma Nissle.

Las **figuras 13A-C** representan diagramas esquemáticos de casos no limitantes de la divulgación. La **figura 13A** representa componentes de degradación de fenilalanina integrados en el cromosoma Nissle de *E. coli*. En algunos casos, las cepas bacterianas sin plásmido manipuladas se utilizan para prevenir la conjugación de plásmido *in vivo*. En algunos casos, las inserciones múltiples del gen PAL dan como resultado un aumento del número de copias y/o un aumento de la actividad de degradación de fenilalanina. En algunos casos, una copia del transportador de fenilalanina con alta afinidad por *E. coli* endógeno, *pheP*, se impulsa por el promotor PfnrS y se inserta en el locus *lacZ*. La **figura 13B** representa un diagrama esquemático de un caso no limitante de la descripción, donde el cromosoma Nissle de *E. coli* se modifica para contener cuatro copias de PfnrS-PAL insertadas en cuatro sitios de inserción diferentes a lo largo del genoma (*malE/K*, *yicS/nepl*, *agal/rsml* y *cea*), y una copia de un gen transportador de fenilalanina insertado en un sitio de inserción diferente (*lacZ*). En este caso, el gen PAL es PAL3 obtenido de *P. luminescens*, y el gen transportador de fenilalanina es *pheP* obtenido de *E. coli*. En un caso, la cepa es SYN-PKU511. La **figura 13C** representa un diagrama esquemático de un caso de la divulgación, donde el cromosoma Nissle de *E. coli* se modifica para contener cinco copias de PAL bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno (por ejemplo, PfnrS-PAL3) insertado en diferentes sitios de integración en el cromosoma (*malE/K*, *yicS/nepl*, *malP/T*, *agal/rsml* y *cea*), y una copia de un gen transportador de fenilalanina bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno (por ejemplo, PfnrS-*pheP*) insertado en un sitio de inserción diferente en el cromosoma (*lacZ*). El genoma se modifica adicionalmente para incluir un auxótrofo *thyA*, en el que el gen *thyA* se elimina y/o se reemplaza por un gen no relacionado, así como un gen resistente a kanamicina.

La **figura 14** representa la organización génica de una construcción de ejemplo no limitante, que comprende un gen, que codifica *araC*, y un gen, que codifica LAAD de *Proteus mirabilis*, y una secuencia promotora inducible por arabinosa (ParaBAD) para la inserción cromosómica en el operón de arabinosa endógeno para la integración cromosómica, por ejemplo, según lo comprendido en SYN-PKU705.

La **figura 15A** representa concentraciones de fenilalanina en muestras que comprenden bacterias que expresan *PAL1* o en plásmidos de bajo número de copias (LC; SYN-PKU101) o de alto número de copias (HC; SYN-PKU102) o en plásmidos *PAL3* de bajo número de copias (LC; SYN-PKU201) o de alto número de copias (HC; SYN-PKU202), inducidas por tetraciclina anhidra (ATC), y, a continuación, cultivadas en un medio de cultivo complementado con 4 mM (660.000 ng/ml) de fenilalanina. Las muestras se eliminaron en 0 h, 4 h y 23 h. Las concentraciones de fenilalanina se determinaron mediante espectrometría de masas. La **figura 15B** representa los niveles de cinamato en muestras de 4 h y 23 h después de la inducción. En las cepas que expresan *PAL3*, el gen *PAL3* se obtiene de *Photorhabdus luminescens*, una enterobacteria en la misma subdivisión taxonómica que *Escherichia coli*.

La **figura 16A** representa las concentraciones de fenilalanina en muestras que comprenden bacterias que expresan *PAL1* o *PAL3* sobre plásmidos de bajo número de copias (LC) o de alto número de copias (HC), o que comprenden además una copia de *pheP* impulsada por el promotor Tet integrado en el cromosoma. Se indujeron las bacterias con ATC y, a continuación, se cultivaron en un medio de cultivo complementado con 4 mM (660.000 ng/ml) de fenilalanina hasta una DO₆₀₀ de 2,0. Las muestras se eliminaron 0 horas, 2 horas y 4 horas después de la inducción y se determinaron las concentraciones de fenilalanina mediante espectrometría de masas. Principalmente, la copia adicional de *pheP* mejoró la degradación de fenilalanina (4 mM) en 4 h. La **figura 16B** representa los niveles de cinamato en muestras de 2 horas y 4 horas después de la inducción. En algunas realizaciones, puede usarse cinamato como un biomarcador alternativo para determinar la actividad de cepa. La sobreexpresión de *PheP* mejora el metabolismo de fenilalanina en las bacterias manipuladas. Las cepas analizadas en este conjunto de datos son SYN-PKU101, SYN-PKU102, SYN-PKU202, SYN-PKU201, SYN-PKU401, SYN-PKU402, SYN-PKU203, SYN-PKU302, SYN-PKU303.

Las **figuras 17A y 17B** representan el estado de un caso no limitante de la construcción *PAL* en condiciones de no inducción (**figura 17A**) e inducción (**figura 17B**). La **figura 17A** representa una producción relativamente baja de *PAL* y *PheP* en condiciones aerobias debido al oxígeno (O₂), lo que evita que FNR dimerice y active la expresión génica de *PAL* y/o *pheP*. La **figura 17B** representa una producción regulada positivamente de *PAL* y *PheP* en condiciones anaerobias debido a la dimerización de FNR y la inducción de la expresión mediada por el promotor FNR de *PAL* y *pheP* (garabato encima de "PAL" y "pheP"). Las flechas adyacentes a un solo rectángulo o un grupo de rectángulos representan el promotor responsable de impulsar la transcripción (en la dirección de la flecha) de dicho uno o más genes. Las flechas encima de cada rectángulo representan el producto de expresión de cada gen.

La **figura 18** representa niveles de β-galactosidasa en muestras que comprenden bacterias que albergan plásmidos de bajo número de copias que expresan *lacZ* a partir de un promotor sensible a FNR seleccionado de los promotores FNR de ejemplo mostrados en la **Tabla 3** (P_{fnr1-5}). Se usaron diferentes promotores sensibles a FNR para crear una biblioteca de indicadores inducibles por condiciones anaerobias/bajo contenido de oxígeno con una diversidad de niveles de expresión e intervalos dinámicos. Estos promotores incluían fuertes puntos de unión de ribosoma. Los cultivos bacterianos se cultivaron en condiciones aerobias (+O₂) o anaerobias (-O₂). Las muestras se eliminaron en 4 h y se analizó la actividad del promotor basándose en los niveles de β-galactosidasa realizando los ensayos colorimétricos estándares de β-galactosidasa.

La **figura 19A** muestra una representación esquemática del gen *lacZ* bajo el control de un promotor FNR de ejemplo (P_{fnrS}). *LacZ* codifica la enzima β-galactosidasa y es un gen

indicador común en las bacterias. La **figura 19B** representa la actividad del promotor FNR en función de la actividad de β -galactosidasa en SYN-PKU904. SYN-PKU904, una cepa bacteriana manipulada, que alberga un gen de fusión *fnrS-lacZ* de bajo número de copias, se cultivó en presencia o ausencia de oxígeno. Los valores para los ensayos colorimétricos estándares de β -galactosidasa se expresan en unidades Miller (Miller, 1972). Estos datos sugieren que el promotor *fnrS* empieza a impulsar la expresión génica de alto nivel en 1 h en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. La **figura 19C** representa el crecimiento de cultivos de células bacterianas que expresan *lacZ* conforme avanza el tiempo, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Las **figuras 20A y 20B** representan los niveles de fenilalanina producidos en condiciones aerobias (**figura 20A**) o anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno (**figura 20B**) en las muestras Nissle de tipo natural, muestras de bacterias que comprenden un plásmido de bajo número de copias que expresa *PAL3* a partir del promotor Tet o los promotores FNR de ejemplo o que comprenden además una copia de *pheP* impulsada por el promotor Tet e integrada en el cromosoma. Las muestras se incubaron en un medio de cultivo complementado con ATC y 4 mM (660.000 ng/ml) de fenilalanina. Las muestras se eliminaron en 0 h, 2 h, 4 h y 24 h. Las concentraciones de fenilalanina se determinaron mediante espectrometría de masas. Estos datos sugieren que el promotor *fnrS* sensible a FNR es tan eficaz activando la expresión de *PAL3* como un promotor inducible por tetraciclina en condiciones anaerobias.

La **figura 21** representa concentraciones de fenilalanina en cultivos de cepas probióticas sintéticas con y sin una copia adicional de *pheP* insertada en el cromosoma. Después de 1,5 h de crecimiento, los cultivos se colocaron en una cámara anaerobia Coy suministrando N_2 al 90 %, CO_2 al 5 % y de H_2 al 5 %. Después de 4 h de inducción, las bacterias se volvieron a suspender en un tampón de ensayo que contenía fenilalanina 4 mM. Las alícuotas se eliminaron de los ensayos celulares cada 30 min durante 3 h para determinar la cuantificación de fenilalanina mediante espectrometría de masas. Las velocidades de degradación de fenilalanina en cepas, que comprendían una copia adicional de *pheP* (SYN-PKU304 y SYN-PKU305; izquierda) eran mayores que en las cepas que carecían de una copia adicional de *pheP* (SYN-PKU308 y SYN-PKU307; derecha).

La **figura 22** representa las concentraciones de transcinamato (actividad de PAL) para las cepas que comprenden inserciones únicas de *PAL3* en diferentes ubicaciones del cromosoma.

La **figura 23** representa las concentraciones de transcinamato (actividad de PAL) para las cepas que comprenden múltiples inserciones de *PAL3* en diferentes ubicaciones del cromosoma.

La **figura 24** representa las concentraciones de fenilalanina en cultivos de la cepa probiótica sintética SYN-PKU511 conforme avanza el tiempo. Después de 2,5 h de crecimiento, los cultivos se colocaron en una cámara anaerobia Coy suministrando N_2 al 90 %, CO_2 al 5 % y de H_2 al 5 %. Después de 3,5 h de inducción en un medio que contenía fenilalanina, se prepararon extractos de células enteras cada 30 min durante 3 h y se cuantificó la fenilalanina mediante espectrometría de masas. SYN-PKU511 comprende 5 copias integradas de un gen controlado de forma anaerobia (FNR) que codifica la fenilalanina amonio liasa (PAL) en 5 ubicaciones cromosómicas, y un gen controlado de forma anaerobia que codifica un transportador de Phe (*pheP*) con alta afinidad integrado en el locus *lacZ*.

Las **figuras 25A y 25B** representan las concentraciones de fenilalanina en cultivos de una

cepa probiótica sintética, SYN- PKU401, que comprende un plásmido pUC57 de alto número de copias con LAAD impulsado por un promotor inducible por Tet, las células se cultivaron en matraces con agitación a 37 C y se indujeron con TCA en una fase logarítmica temprana durante un período de 2 horas. Las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en un tampón de ensayo que contenía fenilalanina. Las células se midieron en diversas concentraciones celulares y con diferentes niveles de oxígeno. Las células se incubaron de forma aerobia (1 ml) en un tubo de cultivo de 14 ml, con agitación a 250 rpm, se incubaron en condiciones microaerobias, se incubó 1 ml de células en un tubo cónico de 1,7 ml sin agitación, o se incubaron de forma anaerobia en una cámara anaerobia Coy que suministraba N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %. Las alícuotas se eliminaron de los ensayos celulares cada 30 min durante 2 h para determinar la cuantificación de fenilalanina mediante espectrometría de masas. La **figura 25A** representa las concentraciones de fenilalanina en condiciones aerobias usando dos densidades celulares. A y B son duplicados en las mismas condiciones experimentales. La actividad en condiciones aerobias es de ~50 $\mu\text{mol/h/1e9}$ células. La **figura 25B** representa las concentraciones de fenilalanina de células cultivadas de forma aerobia, microaerobia y anaerobia.

La **figura 26A** muestra las concentraciones de fenilalanina antes y después de alimentar un modelo de ratón *in vivo* de PKU. Al comienzo del estudio, a ratones BTBR-*Pah*^{enu2} homocigotos se les dio agua complementada con 100 microgramos/ml de ATC y sacarosa al 5 %. Los ratones permanecieron en ayunas eliminando la comida durante una noche (10 h) y se recogieron las muestras de sangre mediante sangrado mandibular a la mañana siguiente para determinar los niveles de fenilalanina de referencia. A los ratones se les dio comida de nuevo, recibieron por sonda 100 microlitros (5×10^9 UFC) de bacterias (SYN-PKU302 o Nissle de control) después de 1 hora, y se les permitió comer durante otras 2 h. Se determinaron las concentraciones de fenilalanina en suero 2 horas después de la administración por sonda. La **figura 26B** muestra el cambio porcentual (%) en las concentraciones de fenilalanina en sangre antes y después de la alimentación como un promedio en grupos macho o hembra ($p < 0,01$).

Las **figuras 27A y 27B** representan las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia después de la exposición a fenilalanina subcutánea en un modelo de ratón de PKU *in vivo*. Los ratones se alimentaron por sonda oral con 200 μl de H₂O ($n = 30$), SYN-PKU901 ($n = 33$) o SYN-PKU303 ($n = 34$) 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina (0,1 mg/gramo de peso corporal del grupo promedio). Las **figuras 27A y 27B** muestran las concentraciones de fenilalanina en sangre 2 h y 4 h después de inyección de fenilalanina, respectivamente. Estos datos indican que la administración oral de la cepa probiótica manipulada SYN-PKU303 reduce de manera significativa los niveles de fenilalanina en sangre en ratones en comparación con ratones, a los que se les administró el tratamiento simulado (H₂O) o la cepa precursora (SYN-PKU901) (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,00001$). SYNPKU303 es capaz de interceptar la fenilalanina enterorecirculante.

La **figura 28** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia después de la exposición a fenilalanina subcutánea en un modelo de ratón de PKU *in vivo*. Los ratones se alimentaron por sonda oral con 200 μl de H₂O ($n = 30$), SYN-PKU901 ($n = 33$), SYN-PKU303 ($n = 34$) o SYN-PKU304 ($n = 34$) 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina (0,1 mg/gramo de peso corporal del grupo promedio). Las concentraciones de fenilalanina en sangre después de la inyección de fenilalanina indican que SYN-PKU304 (plásmido de bajo número de copias que contiene *fmrS-PAL*) es al menos tan eficaz como SYN-PKU303 (plásmido de alto número de copias que contiene Tet-PAL) en la reducción de los niveles de Phe circulante en el modelo de enterorecirculación.

Las **figuras 29A-D** representan las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto

al valor de referencia después de la exposición a fenilalanina subcutánea en un modelo de ratón de PKU *in vivo*. Los ratones se alimentaron por sonda oral con H₂O, SYN-PKU901, SYN-PKU303 o SYN-PKU304 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina (0,1 mg/gramo de peso corporal del grupo promedio). Las **figuras 29A y 29B** muestran las concentraciones de fenilalanina en sangre 2 h y 4 h después de inyección de fenilalanina, respectivamente. Estos datos indican que la administración oral de las cepas probióticas manipuladas SYN-PKU303 y SYN-PKU304 reduce significativamente los niveles de fenilalanina en sangre en ratones en comparación con ratones a los que se administró el tratamiento simulado (H₂O) o la cepa precursora (SYN-PKU901) (*, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001; ****, p <0,0001). Las **figuras 29C y 29D** representan diagramas de dispersión de los datos mostrados en las **figuras 29A y 29B**.

Las **figuras 30A y 30B** representan las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia después de la exposición a fenilalanina subcutánea en un modelo de ratón de PKU *in vivo*. Los ratones se alimentaron por sonda oral con 200 µl de H₂O (n = 12), 200 µl de SYN-PKU901 (n = 12) o 100, 200 o 400 µl de SYN-PKU304 (n = 12 en cada grupo de dosis) 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina (0,1 mg/gramo de peso corporal del grupo promedio). Las **figuras 30A y 30B** muestran una disminución dependiente de la dosis en los niveles de fenilalanina en sangre en ratones tratados con SYN-PKU304 en comparación con ratones a los que se les administró tratamiento simulado (H₂O) o la cepa precursora (SYN-PKU901) (* 30 % de disminución; p <0,05). Este experimento representa uno de ocho estudios del mismo diseño, y cada estudio muestra que SYN-PKU304 es capaz de interceptar la fenilalanina enterorecirculante.

Las **figuras 31A y 31B** representan un esquema de metabolitos de fenilalanina específicos de PKU y específicos de PAL. La **figura 31A** representa un esquema de la conversión de fenilalanina en ácido fenilpirúvico y ácido fenil-láctico en ausencia de PAH funcional. La **figura 31B** representa un esquema de la conversión de fenilalanina en ácido transcinámico mediante PAL3, que se metaboliza adicionalmente a ácido hipúrico mediante enzimas hepáticas. Estos metabolitos se pueden detectar mediante espectrometría de masas como se describe en los Ejemplos 24-26 o usando otros medios.

Las **figuras 32A, 32B, 32C, 32D, 32E y 32F** representan concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor inicial y las concentraciones de fenilalanina (**figura 32A**) y valores absolutos de fenilalanina y metabolitos específicos de PKU y específicos de PAL (**figuras 32B, 32C, 32D, 32E y 32F**) después de la exposición a fenilalanina por vía subcutánea en un modelo de ratón *in vivo* de PKU. Los ratones se alimentaron por sonda oral con un total de 800 µl de H₂O (n = 12), SYN-PKU901 (n = 12) u 800 µl de SYN-PKU304 (n = 12) (2,9e10 ufc/ratón) 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina. La **figura 32A** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia; la actividad metabólica total para SYN-PKU304 se calculó como 81,2 umol/h y la reducción total en Δphe fue del 45 % con respecto a SYN-PKU901 (P<0,05). La **figura 32B** representa la concentración de fenilalanina en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 32C** representa la concentración de fenilpiruvato en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 32D** representa la concentración de fenil-lactato en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 32E** representa la concentración de ácido t-cinámico en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 32F** representa la concentración de ácido hipúrico en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina.

Las **figuras 33A, 33B, 33C, 33D, 33E y 33F** representan las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia y las concentraciones de fenilalanina (**figura 33A**), y valores absolutos de fenilalanina y metabolitos específicos de PKU y específicos de

PAL (**figuras 33B, 33C, 33D, 33E y 33F**) después de la exposición a fenilalanina por vía subcutánea en un modelo de ratón *in vivo* de PKU. Los ratones se alimentaron por sonda oral con un total de 800 µl de H₂O (n = 9), SYN-PKU801 (n = 12) u 800 µl de SYN-PKU517 (n = 12) (3,6e10 ufc/ratón) 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina. La **figura 33A** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia; la actividad metabólica total para SYN-PKU517 se calculó como 39,6 umol/h y la reducción total en Δphe fue del 17 % con respecto a SYN-PKU801 (P<0,05). La **figura 33B** representa la concentración de fenilalanina en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 33C** representa la concentración de fenilpiruvato en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 33D** representa la concentración de fenil-lactato en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 33E** representa la concentración de ácido t-cinámico en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 33F** representa la concentración de ácido hipúrico en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina.

Las **figuras 34A, 34B, 34C, 34D, 34E y 34F** representan las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia y las concentraciones de fenilalanina (**figura 34A**), y los valores absolutos de fenilalanina y metabolitos específicos de PKU y específicos de PAL (**figuras 34B, 34C, 34D, 34E y 34F**) después de la exposición a fenilalanina por vía subcutánea en un modelo de ratón *in vivo* de PKU. Los ratones se alimentaron por sonda oral con un total de 800 µl de H₂O (n = 12), SYN-PKU901 (n = 12) u 800 µl de SYN-PKU705 (n = 12) (3,6e10 ufc/ratón) 30 y 90 minutos después de la inyección de fenilalanina. La **figura 34A** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia; la actividad metabólica total para SYN-PKU705 se calculó como 133,2 umol/h y la reducción total en Δphe fue del 30 % con respecto a SYN-PKU901 (P<0,05). La **figura 34B** representa la concentración de fenilalanina en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 34C** representa la concentración de fenilpiruvato en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 34D** representa la concentración de fenil-lactato en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 34E** representa la concentración de ácido t-cinámico en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 34F** representa la concentración de ácido hipúrico en sangre 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina.

La **figura 35** representa fenilalanina y 2 análogos tóxicos, p-fluoro-DL-fenilalanina y o-fluoro-DL-fenilalanina, que son útiles para un enfoque no dirigido para seleccionar enzimas de PAL con actividad aumentada. P-fluoro-DL-fenilalanina y o-fluoro-DL-fenilalanina se incorporan en la proteína celular en el sitio de fenilalanina, dando como resultado la muerte celular. Debido a que estos compuestos se absorben fácilmente por PheP y pueden actuar como un sustrato para PAL, como se muestra a continuación, se pueden emplear en la selección y cribado genéticos para la identificación de cepas con una mejor actividad de consumo de Phe. Las mutaciones, que permiten un metabolismo de PAL más eficiente pueden prevenir la incorporación del análogo de fenilalanina en la proteína celular, por lo tanto, permitiendo el crecimiento a concentraciones más altas del análogo.

La **figura 36** representa un gráfico de barras que muestra la tasa de ácido transcinámico producido usando fenilalanina o diversos péptidos que contienen fenilalanina como sustrato. Los resultados indican que las cepas de PKU fueron capaces de degradar Phe rápidamente incluso en forma de dipéptidos y tripéptidos y que las bacterias manipuladas genéticamente podrían administrarse con alimentos, ya que la proteína dietética se descompondrá en dipéptidos y tripéptidos y estaría disponible como sustrato bacteriano.

La **figura 37** representa un gráfico de barras que muestra el efecto de pheP, varios números de copias de PAL y la adición adicional de LAAD sobre la velocidad de degradación de

fenilalanina *in vitro*. Los resultados demuestran que aumentar el número de copias de PAL aumenta la velocidad de degradación de fenilalanina. La adición del transportador de alta afinidad pheP anula la limitación del transporte, lo que permite una mayor actividad de PAL. El número de copia del transportador no aumenta la velocidad (PAL, y transporte nulo (pheP), es limitante). En presencia de oxígeno, LAAD puede degradar Phe a una velocidad extremadamente alta.

La **figura 38A**, la **figura 38B** y la **figura 38C** representan gráficos de barras que muestran mediciones para la caracterización del modelo de enterorrecirculación de fenilalanina. Los ratones PKU se mantuvieron con comida libre de Phe y se les inyectó por vía subcutánea fenilalanina (0,1 mg/kg de peso corporal) a T = 0. Se tomaron muestras de sangre en los puntos temporales indicados para determinar la cinética de la postinyección de Phe en suero. Los gráficos de Whisker en la **figura 38A** y la **figura 38B** muestran la distribución de los niveles de Phe en sangre de ratón, tanto los niveles globales de Phe (**figura 38A**) como el cambio en los niveles de Phe desde T0 (**figura 38B**). Como se ve en la **figura 38C**, los niveles de Phe se elevan de manera estable durante al menos un período de 6 horas.

La **figura 39** representa un gráfico que muestra las concentraciones totales de fenilalanina marcada tras la exposición subcutánea a 13C-Phe medidas para determinar el grado de recirculación en el modelo de ratón PKU (*enu2*). Todos los ratones se mantuvieron con comida libre de Phe con agua baja en Phe hasta la inyección en T0 con 0,1 mg/kg de 13C6-Phe. Se tomaron efluentes sanguíneos e intestinales a los 0, 20 min y 2 horas y se determinaron las concentraciones de fenilalanina por LC-MS. Se confirmó que se producía enterorrecirculación de 13C-Phe marcada. Además, también se determinó la concentración de Phe sin marcar y se detectó un alto nivel de fenilalanina preexistente (sin marcar) en el intestino delgado (datos no mostrados).

La **figura 40A**, la **figura 40B** y la **figura 40C** representan gráficos que muestran el contenido de aminoácidos en diversos compartimentos en ratones de tipo natural y *enu2*^{-/-}. La **figura 40A** representa gráficos que muestran mediciones del contenido de aminoácidos en la sangre. La **figura 40B** representa gráficos que muestran mediciones del contenido de aminoácidos en el intestino delgado. La **figura 40C** representa gráficos que muestran mediciones del contenido de aminoácidos en el intestino grueso. Los niveles de Phe eran altos en sangre *enu2*^{-/-}, como era de esperar. No se observaron otras diferencias importantes entre los ratones WT y *enu2*^{-/-}.

La **figura 41A** y la **figura 41B** representan gráficos que muestran las concentraciones absolutas de fenilalanina (**figura 41A**) y el cambio en la fenilalanina en relación con el valor de referencia (**figura 41B**) tras la administración por sonda con una cepa que comprende PfnrS-PAL de bajo número de copias, PfnrS-pheP cromosómico (SYN -PKU305) en un modelo de dieta rápida de PKU. En este modelo, los ratones *Enu2* mantuvieron una alimentación regular hasta el momento de la dosificación. La comida se retira en T0. Los ratones recibieron dosis cada hora durante 3 h (4 dosis en total; 0, 1, 2, 3 h) y se desangraron en la 4ª hora para determinar la concentración de Phe en suero. Los ratones tratados con probiótico (SYN-PKU305) muestran una disminución más rápida de la Phe en suero.

La **figura 42A** y la **figura 42B** representan gráficos que muestran el efecto de la administración de SYN-PKU305 (que comprende pSC101-PfnrS-PAL3 de bajo número de copias, y un lacZ::PfnrS-pheP cromosómico) con gelatina como portador en agua potable (5e9 células/ml) después de la exposición a Phe. Los ratones *Enu2* se mantuvieron con comida regular durante todo el experimento.

La **figura 43A** y la **figura 43B** representan una tabla (**figura 43A**) y un gráfico lineal (**figura 43B**) que muestran que la actividad *in vitro* e *in vitro* se correlacionan, pero a continuación alcanzan un máximo de actividad *in vivo* con una disminución de aproximadamente el 50 % en deltaPhe.

5

La **figura 44A**, la **figura 44B**, la **figura 44C** y la **figura 44D** representan gráficos de barras de las concentraciones de ácido transcinámico (TCA) y ácido hipúrico en sangre (**figura 44A** y **figura 44B**) y en orina (**figura 44C** y **figura 44D**) después de la exposición subcutánea con fenilalanina en un modelo de ratón *in vivo* de PKU. Los ratones recibieron por sonda oral un total de 750 µl de H₂O (n = 12), SYN-PKU901 (Nissle resistente a estreptomicina; n = 12; 3x250 ul; 1x10¹¹ ufc/ratón en total durante 3 tomas por sonda), o 750 µl de SYN-PKU706 (que comprendía 2 inserciones cromosómicas de PAL (2XfmrS-PAL (malEK, malPT)) y 2 inserciones cromosómicas de *pheP* (2XfmrS-pheP (lacZ, HA1/2)) y un cromosoma de LAAD (Para::LAAD) y auxotrofia *dapA* y resistencia al cloranfenicol; n = 12; 3x250 ul; 1x10¹¹ ufc/ratón en total durante 3 tomas por sonda) a las 1, 2 y 3 h después de la inyección de fenilalanina. La **figura 44A** representa las concentraciones de TCA en suero 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 44B** representa la concentración de ácido hipúrico en suero 0 y 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 44C** representa la concentración de TCA en orina 4 horas después de la inyección de fenilalanina. La **figura 44D** representa la concentración de ácido hipúrico en orina 4 horas después de la inyección de fenilalanina. Estaban presentes bajos niveles de TCA tanto en orina como en suero. Se detectaron niveles más bajos de ácido hipúrico en suero. Se detectaron los niveles más altos de ácido hipúrico en la orina, lo que indica que la mayoría del TCA generado por la bacteria se convierte en ácido hipúrico en el hígado y se excreta en la orina. Se midieron niveles similares de metabolitos en orina cuando se administraron otras cepas de PKU eficaces.

La **figura 45A** y la **figura 45B** representan la cantidad de TCA (**figura 45A**) y ácido hipúrico (**figura 45B**) recuperados tras la administración por sonda oral de 0,0125, 0,025, 0,05 o 0,1 mg/g de TCA 4 horas después de la administración por sonda. Los ratones PKU recibieron sonda oral 0,0125, 0,025, 0,05 o 0,1 mg/g de TCA (3 ratones por jaula, 2 jaulas por grupo). Se recogieron orina, heces y sangre 4 horas después de la administración por sonda y se analizaron para determinar el TCA y su principal producto de descomposición, ácido hipúrico. Se detectaron cantidades insignificantes de TCA e hipurato en sangre y heces (datos no mostrados). Se observó una recuperación casi total de TCA en forma de hipurato. Estos datos indican que 1 mol de hipurato encontrado en la orina equivale a 1 mol de Phe convertido en TCA en el intestino delgado en un ratón PKU tras la administración de una cepa de PKU.

La **figura 46** representa un gráfico que muestra la cinética de conversión de TCA en ácido hipúrico durante un transcurso de tiempo de 6 horas en ratones PKU (*enu2*^{-/-}) después de la exposición a Phe. Los animales se transfirieron a jaulas metabólicas (3 ratones por jaula, 2 jaulas por grupo) y se recogieron muestras de orina 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas después de la dosis de TCA. El TCA se convierte en hipurato y se excreta en la orina en 4 horas.

45

La **figura 47A**, la **figura 47B**, la **figura 47C**, la **figura 47D**, la **figura 47E** y la **figura 47F** representan diagramas esquemáticos de casos no limitativos de cromosomas bacterianos manipulados genéticamente de la divulgación. La **figura 47A** representa un diagrama esquemático de la organización génica de un cromosoma bacteriano de ejemplo que comprende componentes de degradación de fenilalanina integrados en el cromosoma de Nissle de *E. coli*. SYN-PKU707 comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X fmrS-PAL (malP/T, yicS/nepl, malE/K)) y dos copias de *pheP* (2XfmrS-pheP (lacZ, agal/rsml)). SYN-PKU707 comprende además una copia del factor de transcripción FNR

50

mutado FNRS24Y (Para::FNRS24Y). La **figura 47B** representa un diagrama esquemático de la organización génica de un cromosoma bacteriano de ejemplo, por ejemplo, como se observa en la cepa SYN-PKU708. El cromosoma bacteriano comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X fnrS-PAL (malP/T, yicS/nepl, malE/K)) y dos copias de pheP (2XfnrS-pheP (lacZ, agal/rsml)). El cromosoma bacteriano comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y (Para::FNRS24Y) y una copia de la LAAD insertada en el mismo sitio de inserción (el operón de arabinosa), que se transcribe como un mensaje bicistrónico del promotor endógeno de arabinosa. El cromosoma bacteriano comprende además una auxotrofia dapA (deltaDapA). La **figura 47C** representa un diagrama esquemático de la organización génica de un cromosoma bacteriano de ejemplo, por ejemplo, como se observa en SYN-PKU709. El cromosoma bacteriano comprende tres inserciones de PAL3 (3X fnrS-PAL (malP/T, yicS/nepl, malE/K)) y dos copias de pheP (2XfnrS-pheP (lacZ, agal/rsml)). El cromosoma bacteriano comprende además una copia de la LAAD insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::LAAD). El genoma se manipula adicionalmente para incluir una auxotrofia dapA, en la que se elimina el gen dapA. La **figura 47D** representa un diagrama esquemático de la organización génica de un cromosoma bacteriano de ejemplo, por ejemplo, como se observa en SYN-PKU710. El cromosoma bacteriano comprende tres inserciones de PAL3 (3X fnrS-PAL (malP/T, yicS/nepl, malE/K)) y dos copias de pheP (2XfnrS-pheP (lacZ, agal/rsml)). El cromosoma bacteriano comprende además una copia de la LAAD insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::LAAD). El cromosoma bacteriano comprende además dos copias de PAL3 inducible por IPTG (2XLacIPAL, exo/cea y rhtC/rhtB), una auxotrofia dapA y se cura de todas las resistencias a los antibióticos.

La **figura 47E** representa un diagrama esquemático de la organización génica de un cromosoma bacteriano de ejemplo, por ejemplo, como se observa en SYN-PKU712. SYN-PKU712 corresponde esencialmente a SYN-PKU707 con una auxotrofia dapA. El cromosoma bacteriano comprende tres copias de fnrSPAL3, dos copias de fnrSpheP integradas en el cromosoma y con inserción Para-FNRS24Y y deltadapA (auxotrofia de DAP). SYN-PKU712 corresponde esencialmente a SYN-PKU707 con una auxotrofia dapA. La **figura 47F** representa un diagrama esquemático de la organización génica de un cromosoma bacteriano de ejemplo, por ejemplo, como se observa en SYN-PKU711. SYN-PKU711 corresponde esencialmente a SYN-PKU708 sin una auxotrofia dapA. El cromosoma bacteriano comprende 3 copias de -fnrSPAL3, dos copias de fnrSpheP integradas en el cromosoma e insertadas en Para-FNRS24Y-LAAD.

La **figura 48A** y la **figura 48B** representan la organización génica de construcciones de ejemplo. La **figura 48A** representa una construcción que comprende FNRS24Y impulsado por el promotor inducible por arabinosa y araC en dirección inversa. SYN-PKU707 y SYN-PKU712 son ejemplos de cepas que incluyen una construcción de este tipo (integrada en el operón de arabinosa). Las secuencias de ejemplo incluyen la SEQ ID NO: 64. La **figura 48B** representa una construcción en la que FNRS24Y y LAAD se expresan como un mensaje bicistrónico de un promotor inducible por arabinosa. AraC se transcribe en la orientación inversa. SYN-PKU708 es un ejemplo de una cepa que incluye tal construcción (integrada en el operón de arabinosa). Las secuencias de ejemplo incluyen la SEQ ID NO: 73. En algunas realizaciones, la expresión de FNRS24Y (de una construcción mostrada en la **figura 48A** o la **figura 48B**) se induce como parte de un interruptor de derivación de oxígeno como se muestra en la **figura 50**. En algunos casos, las construcciones de la **figura 48A** y/o la **figura 48B** se usan en combinación con construcciones PAL3, pheP y/o LAAD inducibles con bajo contenido de oxígeno. En algunas realizaciones, las construcciones se sitúan en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. En algunas realizaciones, las construcciones se sitúan en un componente

plasmídico de un sistema de bioseguridad. En algunas realizaciones, las construcciones se integran en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En un ejemplo no limitante, las construcciones de la **figura 48A** o la **figura 48B** se insertan en el operón de arabinosa de *E. coli* y se impulsan por el promotor de arabinosa endógeno.

5

La **figura 49** representa la organización génica de una construcción de ejemplo que comprende LacI en orientación inversa, y un promotor inducible por IPTG que impulsa la expresión de PAL3. SYN-PKU710 es un ejemplo no limitante de una cepa que comprende tal construcción. En SYN-PKU710, *lacPAL* se inserta en locus *exo/cea*. La secuencia de ejemplo incluye la SEQ ID NO: 74. En algunas realizaciones, esta construcción es útil para la preinducción y la precarga de una cepa terapéutica antes de la administración *in vivo* en condiciones aerobias y en presencia de un inductor, por ejemplo, IPTG. En algunos casos, esta construcción se usa sola. En algunas realizaciones, la construcción se usa en combinación con otras construcciones PAL3 constitutivas o inducibles, por ejemplo, construcciones de bajo contenido de oxígeno, arabinosa o inducibles por IPTG. En algunas realizaciones, la construcción se usa en combinación con una construcción inducible con bajo contenido de oxígeno que es activa en un entorno *in vivo*.

10

15

20

25

En algunas realizaciones, la construcción se sitúa en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. En algunas realizaciones, la construcción se sitúa en un componente plasmídico de un sistema de bioseguridad. En algunas realizaciones, la construcción se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En algunas realizaciones, la construcción se usa en combinación con una construcción PheP, que puede proporcionarse en un plásmido o se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. La expresión de PheP puede ser constitutiva o impulsarse por un promotor inducible, por ejemplo, bajo contenido de oxígeno, arabinosa o IPTG. En algunas realizaciones, la construcción se usa en combinación con una construcción para la expresión de LAAD.

30

35

En algunas realizaciones, las secuencias PAL3 de las construcciones son la secuencia original de *Photorhabdus chemiluminescens*. En algunas realizaciones, las secuencias de PAL3 se optimizan por codones para la expresión en *E. coli*. En algunas realizaciones, la construcción se sitúa en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo o alto número de copias. En algunas realizaciones, la construcción se emplea en un sistema de bioseguridad, tal como el sistema mostrado en la **figura 61A**, la **figura 61B**, la **figura 61C** y la **figura 61D**. En algunas realizaciones, la construcción se integra en el genoma en una o más ubicaciones descritas en esta invención.

40

45

50

La **figura 50** representa un "interruptor de derivación de oxígeno" útil para la preinducción aerobia de una cepa que comprende una o más PME y/o transportadores de Phe bajo el control de un promotor FNR con bajo contenido de oxígeno *in vitro* en un recipiente de cultivo (por ejemplo, matraz, fermentador u otro recipiente, por ejemplo, usado durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular). En algunas realizaciones, es deseable precargar una cepa con PME activa, por ejemplo, PAL3 y/o LAAD antes de la administración. Esto se puede hacer preinduciendo la expresión de estas enzimas a medida que las cepas se propagan (por ejemplo, en matraces, fermentadores u otras vesículas apropiadas) y se preparan para la administración *in vivo*. En algunas realizaciones, las cepas se inducen en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, para inducir la actividad del promotor FNR e impulsar la expresión de una o más PME y/o transportadores de Phe. En algunas realizaciones, es deseable preparar, precargar y preinducir las cepas en condiciones aerobias o microaerobias. Esto permite un crecimiento más eficiente y, en algunos casos, reduce la acumulación de metabolitos tóxicos.

FNRS24Y es una forma mutada de FNR que es más resistente a la inactivación por oxígeno y, por lo tanto, puede activar promotores FNR en condiciones aerobias (véase, por ejemplo, Jervis AJ, The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion, Proc Natl Acad Sci U S A. 24 de marzo de 2009;106(12):4659-64).

The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion, Proc Natl Acad Sci U S A. 24 de marzo de 2009;106(12):4659- 64).

En este sistema de derivación de oxígeno, FNRS24Y se induce mediante la adición de arabinosa y, a continuación, impulsa la expresión de PAL3, pheP mediante la unión y la activación del promotor FNR en condiciones aerobias. Por lo tanto, las cepas se pueden cultivar, producir o fabricar de manera eficiente en condiciones aerobias, mientras se preinducen y se precargan de manera eficaz, ya que el sistema aprovecha el fuerte promotor FNR que da como resultado altos niveles de expresión de PAL y PheP. Este sistema no interfiere ni compromete la activación *in vivo*, ya que el FNRS24Y mutado ya no se expresa en ausencia de arabinosa, y el FNR de tipo natural se une al promotor FNR e impulsa la expresión de PAL3 y PheP *in vivo*.

Este sistema también se puede usar para impulsar la expresión de LAAD a partir de un promotor FNR durante la producción de la cepa (no se muestra). En otras realizaciones descritas en esta invención, la expresión de LAAD también se puede inducir de forma aerobia, por ejemplo, mediante arabinosa. Como tal, LAAD y FNRS24Y pueden inducirse simultáneamente en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, FNRS24Y y LAAD se transcriben como un mensaje bicistrónico cuya expresión se impulsa por un promotor de arabinosa. En algunas realizaciones, FNRS24Y se inserta en el operón de arabinosa, permitiendo que se impulse la expresión del promotor Para endógeno. En algunas realizaciones, FNRS24Y-LAAD se inserta en el operón de arabinosa, permitiendo que se impulse la expresión del promotor Para endógeno.

En algunas realizaciones, en este sistema se usan un promotor LacI e inducción por IPTG (en lugar de Para e inducción por arabinosa). En algunas realizaciones, en este sistema se usa un promotor inducible por ramnosa. En algunas realizaciones, se usa un promotor sensible a la temperatura para impulsar la expresión de FNRS24Y.

La **figura 51** representa un gráfico de barras que muestra la actividad de PAL *in vitro* de SYN-PKU707 (3XP_{fmrS}-PAL3; 2XP_{fmrS}pheP; P_{ara}-fmr^{S24Y}) según lo medido por la tasa de ácido transcinámico (TCA) producido. Las células se indujeron de forma aerobia o anaerobia en presencia o ausencia de arabinosa. Los cultivos se cultivaron en matraces de 10 ml, 20 ml o 30 ml. La expresión de fmrS24Y inducida por arabinosa da como resultado una actividad de alto nivel en condiciones aerobias en matraces de 10 ml, 20 ml o 30 ml. Además, se mantiene la activación en ausencia de arabinosa en condiciones anaerobias. Estos resultados indican que esta cepa se preinduce eficazmente en condiciones aerobias antes de la administración *in vivo*. Estos resultados también proporcionan una indicación de que la activación anaerobia sin arabinosa, por ejemplo, la activación "*in vivo*" probablemente se conserva en esta cepa.

La **figura 52** representa un gráfico de barras que muestra las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia después de la exposición a fenilalanina subcutánea en un modelo de ratón de PKU *in vivo*. Los ratones recibieron por sonda oral tres veces un total de 750 µl de H₂O (n = 9), SYN-PKU901 (n = 9) u 800 µl de

SYN-PKU707 (n = 9) (1×10^{11} ufc/ratón) 1, 2 y 3 horas después de la inyección de fenilalanina y se recogieron sangre y orina 4 horas después de la inyección. La **figura 52** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia; la actividad metabólica total para SYN-PKU707 se calentó como 269 $\mu\text{mol/h}$ y la reducción total en Δphe fue = 49 % ($P < 0,05$) con respecto a SYN-PKU901 ($P < 0,05$).

La **figura 53** representa un gráfico de barras que muestra los valores absolutos de hipurato recuperado de la orina después de la exposición a fenilalanina subcutánea en un modelo de PKU de ratón *in vivo*. Los ratones recibieron por sonda oral tres veces un total de 750 μl de H₂O (n = 9), SYN-PKU901 (n = 9) u 800 μl de SYN-PKU707 (n = 9) (1×10^{11} ufc/ratón) 1, 2 y 3 horas después de la inyección de fenilalanina y se recogieron sangre y orina 4 horas después de la inyección. La **figura 53** representa la concentración de hipurato en orina 4 horas después de la inyección de fenilalanina. Estos resultados indican que aproximadamente el 15-20 % de la fenilalanina inyectada se convierte en hipurato. La fenilalanina se convierte en TCA en el intestino delgado, que a continuación se convierte en hipurato en el hígado.

La **figura 54A** y la **figura 54B** representan gráficos que muestran la recuperación de cantidades absolutas de hipurato no marcado (**figura 54A**) y marcado (**figura 54B**) en la orina después de la inyección SC con fenilalanina radiomarcada en ratones que recibieron por sonda 3 veces SYN-PKU707. Los ratones en jaulas metabólicas (3 ratones/jaula; 3 jaulas/grupo) recibieron por sonda 3 veces SYN1780 después de la inyección SC de Phe pesado (1, 2 y 3 h después de la inyección).

La **figura 55** representa un gráfico que muestra el ácido hipúrico recuperado en la orina después de una dosis única de la cepa de PKU SYN-PKU707 T0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la exposición a Phe. A los ratones se les administró por sonda (en una sola administración por sonda) diferentes números de células, como se indica. Se observó un aumento dependiente de la dosis en el hipurato recuperado en la orina de los ratones.

La **figura 56** representa un gráfico que muestra la recuperación de hipurato en la orina y compara la cinética de la generación de ácido hipúrico a partir de fenilalanina a través de la administración por sonda de células vivas con la generación de ácido hipúrico derivado de la administración por sonda de TCA puro. Con TCA puro, se observa una rápida disminución en la recuperación de hipurato en la orina en los primeros 15 minutos posteriores al inicio de la recogida. En el caso de las células, la recuperación de hipurato se mantiene durante al menos los primeros 30 min después de que comienza la recogida y tiene una pendiente descendente decreciente. Estos resultados indican que las células permanecen en el intestino delgado produciendo TCA durante un tiempo útil.

La **figura 57A** y la **figura 57B** muestran gráficos de barras que muestran el cambio en la fenilalanina con respecto al valor de referencia en la sangre (**figura 57A**) y los niveles absolutos de ácido hipúrico en la orina (**figura 57B**) 4 horas después de la exposición a la fenilalanina en ratones PKU que recibieron por sonda SYN-PKU708 a las dosis indicadas. SYN-PKU708 fue eficaz para reducir la fenilalanina en sangre y el hipurato se excretó de forma dependiente de la dosis en las jaulas de ratones tratados con SYN-PKU708, lo que indica que las células estaban activas *in vivo*.

La **figura 58A** y la **figura 58B** representan gráficos que muestran el tiempo de tránsito de las bacterias (SYN1780) después de una única administración por sonda de $\sim 3 \times 10^{10}$ ufc. Los ratones recibieron por sonda una vez bacterias (aproximadamente 3×10^{10} UFC). En cada punto temporal (15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración por sonda), los animales (n = 4) se sacrificaron y el intestino delgado se extirpó, se cortó en tres partes

iguales y se lavó abundantemente. Los efluentes intestinales se procesaron en siembra de dilución en serie para determinar el número de bacterias.

La **figura 59A** y la **figura 59B** muestran las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia 4 horas después de la inyección SC de fenilalanina (**figura 59A**) y los valores absolutos de ácido hipúrico hasta 4 horas después de la inyección SC de fenilalanina (**figura 59B**), comparando las cepas SYN-PKU710 y SYN-PKU708. A los ratones se les administró una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea a razón de 0,1 mg por gramo de peso corporal. 1, 2 y 3 h después de la exposición a Phe, se administraron las bacterias (o agua) a los ratones por sonda oral (300 ul/dosis, un total de 3xe10 ufc/ratón). Se calculó que la disminución porcentual en deltaPhe SYN-PKU710 y SYN-PKU708 era del 29 % y el 40 %, respectivamente.

La **figura 60** representa un gráfico de barras que muestra la actividad de PAL *in vitro* en cepas en las que la expresión de PAL está bajo el control de diversos promotores inducibles (arabinosa, IPTG(LacI), ramnosa, Tet, temperatura (CI857) según lo medido por la tasa de acumulación de TCA. SYN-PKU707 se muestra como control de referencia.

Las **figuras 61A-61D** representan esquemas de ejemplos no limitantes de la organización génica de plásmidos, que funcionan como un componente de un sistema de bioseguridad (**figura 61A** y **figura 61B**), que también contiene un componente cromosómico (mostrado en la **figura 61C** y la **figura 61D**). El vector del sistema de plásmidos de bioseguridad comprende la toxina Kid y R6K minimal ori, dapA (**figura 61A**) y thyA (**figura 61B**) y elementos promotores que impulsan la expresión de estos componentes. En un ejemplo no limitante, el plásmido comprende la SEQ ID NO: 81. En un ejemplo no limitante, el plásmido comprende la SEQ ID NO: 82. En algunas realizaciones, bla se desactiva y se reemplaza por una o más construcciones descritas en esta invención, en las que PAL3 y/o PheP y/o LAAD se expresan a partir de un promotor inducible o constitutivo. La **figura 61C** y la **figura 61D** representan esquemas de la organización génica del componente cromosómico de un sistema de bioseguridad. La **figura 61C** representa una construcción que comprende Rep (Pi) de bajo número de copias y la antitoxina Kis, en la que la transcripción de Pi (Rep), que se requiere para la replicación del componente plasmídico del sistema, se impulsa por un promotor que contiene RBS de bajo número de copias. En algunas realizaciones, la construcción comprende la SEQ ID NO: 89. La **figura 61D** representa una construcción que comprende Rep (Pi) de un número medio de copias y la antitoxina Kis, en la que la transcripción de Pi (Rep), que se requiere para la replicación del componente plasmídico del sistema, se impulsa por un promotor que contiene RBS de un número medio de copias. En algunas realizaciones, la construcción comprende la SEQ ID NO: 90. Si se usa el plásmido que contiene DapA funcional (como se muestra en la **figura 61A**), entonces las construcciones cromosómicas que se muestran en la **figura 61C** y la **figura 61D** se insertan en el locus DapA. Si se usa el plásmido que contiene ThyA funcional (como se muestra en la **figura 61B**), entonces las construcciones cromosómicas que se muestran en la **figura 61C** y la **figura 61D** se insertan en el locus ThyA. En este sistema, las bacterias que comprenden la construcción cromosómica y un gen dapA o thyA desactivado pueden crecer en ausencia de dap o timidina solo en presencia del plásmido.

Las **figuras 62A-C** representan esquemas de ejemplos no limitantes de construcciones PAL. La **figura 62A** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción para la expresión de PAL bajo el control de un promotor inducible por lambda CI. La construcción también proporciona la secuencia codificante de un mutante de CI, CI857, que es un mutante de CI sensible a la temperatura. El mutante represor de CI sensible a la temperatura, CI857, se une fuertemente a 30 grados C pero no puede unirse (reprimirse) a temperaturas de 37 C y superiores. En algunas realizaciones, la construcción

comprende la SEQ ID NO: 101. En algunos casos, esta construcción se usa sola. En algunas realizaciones, la construcción sensible a la temperatura se usa en combinación con otras construcciones PAL3 constitutivas o inducibles, por ejemplo, construcciones inducibles con bajo contenido de oxígeno, arabinosa, ramnosa o IPTG. En algunas realizaciones, la construcción permite la preinducción y la precarga de PAL3 y/o PheP y/o LAAD antes de la administración *in vivo*. En algunas realizaciones, la construcción proporciona actividad *in vivo*. En algunas realizaciones, la construcción se sitúa en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. En algunas realizaciones, la construcción se sitúa en un componente plasmídico de un sistema de bioseguridad. En algunas realizaciones, la construcción se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En algunas realizaciones, la construcción se usa en combinación con una construcción PheP, que puede proporcionarse en un plásmido o se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. La expresión de PheP puede ser constitutiva o impulsarse por un promotor inducible, por ejemplo, de bajo contenido de oxígeno, arabinosa, ramnosa o sensible a la temperatura. En algunas realizaciones, la construcción se usa en combinación con una construcción para la expresión de LAAD. En algunas realizaciones, se puede usar un sistema sensible a la temperatura para establecer una auxotrofia condicional. En una cepa que comprende deltaThyA o deltaDapA, se puede introducir un gen dapA o thyA en la cepa bajo el control de un sistema promotor termorregulado. La cepa puede crecer en ausencia de Thy y Dap solo a la temperatura permisiva, por ejemplo, 37 C (y no inferior).

La **figura 62B** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción para la expresión de PAL bajo el control de un promotor inducible por ramnosa. Para la aplicación del sistema de expresión de ramnosa no es necesario expresar las proteínas reguladoras en cantidades mayores, porque las cantidades expresadas del cromosoma son suficientes para activar la transcripción incluso en plásmidos de múltiples copias. Por lo tanto, sólo el promotor rhaP BAD se clona cadena arriba del gen que se va a expresar. En algunos casos, esta construcción se usa sola. En algunas realizaciones, la construcción inducible por ramnosa se usa en combinación con otras construcciones PAL3 constitutivas o inducibles, por ejemplo, construcciones de bajo contenido de oxígeno, arabinosa, sensibles a la temperatura o inducibles por IPTG. En algunos casos, la construcción permite la preinducción y la precarga de PAL3 y/o PheP y/o LAAD antes de la administración *in vivo*. En un ejemplo no limitante, la construcción es útil para la preinducción y se combina con construcciones inducibles por bajo contenido de oxígeno. En algunos casos, la construcción se sitúa en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. En algunos casos, la construcción se sitúa en un componente plasmídico de un sistema de bioseguridad. En algunos casos, la construcción se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En algunos casos, la construcción se usa en combinación con una construcción PheP, que puede proporcionarse en un plásmido o se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. La expresión de PheP puede ser constitutiva o impulsarse por un promotor inducible, por ejemplo, de bajo contenido de oxígeno, arabinosa, ramnosa o sensible a la temperatura. En algunos casos, la construcción se usa en combinación con una construcción para la expresión de LAAD.

La **figura 62C** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción para la expresión de PAL bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. La construcción PAL3 inducible por arabinosa comprende AraC (en orientación inversa), una región que comprende un promotor inducible por arabinosa, y PAL3. En algunos casos, esta construcción se usa sola. En algunas realizaciones, la construcción inducible por ramnosa se usa en combinación con otras construcciones PAL3 constitutivas o inducibles, por ejemplo, construcciones de bajo contenido de oxígeno, arabinosa, sensibles

- a la temperatura o inducibles por IPTG. En algunos casos, la construcción permite la preinducción y la precarga de PAL3 y/o PheP y/o LAAD antes de la administración *in vivo*. En un ejemplo no limitante, la construcción es útil para la preinducción y se combina con construcciones inducibles por bajo contenido de oxígeno. En algunos casos, la construcción se sitúa en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. En algunos casos, la construcción se sitúa en un componente plasmídico de un sistema de bioseguridad. En algunos casos, la construcción se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En algunos casos, la construcción se usa en combinación con una construcción PheP, que puede proporcionarse en un plásmido o se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. La expresión de PheP puede ser constitutiva o impulsarse por un promotor inducible, por ejemplo, de bajo contenido de oxígeno, arabinosa, ramnosa o sensible a la temperatura. En algunos casos, la construcción se usa en combinación con una construcción para la expresión de LAAD.
- La **figura 63A** representa un esquema de la organización génica de un promotor PssB. El producto génico de ssB protege al ssADN de la degradación; SSB interactúa directamente con numerosas enzimas del metabolismo del ADN y se cree que tiene una función central en la organización de los complejos de nucleoproteínas y los procesos involucrados en la replicación del ADN (y el reinicio de la replicación), la recombinación y la reparación. El promotor PssB se clonó frente a un indicador LacZ y se midió la actividad de beta-galactosidasa. La **figura 63B** representa un gráfico de barras que muestra la actividad del gen indicador para el promotor PssB en condiciones aerobias y anaerobias. Brevemente, las células se cultivaron de forma aerobia durante una noche, a continuación se diluyeron 1:100 y se dividieron en dos tubos diferentes. Se colocó un tubo en la cámara anaerobia y el otro se mantuvo en condiciones aerobias durante la duración del experimento. En momentos específicos, las células se analizaron para determinar la inducción del promotor. El promotor Pssb está activo en condiciones aerobias, y se desactiva en condiciones anaerobias. Este promotor se puede usar para expresar un gen de interés en condiciones aerobias. Este promotor también se puede usar para controlar estrechamente la expresión de un producto génico de tal forma que solo se exprese en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En este caso, el promotor PssB inducido por oxígeno induce la expresión de un represor, que reprime la expresión de un gen de interés. Por lo tanto, el gen de interés se expresa solamente en ausencia del represor, es decir, en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. Esta estrategia tiene la ventaja de un nivel adicional de control para un ajuste preciso mejorado y un control más estricto. En un ejemplo no limitante, esta estrategia puede usarse para controlar la expresión de *thyA* y/o *dapA*, por ejemplo, para hacer un auxótrofo condicional. La copia cromosómica de *dapA* o *ThyA* se desactiva. En condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, se expresan *dapA* o *thyA*, según sea el caso, y la cepa puede crecer en ausencia de *dap* o timidina. En condiciones aerobias, la expresión de *dapA* o *thyA* se desactiva y la cepa no puede crecer en ausencia de *dap* o timidina. Tal estrategia puede emplearse, por ejemplo, para permitir la supervivencia de bacterias en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, el intestino, pero evitar la supervivencia en condiciones aerobias (interruptor de bioseguridad).
- La **figura 64A** representa una estrategia para ajustar con precisión la expresión de una construcción Para-PAL usando una estrategia de optimización del sitio de unión al ribosoma. Se conocen en la técnica herramientas bioinformáticas para la optimización de RBS. En una estrategia, PAL y pheP controlados con arabinosa se pueden integrar en el cromosoma para proporcionar un crecimiento aerobio eficiente y una preinducción de la cepa (por ejemplo, en matraces, fermentadores u otras vesículas apropiadas), mientras que las versiones integradas de P_{fmrS}-PAL y PheP se mantienen para permitir una fuerte inducción *in vivo*. La **figura 64B** representa una estrategia que permite la expresión de PAL y PheP en condiciones aerobias a través de la expresión inducible por arabinosa de FNRS24Y.

Mediante el uso de una estrategia de optimización del sitio de unión al ribosoma, los niveles de expresión de Fnr^{S24Y} se pueden ajustar con precisión, por ejemplo, en condiciones de inducción óptimas (cantidades adecuadas de arabinosa para la inducción completa). El ajuste preciso se logra mediante la selección de un RBS apropiado con la tasa de inicio de la traducción adecuada. Se conocen en la técnica herramientas bioinformáticas para la optimización de RBS.

La **figura 65A**, la **figura 65B**, la **figura 65C** y la **figura 65D** representan esquemas de la organización génica de ejemplo de diversas construcciones de expresión descritas en esta invención. Estas construcciones se pueden usar solas o en combinación con otras construcciones que expresan PAL3 y/o PheP y/o LAAD. La **figura 65A** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción inducible por IPTG y por bajo contenido de oxígeno que comprende *LacI* en orientación inversa, una región que comprende un promotor, que contiene un sitio *LacO* y un sitio de unión a FNR. El promotor impulsa la expresión de dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3 y un tercer marco de lectura abierto que codifica PheP; esta construcción se puede transcribir como un mensaje tricistrónico. En un ejemplo no limitante, la construcción comprende SEQ ID NO: 95. En algunas realizaciones, esta construcción es útil para la preinducción en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno a través de la activación del promotor FNR. En algunas realizaciones, esta construcción es útil para la activación *in vivo* en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, ya que se encuentran en determinadas áreas del intestino, a través de la activación del promotor FNR.

La **figura 65B** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción inducible por IPTG y por bajo contenido de oxígeno que comprende *LacI* en orientación inversa, una región que comprende un promotor, que contiene *LacO* y un sitio de unión a FNR. La construcción también comprende dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3. Esta construcción se transcribe como un mensaje bicistrónico. En algunas realizaciones, la construcción se combina con otra construcción que expresa PheP a partir de otro plásmido. En algunas realizaciones, la construcción se combina con una construcción que expresa PheP, que se integra en el cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En un ejemplo no limitante, la construcción comprende SEQ ID NO: 97. En algunas realizaciones, esta construcción es útil para la preinducción en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno a través de la activación del promotor FNR. En algunas realizaciones, esta construcción es útil para la activación *in vivo* en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, ya que se encuentran en determinadas áreas del intestino, a través de la activación del promotor FNR.

La **figura 65C** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción inducible por IPTG, que comprende *LacI* en orientación inversa, una región que comprende un promotor, que comprende *LacO*. La construcción también comprende una región que contiene dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3 y un tercer marco de lectura abierto que codifica PheP. Esta construcción se puede transcribir como un mensaje tricistrónico. En un ejemplo no limitante, la construcción comprende SEQ ID NO: 96.

La **figura 65D** representa un esquema de un ejemplo no limitante de la organización de una construcción inducible por IPTG, que comprende *LacI* en orientación inversa, una región que comprende un promotor que contiene *LacO*. La construcción también contiene una región que contiene dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3. Esta construcción se puede transcribir como un mensaje bicistrónico. En un ejemplo no limitante, la construcción comprende SEQ ID NO: 98. En algunas realizaciones, la construcción se combina con otra construcción que expresa PheP a partir de otro plásmido. En algunas realizaciones, la construcción se combina con una construcción que expresa PheP, que se integra en el

cromosoma bacteriano en una o más ubicaciones. En algunas realizaciones, las construcciones mostradas en la **figura 65A**, la **figura 65B**, la **figura 65C** y/o la **figura 65D** comprenden secuencias PAL3 que son la secuencia original de *Photorhabdus chemiluminescens*. En algunas realizaciones, las secuencias de PAL3 se optimizan por codones para la expresión en *E. coli*. En algunas realizaciones, se usa optimización de codones como un control adicional para ajustar con precisión, es decir, para regular positiva o negativamente los niveles de PAL3 expresados a partir de la construcción. En algunas realizaciones, la construcción se sitúa en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de bajo o alto número de copias. En algunas realizaciones, la construcción se emplea en un sistema de bioseguridad, tal como el sistema mostrado en la **figura 61**. En algunas realizaciones, la construcción se integra en el genoma en una o más ubicaciones descritas en esta invención.

La **figura 66** representa un mapa de sitios de integración de ejemplo dentro del cromosoma 1917 Nissle de *E. coli*. Estos sitios indican regiones, donde los componentes de circuito se pueden insertar en el cromosoma sin interferir con la expresión génica esencial. Se usan barras invertidas (/) para mostrar que la inserción se producirá entre genes de expresión de manera divergente o convergente. Las inserciones dentro de genes biosintéticos, tales como *thyA*, pueden ser útiles para crear auxótrofos nutrientes. En algunas realizaciones, un componente de circuito individual se inserta en más de un sitio indicado.

La **figura 67** representa tres cepas de bacterias que expresan constitutivamente proteína roja fluorescente (RFP). En las cepas 1-3, el gen *rfp* se ha insertado en diferentes sitios dentro del cromosoma bacteriano y da como resultado grados variables de luminosidad bajo luz fluorescente. Nissle (cepa 4) no modificado de *E. coli* es no fluorescente.

La **figura 68** representa un gráfico de la residencia de Nissle *in vivo*. Se administró Nissle resistente a estreptomycin a un ratón por sonda oral sin pretratamiento antibiótico. Se controlaron los gránulos fecales de 6 ratones en total después de administración para determinar la cantidad de Nissle administrado aun presente dentro del tracto gastrointestinal de los ratones. Las barras representan el número de bacterias administradas a los ratones. La línea representa el número de Nissle recuperado a partir de las muestras fecales cada día durante un período de 10 días consecutivos.

La **figura 69** representa un gráfico de barras de residencia en el tiempo para Nissle resistente a estreptomycin en diversos compartimentos del tracto intestinal 1, 4, 8, 12, 24 y 30 horas después de la administración por sonda. Los ratones se trataron con aproximadamente 109 UFC, y en cada punto temporal, los animales (n = 4) se sacrificaron, y se extirparon el intestino, el ciego y el colon. El intestino delgado se cortó en tres secciones, y el intestino grueso y el colon en dos secciones cada uno. Los efluentes intestinales recogidos y las UFC en cada compartimento se determinaron mediante siembra de dilución en serie.

Las **figuras 70A** y **70B** representan concentraciones de fenilalanina en cultivos SYN-PKU302 conforme avanza el tiempo. Después de 1,5 h de crecimiento, se añadió ATC a cultivos de SYN-PKU302 y los cultivos de SYN-PKU304 se colocaron en una cámara anaerobia Coy suministrando N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y de H₂ al 5 %. Después de 4 h de inducción, las bacterias se volvieron a suspender en un tampón de ensayo que contenía fenilalanina 4 mM y a pH diferente (intervalo de pH 7,25-2,25). Las alícuotas se eliminaron de los ensayos celulares cada 30 min durante 2 h para determinar la cuantificación de fenilalanina mediante espectrometría de masas. Las velocidades de degradación de fenilalanina disminuyeron a medida que el pH del tampón de ensayo disminuyó en ambas cepas, SYN-PKU302 (**figura 70A**) y SYN-PKU304 (**figura 70B**).

La **figura 71** representa un esquema de ejemplo del cromosoma 1917 Nissle de *E. coli*, que comprende múltiples mecanismos de acción (MoAs).

La **figura 72** representa la organización génica de una construcción de ejemplo en la que los genes *PAL3* y *pheP* se transcriben conjuntamente bajo el control de un promotor FNR de ejemplo (P_{fnrS}).

Las **figuras 73A y 73B** representan la organización génica de una construcción de ejemplo en la que el gen de recombinasa *Int5* se une de manera operativa con un promotor FNR de ejemplo (P_{fnrS}), y el gen *PAL3* se une de manera operativa con un promotor constitutivo fuerte. La **figura 73A** representa un diagrama esquemático del gen *PAL3*, flanqueado por sitios *Int5*, en la orientación OFF (3' hacia 5'). Cuando se activa la expresión génica *Int5* en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, la vuelta recombinatoria de *PAL3* hacia la orientación ON (5' hacia 3'; **figura 73B**) provoca la producción de *PAL3* y el metabolismo de fenilalanina. Se puede usar cualquier secuencia promotora constitutiva fuerte.

Las **figuras 74A, 74B y 74C** representan la organización génica de una construcción de ejemplo en la que el gen de recombinasa *Int5* se une de manera operativa con un promotor FNR (P_{fnrS}), y el gen que codifica ARN polimerasa T7 está flanqueado por sitios de recombinasa y se une de manera operativa con un promotor constitutivo fuerte. La **figura 74A** representa un diagrama esquemático del gen de la ARN polimerasa T7, flanqueado por los sitios *Int5*, en la orientación OFF. Cuando la expresión génica de *Int5* se activa en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, el gen de la ARN polimerasa T7 cambia a la orientación ON (**figura 74B**). En cepas bacterianas manipuladas que comprenden una copia de *PAL3* bajo el control de un promotor impulsado por T7 (P_{T7} ; **figura 74C**), la expresión de la ARN polimerasa T7 conduce a la producción de *PAL3* y al metabolismo de la fenilalanina.

Las **figuras 75A y 75B** representan la organización génica de una construcción de ejemplo en la que el gen de recombinasa *Int5* se une de manera operativa con un promotor ParaBAD (P_{araBAD}), y el gen que codifica ARN polimerasa T7 está flanqueado por sitios de recombinasa y se une de manera operativa con un promotor constitutivo fuerte. La **figura 75A** muestra una construcción de ejemplo en la que el gen recombinasa *Int5* está unido de manera a un promotor ParaBAD (P_{araBAD}). La **figura 75B** representa un diagrama esquemático del gen de la ARN polimerasa T7, flanqueado por los sitios *Int5*, en la orientación OFF. Cuando la expresión génica de *Int5* se activa en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, el gen de la ARN polimerasa T7 cambia a la orientación ON. En cepas bacterianas manipuladas que comprenden una copia de *PAL3* bajo el control de un promotor impulsado por T7, la expresión de la ARN polimerasa T7 conduce a la producción de *PAL3* y al metabolismo de la fenilalanina.

La **figura 76A** representa un esquema de un interruptor basado en recombinasa para activar la expresión de *PAL3* usando diferentes promotores inducibles y sitios de unión al ribosoma. La expresión de recombinasa causa el giro del gen *PAL3* hacia la orientación ON, provocando la producción de *PAL3* y la degradación de fenilalanina. En algunas realizaciones, los interruptores basados en recombinasa se ajustan para responder a niveles específicos de un inductor. La **figura 76B** representa la relación entre la concentración de un inductor y el porcentaje de construcciones que contienen *PAL3* en la orientación ON. El área sombreada muestra el intervalo de eficiencia pronosticado del inductor *in vivo*.

Las **figuras 77A-77C** representan otras realizaciones no limitantes de la divulgación, donde la expresión de un gen heterólogo se activa mediante una señal ambiental exógena. La

figura 77A representa una realización de la expresión del gen heterólogo en la que, en ausencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC adopta una conformación, que reprime la transcripción. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC se somete a un cambio conformacional, que le permite unirse a y activar el promotor ParaBAD (P_{araBAD}), que induce la expresión del represor Tet (TetR) y una antitoxina. La antitoxina se acumula en la célula bacteriana recombinante, mientras TetR impide la expresión de una toxina (que está bajo el control de un promotor, que tiene un sitio de unión a TetR). Sin embargo, cuando arabinosa no está presente, no se expresan ni la antitoxina ni TetR. Debido a que TetR no está presente para contener la expresión de la toxina, la toxina se expresa y destruye la célula. La **figura 77A** representa otra realización no limitante de la divulgación, donde la expresión de un gen esencial, que no se encuentra en las bacterias recombinantes, se activa mediante una señal ambiental exógena. En ausencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC adopta una conformación, que reprime la transcripción del gen esencial bajo el control del promotor araBAD y la célula bacteriana no puede sobrevivir. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC se somete a un cambio conformacional, que le permite unirse a y activar el promotor araBAD, que induce la expresión del gen esencial y mantiene la viabilidad de la célula bacteriana.

La **figura 77B** representa una realización no limitante de la divulgación, donde una antitoxina se expresa a partir de un promotor constitutivo y la expresión de un gen heterólogo se activa mediante una señal ambiental exógena. En ausencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC adopta una conformación, que reprime la transcripción. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC se somete a un cambio conformacional, que le permite unirse a y activar el promotor araBAD, que induce la expresión de TetR, por consiguiente, previniendo la expresión de una toxina. Sin embargo, cuando arabinosa no está presente, TetR no se expresa, y la toxina se expresa, finalmente supera la antitoxina y mata la célula. El promotor constitutivo, que regula la expresión de la antitoxina, debería ser un promotor más débil que el promotor, que impulsa la expresión de la toxina. En este circuito el gen araC está bajo el control de un promotor constitutivo.

La **figura 77C** representa otra realización no limitante de la divulgación, donde la expresión de un gen heterólogo se activa mediante una señal ambiental exógena. En ausencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC adopta una conformación, que reprime la transcripción. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC se somete a un cambio conformacional, que le permite unirse a y activar el promotor araBAD, que induce la expresión del represor Tet (TetR) y una antitoxina. La antitoxina se acumula en la célula bacteriana recombinante, mientras TetR impide la expresión de una toxina (que está bajo el control de un promotor, que tiene un sitio de unión a TetR). Sin embargo, cuando arabinosa no está presente, no se expresan ni la antitoxina ni TetR. Debido a que TetR no está presente para contener la expresión de la toxina, la toxina se expresa y destruye la célula. En este circuito el gen araC o está bajo el control de un promotor constitutivo o un promotor inducible (por ejemplo, promotor AraC).

La **figura 78** representa una realización no limitante de la divulgación, donde una condición ambiental exógena o una o más señales ambientales activan la expresión de un gen heterólogo y al menos una recombinasa de un promotor inducible o promotores inducibles. A continuación, la recombinasa convierte un gen de toxina en una conformación activada, y la cinética natural de la recombinasa crea un retraso en la expresión de la toxina, lo que permite que el gen heterólogo se exprese por completo. Una vez que se expresa la toxina, destruye la célula.

La **figura 79** representa otra realización no limitante de la divulgación, donde una condición ambiental exógena o una o más señales ambientales activan la expresión de un gen

heterólogo, una antitoxina y al menos una recombinasa de un promotor inducible o promotores inducibles. A continuación, la recombinasa convierte un gen de toxina en una conformación activada, pero la presencia de la antitoxina acumulada suprime la actividad de la toxina. Una vez que la condición ambiental exógena o la una o más señales ya no están presentes, se desactiva la expresión de la antitoxina. La toxina se expresa constitutivamente, continúa acumulándose y destruye la célula bacteriana.

La **figura 80** representa otra realización no limitante de la divulgación, donde una condición ambiental exógena o una o más señales ambientales activan la expresión de un gen heterólogo y al menos una recombinasa de un promotor inducible o promotores inducibles. A continuación, la recombinasa convierte al menos una enzima de escisión en una conformación activada. A continuación, la al menos una enzima de escisión escinde uno o más genes esenciales, lo que conduce a la senescencia y, finalmente, a la muerte celular. La cinética natural de la recombinasa y los genes de escisión provocan un retraso, cuya cinética puede alterarse y optimizarse según el número y la elección de los genes esenciales a escindir, lo que permite que se produzca la muerte celular en cuestión de horas o días. La presencia de múltiples recombinasas anidadas se puede usar para controlar aún más el momento de la muerte celular.

La **figura 81** representa una realización no limitante de la divulgación, donde una condición ambiental exógena o una o más señales ambientales activan la expresión de un gen heterólogo y una primera recombinasa de un promotor inducible o promotores inducibles. A continuación, la recombinasa convierte una segunda recombinasa de una orientación invertida en una conformación activa. La segunda recombinasa activada convierte el gen de toxina en una conformación activada, y la cinética natural de la recombinasa crea un retraso en la expresión de la toxina, lo que permite que el gen heterólogo se exprese por completo. Una vez que se expresa la toxina, destruye la célula.

La **figura 82** representa una realización no limitativa de la divulgación, que comprende un sistema de estabilidad plasmídica con un plásmido que produce tanto una antitoxina efímera como una toxina longeva. Cuando la célula pierde el plásmido, la antitoxina ya no se produce y la toxina destruye la célula. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente producen una cantidad equivalente de una toxina Hok y una antitoxina Sok efímera. En el panel superior, la célula produce cantidades equivalentes de toxina y antitoxina y es estable. En el panel central, la célula pierde el plásmido y la antitoxina comienza a decaer. En el panel inferior, la antitoxina decae por completo y la célula muere.

La **figura 83** representa el uso de GeneGuards como un componente de seguridad manipulado. Todo el ADN manipulado está presente en un plásmido, que se puede destruir condicionalmente. Véase, por ejemplo, Wright et al., 2015.

La **figura 84A** representa un diagrama esquemático de una construcción *clbA* de tipo natural. La **figura 84B** representa un diagrama esquemático de una construcción de desactivación de *clbA*.

La **figura 85** representa un esquema de un sistema de secreción basado en la secreción flagelar de tipo III en la que se usa un flagelo para secretar un péptido terapéutico de interés (estrella) mediante fusión recombinante del péptido con una señal de secreción flagelar del extremo N de un componente flagelar nativo, de tal modo, que el péptido quimérico expresado de manera intracelular se puede movilizar a lo largo de las membranas internas y externas en el entorno huésped circundante.

La **figura 86** representa un esquema de un sistema de secreción de tipo V para la

producción extracelular de proteínas recombinantes, donde un péptido terapéutico (estrella) se puede fusionar con una señal de secreción del extremo N, un enlazador y el dominio beta de un autotransportador. En este sistema, la secuencia de señal del extremo N dirige la proteína a la maquinaria SecA-YEG, que mueve la proteína a lo largo de la membrana interna en el periplasma, seguida de escisión posterior de la secuencia de señal. El dominio beta se recluta para el complejo Bam, donde el dominio beta se pliega y se inserta en la membrana externa como una estructura barril beta. A continuación, el péptido terapéutico se embobina con el poro hueco de la estructura barril beta delante de la secuencia enlazadora. El péptido terapéutico se libera del sistema enlazador mediante una escisión autocatalítica o mediante dirección de una peptidasa asociada a membrana (tijeras) hacia un sitio de corte de peptidasa complementaria en el enlazador.

La **figura 87** representa un esquema de un sistema de secreción de tipo I, que transloca un péptido pasajero directamente del citoplasma al espacio extracelular utilizando HlyB (un transportador de casete de unión a ATP); HlyD (una proteína de fusión de membrana); y TolC (una proteína de membrana externa), que forma un canal a través de ambas membranas la interna y la externa. La porción del extremo C que contiene señal de secreción de HlyA se fusiona con la porción del extremo C de un péptido terapéutico (estrella) para mediar la secreción de este péptido.

La **figura 88** representa un esquema de las membranas externa e interna de una bacteria gramnegativa y tiene como objetivo a varias delecciones para generar una membrana externa permeable o desestabilizada, facilitando, de este modo, la translocación de unos polipéptidos terapéuticos al espacio extracelular, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos de origen eucariota, que contienen enlaces disulfuro. Las mutaciones desactivadas de uno o más genes que codifican una proteína, que ancla la membrana externa con el esqueleto de peptidoglicano, por ejemplo, lpp, ompC, ompA, ompF, tolA, tolB, pal, y/o uno o más genes, que codifican una peptidasa periplásmica, por ejemplo, degS, degP, nlpI, genera un fenotipo permeable. Las combinaciones de mutaciones pueden potenciar sinérgicamente el fenotipo permeable.

La **figura 89** representa un sistema de secreción de tipo 3 modificado (T3SS) para permitir que las bacterias inyecten proteínas terapéuticas secretadas en el lumen intestinal. Un promotor inducible (flecha pequeña, arriba), por ejemplo, un promotor inducible por FNR, impulsa la expresión del casete génico del sistema de secreción T3 (3 flechas grandes, arriba) que produce el aparato que secreta péptidos marcado fuera de la célula. Un promotor inducible (flecha pequeña, abajo), por ejemplo, un promotor inducible por FNR, impulsa la expresión de un factor regulador, por ejemplo, polimerasa T7, que a continuación activa la expresión del péptido terapéutico marcado (hexágonos).

La **figura 90A**, la **figura 90B** y la **figura 90C** representan esquemas de la organización génica de circuitos de ejemplo de la divulgación para la expresión de polipéptidos terapéuticos, que se secretan usando componentes del sistema de secreción flagelar de tipo III. Un polipéptido terapéutico de interés, tal como PAL y/o LAAD, se ensambla detrás de una fliC-5'UTR y se impulsa por el promotor nativo fliC y/o fliD (**figura 90A** y **figura 90B**) o un promotor inducible por Tet (**figura 90C**). En realizaciones alternativas, se puede usar un promotor inducible, tal como promotores dependientes del nivel de oxígeno (por ejemplo, un promotor inducible por FNR), y promotores inducidos por un metabolito que puede estar o no presente de forma natural (por ejemplo, puede añadirse de forma exógena) en el intestino, por ejemplo, arabinosa. El polipéptido terapéutico de interés se expresa a partir de un plásmido (por ejemplo, un plásmido de número medio de copias) o se integra en los locus fliC (eliminando así todo o una parte de fliC y/o fliD). Opcionalmente, se incluye en la construcción una parte del extremo N de FliC, como se muestra en la **figura 90B** y la **figura**

90C.

- La **figura 91A** y la **figura 91B** representan esquemas de la organización génica de circuitos de ejemplo de la divulgación para la expresión de polipéptidos terapéuticos, que se secretan a través de un sistema de membrana externa difusible (DOM, por sus siglas en inglés). El polipéptido terapéutico de interés se fusiona con una señal de secreción dependiente de Sec del extremo N prototípica o una señal de secreción dependiente de Tat, que se escinde tras la secreción en el espacio periplásmico. Las etiquetas de secreción de ejemplo incluyen etiquetas dependientes de sec, PhoA, OmpF, OmpA, *cvaC* y dependientes de Tat (TorA, FdnG, DmsA). En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden delecciones en uno o más de *lpp*, *pal*, *tolA* y/o *nlpl*. Opcionalmente, también se eliminan proteasas periplásmicas, incluyendo, pero sin limitación, *degP* y *ompT*, por ejemplo, para aumentar la estabilidad del polipéptido en el periplasma. Se usa un casete FRT-KanR-FRT para la integración cadena abajo. La expresión se impulsa por un promotor Tet (**figura 91A**) o un promotor inducible, tal como promotores dependientes del nivel de oxígeno (por ejemplo, un promotor inducible por FNR, **figura 91B**), y promotores inducidos por un metabolito que puede estar o no presente de forma natural (por ejemplo, puede añadirse de forma exógena) en el intestino, por ejemplo, arabinosa.
- La **figura 92** representa un esquema de un ciclo de diseño-construcción-prueba. Las etapas son las siguientes: 1: Definir la ruta de la enfermedad; 2. Identificar los metabolitos diana; 3. Diseñar los circuitos genéticos; 4. Construir el producto biótico sintético; 5. Activar el circuito *in vivo*; 6. Caracterizar la cinética de activación del circuito; 7. Optimizar la productividad *in vitro* hasta el umbral de la enfermedad; 8. Probar el circuito optimizado en el modelo de enfermedad animal; 9. Asimilar en el microbioma; 10. Desarrollar la comprensión de la PK *in vivo* y el régimen de dosificación.

- Las **figuras 93A, B, C, D y E** representan un esquema de procesos de producción no limitantes para la producción cadena arriba y cadena abajo de las bacterias manipuladas genéticamente de la presente divulgación. La **figura 93A** representa los parámetros para el cultivo inicial 1 (SC1): ciclo completo - solución madre de glicerol, duración de una noche, temperatura 37 °C, agitación a 250 rpm. La **figura 93B** representa los parámetros para el cultivo inicial 2 (SC2): Dilución 1/100, duración 1,5 horas, temperatura 37 °C, agitación a 250 rpm. La **figura 93C** representa los parámetros para el biorreactor de producción: inóculo - SC2, temperatura 37 °C, punto fijo de pH 7,00, banda muerta de pH 0,05, punto fijo de oxígeno disuelto 50 %, FLO de agitación/gas en cascada de oxígeno disuelto, límites de agitación 300-1200 rpm, límites FLO de gas 0,5-20 litros estándares por minuto, duración 24 horas. La **figura 93D** muestra los parámetros para la recogida: centrifugación a una velocidad de 4000 rpm y duración de 30 minutos, lavado IX con glicerol al 10 %/PBS, centrifugación, resuspensión con glicerol al 10 %/PBS. La **figura 93E** representa los parámetros para el relleno/almacenamiento del vial: 1-2 ml de alícuotas, -80 °C.

Descripción de las realizaciones y casos

- La presente divulgación incluye, entre otros, bacterias manipuladas genéticamente, composiciones farmacéuticas de las mismas y procedimientos para modular y tratar trastornos asociados con la hiperfenilalaninemia. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen que codifica fenilalanina amonio liasa (PAL) no nativa y son capaces de procesar y reducir la fenilalanina en un mamífero. Según la invención, las bacterias manipuladas comprenden además un gen que codifica un transportador de fenilalanina. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas también pueden comprender un gen que codifica L-AAD. Las bacterias manipuladas también pueden contener una o más secuencias génicas relacionadas con la bioseguridad y/o la

biocontención, por ejemplo, un interruptor de destrucción, un sistema de protección de genes y/o auxotrofia. La expresión de estas secuencias génicas puede regularse usando una diversidad de sistemas promotores, tales como cualquiera de los sistemas promotores divulgados en esta invención, cuyo promotor puede ser el mismo promotor para regular uno o más genes diferentes, puede ser una copia diferente del mismo promotor para regular diferentes genes, o puede implicar el uso de diferentes promotores usados en combinación para regular la expresión de diferentes genes. El uso de diferentes sistemas reguladores o promotores para controlar la expresión génica proporciona flexibilidad (por ejemplo, la capacidad de controlar diferencialmente la expresión génica en diferentes condiciones ambientales y/o la capacidad de controlar diferencialmente la expresión génica temporalmente) y también proporciona la capacidad de "ajustar con precisión" la expresión génica, cuya regulación puede servir para optimizar la expresión génica y/o el crecimiento de las bacterias. Las bacterias manipuladas genéticamente y las composiciones farmacéuticas que comprenden estas bacterias pueden usarse para metabolizar la fenilalanina en el cuerpo en moléculas no tóxicas para tratar y/o prevenir afecciones asociadas con la hiperfenilalaninemia, incluida la PKU. En determinados aspectos, las composiciones que comprenden las bacterias manipuladas genéticamente pueden usarse en los procedimientos de la divulgación para tratar y/o prevenir trastornos asociados con la hiperfenilalaninemia.

Para entender la divulgación más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Estas definiciones se deben leer teniendo en cuenta la notificación de la divulgación y como se entienden por un experto en la técnica. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica. Las definiciones adicionales se exponen en la descripción detallada.

"Hiperfenilalaninemia", "hiperfenilalaninéxico" y "exceso de fenilalanina" se utilizan indistintamente en esta invención para hacer referencia a concentraciones aumentadas o excepcionalmente altas de fenilalanina en el cuerpo. En algunas realizaciones, una señal diagnóstica de hiperfenilalaninemia es un nivel de fenilalanina en sangre de al menos 2 mg/dl, al menos 4 mg/dl, al menos 6 mg/dl, al menos 8 mg/dl, al menos 10 mg/dl, al menos 12 mg/dl, al menos 14 mg/dl, al menos 16 mg/dl, al menos 18 mg/dl, al menos 20 mg/dl o al menos 25 mg/dl. Como se usa en esta invención, las enfermedades asociadas a hiperfenilalaninemia incluyen, pero sin limitación, fenilcetonuria, fenilcetonuria clásica o típica, fenilcetonuria atípica, hiperfenilalaninemia leve permanente, hiperfenilalaninemia no fenilcetonúrica, deficiencia de fenilalanina hidroxilasa, deficiencia de cofactor, deficiencia de dihidropteridina reductasa, deficiencia de tetrahidropterina sintasa y enfermedad de Segawa. Los individuos afectados pueden sufrir déficits neurológicos progresivos e irreversibles, retraso mental, encefalopatía, epilepsia, eczema, crecimiento reducido, microcefalia, temblor, espasticidad de extremidades y/o hipopigmentación (Leonard 2006). Hiperfenilalaninemia también puede ser secundaria en otras condiciones, por ejemplo, enfermedades de hígado.

"Fenilalanina amonio liasa" y "PAL" se utilizan para hacer referencia a enzima metabolizadora de fenilalanina (PME), que convierte o procesa fenilalanina a ácido transcinámico y amonio. El ácido transcinámico tiene baja toxicidad y se convierte utilizando enzimas de hígado en mamíferos a ácido hipúrico, que se secreta en la orina. Se puede sustituir PAL por la enzima PAH para metabolizar el exceso de fenilalanina. La actividad de enzima PAL no necesita la actividad de cofactor THB. En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen *PAL* derivado de una especie procariota. En realizaciones alternativas, PAL se codifica por un gen *PAL* derivado de una especie eucariota. En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen *PAL* derivado de una especie bacteriana, que

incluye, pero sin limitación, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photorhabdus luminescens*, *Anabaena variabilis* y *Agrobacterium tumefaciens*. En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen PAL derivado de *Anabaena variabilis* y se llama "PAL1" en esta invención (Moffitt et al., 2007). En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen PAL derivado de *Photorhabdus luminescens* y se llama "PAL3" en esta invención (Williams et al., 2005). En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen PAL derivado de una especie hongo, por ejemplo, *Rhodosporidium toruloides* (Gilbert et al., 1985). En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen PAL derivado de una especie de planta, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* (Wanner et al., 1995). Se puede utilizar cualquier secuencia de nucleótidos y aminoácidos adecuada de PAL o fragmentos de La misma.

"Fenilalanina hidroxilasa" y "PAH" se utilizan para hacer referencia a una enzima, que cataliza la hidroxilación de la cadena lateral aromática de fenilalanina para crear tirosina en el cuerpo humano conjuntamente con la tetrahidrobiopterina de cofactor. El gen humano, que codifica PAH, está situado en el brazo (q) largo de cromosoma 12 entre posiciones 22 y 24,2. La secuencia de aminoácidos de PAH se conserva altamente entre mamíferos. Las secuencias de aminoácidos para PAH humana y de mamíferos son bien conocidas y están ampliamente disponibles. Se informó de la secuencia de ADNc humano de longitud completa para PAH en 1985 (Kwok et al. 1985). Los fragmentos activos de PAH también son bien conocidos (por ejemplo, Kobe et al. 1997).

"L-Aminoácido desaminasa" y "LAAD" se utilizan para hacer referencia a una enzima, que cataliza la desaminación oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos para generar sus cetoácidos respectivos, amonio y peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, la LAAD cataliza la conversión de fenilalanina a fenilpiruvato. Las enzimas LAAD múltiples son conocidas en la técnica, muchas de las cuales se derivan de bacterias, tales como, *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* o veneno. La LAAD se caracteriza por velocidad rápida de reacción de degradación de fenilalanina (Hou et al., Appl Microbiol Technol. octubre de 2015; 99(20):8391-402; "Production of phenylpyruvic acid from L- phenylalanine using an L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*: comparison of enzymatic and whole-cell biotransformation approaches"). La mayoría de las L-aminoácido desaminasas eucariotas y procariotas son extracelulares; sin embargo, LAAD de especie *Proteus* se localiza en la membrana de plasma (membrana interna), con orientación hacia el exterior en el espacio periplásmico, donde se encuentra la actividad enzimática. Como consecuencia de esta localización, no se requiere el transporte de fenilalanina a través de la membrana interna en el citoplasma para LAAD de *Proteus* mediado por degradación de fenilalanina. La fenilalanina se absorbe fácilmente a través de la membrana externa en el periplasma sin un transportador, eliminando la necesidad de un transportador para mejorar la disponibilidad de sustrato.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen de LAAD derivado de una especie bacteriana, que incluye, pero sin limitación, bacterias *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Proteus mirabilis*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Proteus vulgaris*. En algunas realizaciones, la LAAD, codificada por las bacterias manipuladas genéticamente, se ubica en la membrana plasmática, orientada hacia el espacio periplásmico y con la actividad catalítica que tiene lugar en el espacio periplásmico.

"Enzima metabolizadora de fenilalanina" o "PME" se utilizan para hacer referencia a una enzima, que es capaz de degradar fenilalanina. Cualquier enzima metabolizadora de fenilalanina, conocida en la técnica puede codificarse utilizando las bacterias manipuladas genéticamente. Las PME incluyen, pero sin limitación, fenilalanina hidroxilasa (PAH), fenilalanina amonio liasa (PAL), aminotransferasa, L-aminoácido desaminasa (L-AAD) y

fenilalanina deshidrogenasas.

Las reacciones con fenilalanina hidroxilasas, fenilalanina deshidrogenasas o aminotransferasas requieren cofactores, mientras L-AAD y PAL no requieren ningún cofactor adicional. En algunos casos, la PME codificada por las bacterias manipuladas genéticamente requiere un cofactor. En algunos casos, este cofactor se proporciona simultáneamente o secuencialmente con la administración de las bacterias manipuladas genéticamente. En otros casos, las bacterias manipuladas genéticamente pueden producir el cofactor. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una fenilalanina hidroxilasa. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una fenilalanina deshidrogenasa. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una aminotransferasa. En algunos casos, la PME codificada por las bacterias manipuladas genéticamente no requiere un cofactor. Aunque no se desea ceñirse a la teoría, la falta de necesidad de un cofactor significa que la velocidad de degradación de fenilalanina por la enzima depende de la disponibilidad del sustrato y no se limita por la disponibilidad del cofactor. En algunas realizaciones, la PME producida por las bacterias manipuladas genéticamente es PAL. En algunos casos, la PME producida por las bacterias manipuladas genéticamente es LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican combinaciones de PME.

En algunos casos, la actividad catalítica de PME depende de los niveles de oxígeno. En algunos casos, la PME es activa de manera catalítica en condiciones microaerobias. Como un ejemplo no limitativo, la actividad catalítica de LAAD depende de oxígeno. En algunas realizaciones, la LAAD es activa en condiciones de bajo contenido de oxígeno, tales como, condiciones microaerobias. En algunos casos de la invención, la PME funciona con los niveles muy bajos de oxígeno o en ausencia de oxígeno, por ejemplo, como los hallados en el colon. Como un ejemplo no limitativo, la actividad de PAL no depende de la presencia de oxígeno.

En determinados casos, las PME nuevas o mejoradas se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica o descritos en esta invención, y se codifican utilizando las bacterias manipuladas genéticamente. En algunas realizaciones, la enzima, que es codificada por las bacterias manipuladas genéticamente, es una enzima de tipo natural aislada de un organismo vírico, procariota o eucariota. En algunas realizaciones, la secuencia enzimática se ha modificado o mutado adicionalmente para aumentar una o más propiedades específicas de la enzima, tales como, estabilidad o actividad catalítica.

"Metabolito de fenilalanina" se refiere a un metabolito, que se genera como el resultado de la degradación de fenilalanina. El metabolito se puede generar directamente de fenilalanina, mediante la enzima utilizando fenilalanina como un sustrato, o indirectamente mediante una enzima diferente cadena abajo en la secuencia metabólica, que actúa en un sustrato metabólico de fenilalanina. En algunas realizaciones, los metabolitos de fenilalanina se producen usando las bacterias manipuladas genéticamente, que codifican una PME.

En algunas realizaciones, el metabolito de fenilalanina es el resultado directo o indirecto de actividad PAH, por ejemplo, de PAH producido por las bacterias manipuladas genéticamente. En algunas realizaciones, el metabolito es tirosina. En algunas realizaciones, el metabolito de fenilalanina se acumula en la sangre o en la orina de un paciente con PKU debido a la actividad PAH defectuosa. Los ejemplos no limitativos de tales metabolitos de PKU son ácido fenilpirúvico y ácido fenil-láctico. Otros ejemplos incluyen fenilacetato, feniletilamina y fenilacetilglutamina.

En algunas realizaciones, el metabolito de fenilalanina es el resultado directo o indirecto de

acción PAL, por ejemplo, de PAL producido por las bacterias manipuladas genéticamente. Los ejemplos no limitativos de tales metabolitos de PAL son ácido transcinámico y ácido hipúrico. En algunas realizaciones, el metabolito de fenilalanina es el resultado directo o indirecto de acción LAAD, por ejemplo, de LAAD producido por las bacterias manipuladas genéticamente. Los ejemplos de tales metabolitos LAAD son fenilpiruvato y ácido fenil-láctico.

"Transportador de fenilalanina" se utiliza para hacer referencia a una proteína transportadora de membrana, que es capaz de transportar fenilalanina en células bacterianas (véase, por ejemplo, Pi et al., 1991). En *Escherichia coli*, el gen *pheP* codifica una permeasa específica de fenilalanina de alta afinidad responsable del transporte de fenilalanina (Pi et al., 1998). En algunas realizaciones, el transportador de fenilalanina se codifica por un gen *pheP* derivado de una especie bacteriana, que incluyen, pero sin limitación, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*. Otros transportadores de fenilalanina incluyen permeasa de aminoácido general, codificada por el gen *aroP*, que transporta tres aminoácidos aromáticos, que incluyen fenilalanina, con alta afinidad, y se cree que, conjuntamente con PheP, es responsable de una parte importante de importar fenilalanina. Adicionalmente, se ha detectado un nivel bajo de transporte de fenilalanina con la actividad del sistema LIV-I/LS, que es un transportador de aminoácidos de cadena ramificada, que consiste en dos proteínas de unión periplásmicas, la proteína de unión LIV (sistema LIV-I) y la proteína de unión LS (sistema LS), y componentes de membrana, LivHMGF. En algunas realizaciones, el transportador de fenilalanina se codifica mediante un gen *aroP* derivado de una especie bacteriana. En algunas realizaciones, el transportador de fenilalanina se codifica mediante la proteína de unión LIV y la proteína de unión LS y los genes LivHMGF derivados de una especie bacteriana. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden más de un tipo de transportador de fenilalanina, seleccionado de *pheP*, *aroP* y el sistema LIV-I/LS.

"Fenilalanina" y "Phe" se utilizan para hacer referencia a un aminoácido con la fórmula $C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$. Fenilalanina es un precursor de tirosina, dopamina, norepinefrina y epinefrina. L-fenilalanina es un aminoácido esencial y la forma de fenilalanina se encuentra principalmente en proteína dietética; el estereoisómero D-fenilalanina se encuentra en cantidades bajas en proteína dietética; DL-fenilalanina es una combinación de ambas formas. Fenilalanina puede hacer referencia a una o más de L-fenilalanina, D-fenilalanina y DL-fenilalanina.

"Unido de manera operativa" se refiere a una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, un gen, que codifica PAL, que se une a una secuencia de región regulatoria de un modo que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, actúa en *cis*. Una región regulatoria es un ácido nucleico que puede dirigir la transcripción de una gen de interés y puede comprender secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteína, elementos inducibles, elementos de control de promotor, secuencias de unión a proteína, regiones no traducidas 5' y 3', sitios de inicio transcripcional, secuencias de terminación, secuencias poliadenilación e intrones.

Un "promotor inducible" se refiere a una región reguladora, que se une de manera operativa a uno o más genes, donde la expresión del uno o más genes se aumenta en presencia de un inductor de dicha región reguladora.

Un "promotor inducible directamente" se refiere a una región reguladora, donde la región reguladora se une de manera operativa a un gen, que codifica una enzima metabolizadora de fenilalanina, por ejemplo, *PAL*; en presencia de un inductor de dicha región reguladora, la enzima metabolizadora de fenilalanina se expresa. Un "promotor inducible indirectamente"

se refiere a un sistema regulador, que comprende dos o más regiones reguladoras, por ejemplo, una primera región reguladora, que se une de manera operativa a un gen, que codifica una primera molécula, por ejemplo, un regulador transcripcional, que es capaz de regular una segunda región reguladora, que se une de manera operativa con un gen, que codifica una enzima metabolizadora de fenilalanina. En presencia de un inductor de la primera región reguladora, se puede activar o reprimir la segunda región reguladora, activando o reprimiendo así la expresión de la enzima metabolizadora de fenilalanina. Ambos, un promotor inducible directamente y un promotor inducible indirectamente se abarcan por un "promotor inducible".

"Una o más condiciones ambientales exógenas" o "condiciones ambientales" se refieren escenarios o circunstancias en las que el promotor descrito en esta invención se induce directa o indirectamente. La expresión pretende referirse a las condiciones ambientales externas del microorganismo manipulado, pero endógenas o nativas del ambiente de sujeto huésped. Por consiguiente, "exógeno" y "endógeno" se pueden utilizar indistintamente para hacer referencia a condiciones ambientales, donde las condiciones ambientales son endógenas para un cuerpo de mamífero, pero externas o exógenas para una célula de microorganismo intacto. En algunas realizaciones, las condiciones ambientales exógenas son específicas de los intestinos de un mamífero. En algunas realizaciones, las condiciones ambientales exógenas son específicas del tracto gastrointestinal superior de un mamífero. En algunas realizaciones, las condiciones ambientales exógenas son específicas del tracto gastrointestinal inferior de un mamífero. En algunas realizaciones, las condiciones ambientales exógenas son específicas del intestino delgado de un mamífero. En algunas realizaciones, las condiciones ambientales exógenas son condiciones de bajo contenido de oxígeno, microaerobias o anaerobias, tales como, el ambiente de los intestinos de mamífero. En algunas realizaciones, las condiciones ambientales exógenas son moléculas o metabolitos, que son específicos de los intestinos de mamífero, por ejemplo, propionato. En algunas realizaciones, la condición ambiental exógena es un metabolito o una o más moléculas de tejido específico o enfermedad específica. En algunas realizaciones, la condición ambiental exógena es un ambiente bajo en pH. En algunas realizaciones, el microorganismo modificado genéticamente de la divulgación comprende un promotor dependiente de pH. En algunas realizaciones, el microorganismo modificado genéticamente de la divulgación comprende un promotor dependiente de niveles de oxígeno. En algunos aspectos, las bacterias han implicado factores de transcripción, que son capaces de sentir niveles de oxígeno. Se pueden desencadenar diferentes secuencias de señalización utilizando diferentes niveles de oxígeno y ocurrir con diferentes cinéticas.

Como se usa en esta invención, "condiciones ambientales exógenas" o "condiciones ambientales" también se refiere a escenarios o circunstancias o condiciones ambientales externas al microorganismo manipulado, que se refieren a las condiciones de cultivo *in vitro* del microorganismo. Las "condiciones ambientales exógenas" también pueden referirse a las condiciones durante el crecimiento, la producción y la fabricación del organismo. Dichas condiciones incluyen condiciones de cultivo aerobio, condiciones de cultivo anaerobio, condiciones de cultivo de bajo contenido de oxígeno y otras condiciones a concentraciones de oxígeno establecidas. Dichas condiciones también incluyen la presencia de un inductor químico y/o nutricional, tal como tetraciclina, arabinosa, IPTG, ramnosa y similares en el medio de cultivo. Dichas condiciones también incluyen las temperaturas a las que crecen los microorganismos antes de la administración *in vivo*. Por ejemplo, usando determinados sistemas promotores, determinadas temperaturas permiten la expresión de una carga útil, mientras que otras temperaturas no lo permiten. Los niveles de oxígeno, la temperatura y la composición de los medios influyen en dichas condiciones ambientales exógenas. Dichas condiciones afectan a la tasa de proliferación, la tasa de inducción de la PME (por ejemplo, PAL o LAAD), la tasa de inducción del transportador (por ejemplo, PheP) y/u otros

reguladores (por ejemplo, FNRS24Y) y la viabilidad global y la actividad metabólica de la cepa durante la producción de cepas.

- Un "promotor dependiente de nivel de oxígeno" o una "región reguladora dependiente de nivel de oxígeno" se refiere a una secuencia de ácido nucleico con la que uno o más factores de transcripción sensibles a nivel de oxígeno es capaz de unirse, donde la unión y/o activación del factor correspondiente de transcripción activa la expresión génica cadena abajo.
- Los ejemplos de factores de transcripción dependiente de nivel de oxígeno incluyen, pero sin limitación, FNR, ANR y DNR. Los promotores correspondientes sensibles a FNR, promotores sensibles a ARN y promotores sensibles a DNR son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Castiglione et al., 2009; Eiglmeier et al., 1989; Galimand et al., 1991; Hasegawa et al., 1998; Hoeren et al., 1993; Salmon et al., 2003). Los ejemplos no limitativos se muestran en la **Tabla 1**.

En un ejemplo no limitativo, un promotor (PfnrS) se derivó del gen S de fumarato y nitrato reductasa de Nissle de *E. coli* (fnrS), que es conocido por la expresión alta en condiciones de bajo o ningún oxígeno ambiental (Durand y Storz, 2010; Boysen et al, 2010). El promotor PfnrS se activa en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno mediante el regulador FNR transcripcional global, que se encuentra de forma natural en Nissle. En condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno, FNR forma un dímero y se une a secuencias específicas en los promotores de genes específicos bajo su control, activando, de este modo, su expresión. Sin embargo, en condiciones anaerobias, el oxígeno reacciona con grupos de hierro-azufre en dímeros FNR y los convierte en una forma inactiva. De este modo, el promotor inducible por PfnrS se adopta para modular la expresión de proteínas o ARN. PfnrS se utiliza indistintamente en esta solicitud como promotor FNRS, fnrS, FNR, P-FNRS y otras tales designaciones relacionadas para indicar el promotor PfnrS.

Tabla 1. Ejemplos de factores de transcripción y genes sensibles y regiones reguladoras

Factor de transcripción	Ejemplos de genes sensibles, promotores y/o regiones reguladoras:
FNR	<i>nirB</i> , <i>ydfZ</i> , <i>pdhR</i> , <i>focA</i> , <i>ndH</i> , <i>hlyE</i> , <i>narK</i> , <i>narX</i> , <i>narG</i> , <i>yfiD</i> , <i>tdcD</i>
ANR	<i>arcDABC</i>
DNR	<i>norb</i> , <i>norC</i>

Como se usa en esta invención, una secuencia de ácido nucleico "no nativa" se refiere a una secuencia de ácido nucleico normalmente no presente en una bacteria, por ejemplo, una copia extra de una secuencia endógena o una secuencia heteróloga, tal como una secuencia de una especie, cepa o subcepa de bacteria diferente o una secuencia, que se modifica y/o muta en comparación con la secuencia no manipulada de bacterias del mismo subtipo. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico no nativa es una secuencia de origen no natural (véase, por ejemplo, Purcell et al., 2013). La secuencia de ácido nucleico no nativa puede ser una región reguladora, un promotor, un gen y/o uno o más genes en un casete génico. En algunas realizaciones, "no nativo" hace referencia a dos o más secuencias de ácido nucleico, que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. La secuencia de ácido nucleico no nativa puede estar presente sobre un plásmido o un cromosoma. Adicionalmente, las múltiples copias de cualquier región reguladora, promotor, gen o casete génico pueden estar presentes en la bacteria, donde una o más copias de la región reguladora, promotor, gen y/o casete génico se pueden mutar o alterar de otro modo como se describe en esta invención. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se modifican para comprender varias copias de la

misma región reguladora, promotor, gen y/o casete génico de la misma región reguladora, promotor, gen y/o casete génico para potenciar el número de copias o para comprender múltiples componentes diferentes de un casete génico, que desarrolla múltiples funciones diferentes. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen que codifica una enzima metabolizadora de fenilalanina, que se une de manera operativa a un promotor inducible directamente o indirectamente, que no se asocia con dicho gen en la naturaleza, por ejemplo, un promotor FNR unido de manera operativa a un gen, que codifica PAL, o un promotor ParaBAD unido de manera operativa a LAAD.

"Promotor constitutivo" se refiere a un promotor, que es capaz de facilitar transcripción continua de una secuencia o un gen codificador bajo su control y/o al que se une de manera operativa. Los promotores y variantes constitutivos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, BBa_J23100, un promotor σ^s de *Escherichia coli* (por ejemplo, un promotor osmY (International Genetically Engineered Machine (iGEM) Registry of Standard Biological Parts Name BBa_J45992; BBa_J45993)), un promotor σ^{32} constitutivo de *Escherichia coli* (por ejemplo, promotor de choque térmico (BBa_J45504)), un promotor σ^{70} constitutivo de *Escherichia coli* (por ejemplo, promotor lacq (BBa_J54200; BBa_J56015)), promotor de operón sensible a fosfato CreABCD de *E. coli* (BBa_J64951), promotor GlnRS (BBa_K088007), promotor lacZ (BBa_K119000; BBa_K119001); promotor del gen I M13K07 (BBa_M13101); promotor del gen II M13K07 (BBa_M13102), promotor del gen III M13K07 (BBa_M13103), promotor de 20 gen IV M13K07 (BBa_M13104), promotor del gen V M13K07 (BBa_M13105), promotor del gen VI M13K07 (BBa_M13106), promotor del gen VII M13K07 (BBa_M13108), M13110 (BBa_M13110)), un promotor σ^A constitutivo de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, promotor veg (BBa_K143013), promotor 43 (BBa_K143013), P_{liaG} (BBa_K823000), P_{lepA} (BBa_K823002), P_{veg} (BBa_K823003)), un promotor σ^B constitutivo de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, promotor ctc (BBa_K143010), promotor gsiB (BBa_K143011)), un promotor *Salmonella* (por ejemplo, P_{spv2} de *Salmonella* (BBa_K112706), P_{spv} de *Salmonella* (BBa_K112707)), un promotor de bacteriófago T7 (por ejemplo, T7 promotor (BBa_I712074; BBa_I719005; BBa_J34814; BBa_J64997; BBa_K113010; BBa_K113011; BBa_K113012; BBa_R0085; BBa_R0180; BBa_R0181; BBa_R0182; BBa_R0183; BBa_Z0251; BBa_Z0252; BBa_Z0253)), un promotor de bacteriófago SP6 (por ejemplo, promotor SP6 (BBa_J64998)) y fragmentos funcionales de los mismos.

"Intestinos" hace referencia a los órganos, glándulas, tractos y sistemas, que son responsables de la transferencia y la digestión de alimentos, la absorción de nutrientes y la excreción de desechos. En humanos, los intestinos comprenden el tracto gastrointestinal (GI), que empieza en la boca y acaba en el ano, y, adicionalmente, comprende el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. Los intestinos comprenden, también, los órganos y las glándulas accesorias, tales como el bazo, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas. El tracto gastrointestinal superior comprende el esófago, el estómago y el duodeno del intestino delgado. El tracto gastrointestinal inferior comprende el resto del intestino delgado, es decir, el yeyuno y el íleon y todo el intestino grueso, es decir, el intestino ciego, el colon, el recto y el canal anal. Se puede encontrar a las bacterias a lo largo de los intestinos, es decir, el tracto gastrointestinal y, en particular, en los intestinos.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente están activas (por ejemplo, expresan una o más PME) en el intestino. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente están activas (por ejemplo, expresan una o más PME) en el intestino grueso. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente están activas (por ejemplo, expresan una o más PME) en el intestino delgado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente están activas en el intestino grueso

y en el intestino delgado. Sin desear limitarse a la teoría, la degradación de fenilalanina puede ser muy eficaz en el intestino delgado, porque la absorción de aminoácidos, por ejemplo, la absorción de fenilalanina, se produce en el intestino delgado. A través de la prevención o reducción de la captación de fenilalanina en la sangre, se pueden evitar niveles elevados y la toxicidad de Phe resultante. Además, la enterorecirculación extensa de aminoácidos entre el intestino y el cuerpo puede permitir la eliminación de la fenilalanina sistémica en la PKU (por ejemplo, descrito por Chang et al., en un modelo de rata de PKU (Chang et al., A new theory of enterorecirculation of amino acids and its use for depleting unwanted amino acids using oral enzyme-artificial cells, as in removing phenylalanine in phenylketonuria; Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 1995;23(1):1-21)). La fenilalanina de la sangre circula hacia el intestino delgado (véase, por ejemplo, la **figura 39**) y puede ser eliminada por bacterias que están activas en este lugar. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente transitan por el intestino delgado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen un tiempo de residencia aumentado en el intestino delgado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente colonizan el intestino delgado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente no colonizan el intestino delgado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen un mayor tiempo de residencia en el intestino. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente colonizan el intestino delgado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente no colonizan el intestino.

Como se usa en esta invención, la expresión "bajo contenido de oxígeno" se refiere a un nivel, cantidad o concentración de oxígeno (O_2) que es inferior al nivel, cantidad o concentración de oxígeno que está presente en la atmósfera (por ejemplo, $<21\%$ de O_2 ; <160 torr de O_2). Por lo tanto, la expresión "condición o condiciones de bajo contenido de oxígeno" o "ambiente de bajo contenido de oxígeno" se refiere a condiciones o ambientes que contienen niveles de oxígeno más bajos que los presentes en la atmósfera. En algunas realizaciones, la expresión "bajo contenido de oxígeno" se refiere al nivel, cantidad o concentración de oxígeno (O_2) que se encuentra en el intestino de un mamífero, por ejemplo, el lumen, estómago, intestino delgado, duodeno, yeyuno, íleon, intestino grueso, ciego, colon, colon sigmoide distal, recto y canal anal. En algunas realizaciones, la expresión "bajo contenido de oxígeno" se refiere a un nivel, cantidad o concentración de O_2 que es de 0-60 mmHg de O_2 (0-60 torr de O_2) (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60 mmHg de O_2), incluyendo todas y cada una de las fracciones incrementales de los mismos (por ejemplo, 0,2 mmHg, 0,5 mmHg de O_2 , 0,75 mmHg de O_2 , 1,25 mmHg de O_2 , 2,175 mmHg de O_2 , 3,45 mmHg de O_2 , 3,75 mmHg de O_2 , 4,5 mmHg de O_2 , 6,8 mmHg de O_2 , 11,35 mmHg de O_2 , 46,3 mmHg de O_2 , 58,75 mmHg, etc., cuyas fracciones de ejemplo se enumeran aquí con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ninguna manera). En algunas realizaciones, "bajo contenido de oxígeno" se refiere a aproximadamente 60 mmHg de O_2 o menos (por ejemplo, de 0 a aproximadamente 60 mmHg de O_2). La expresión "bajo contenido de oxígeno" también puede referirse a un intervalo de niveles, cantidades o concentraciones de O_2 de entre 0-60 mmHg de O_2 (inclusive), por ejemplo, 0-5 mmHg de O_2 , $<1,5$ mmHg de O_2 , 6-10 mmHg, <8 mmHg, 47-60 mmHg, etc. cuyos intervalos de ejemplo enumerados se enumeran aquí con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ninguna manera. Véanse, por ejemplo, Albenberg et al., Gastroenterology, 147(5): 1055-1063 (2014); Bergofsky et al., J Clin. Invest., 41(11): 1971- 1980 (1962); Crompton et al., J Exp. Biol., 43: 473-478 (1965); He et al., PNAS (USA), 96: 4586-4591 (1999); McKeown, Br. J. Radiol., 87:20130676 (2014) (doi: 10.1259/brj.20130676), cada uno de los cuales analiza los niveles de oxígeno que se encuentran en el intestino de los mamíferos de varias especies y cada uno de los cuales se incorporan por referencia aquí en

su totalidad. En algunas realizaciones, la expresión "bajo contenido de oxígeno" se refiere al nivel, cantidad o concentración de oxígeno (O_2) que se encuentra en un órgano o tejido de mamífero distinto del intestino, por ejemplo, tracto urogenital, tejido tumoral, etc., en el cual el oxígeno está presente a un nivel reducido, por ejemplo, a un nivel hipóxico o anóxico. En algunas realizaciones, "bajo contenido de oxígeno" pretende referirse al nivel, cantidad o concentración de oxígeno (O_2) presente en condiciones parcialmente aerobias, semiaerobias, microaerobias, nanoaerobias, microóxicas, hipóxicas, anóxicas y/o anaerobias. Por ejemplo, la Tabla A resume la cantidad de oxígeno presente en diversos órganos y tejidos. En algunas realizaciones, el nivel, cantidad o concentración de oxígeno (O_2) se expresa como la cantidad de oxígeno disuelto ("DO"), que se refiere al nivel de oxígeno libre no compuesto (O_2) presente en los líquidos y típicamente se informa en miligramos por litro (mg/l), partes por millón (ppm; 1 mg/l = 1 ppm), o en micromoles (umol) (1 umol de O_2 = 0,022391 mg/l de O_2). Fondriest Environmental, Inc., "Dissolved Oxygen", Fundamentals of Environmental Measurements, 19 de noviembre de 2013, www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/dissolved-oxygen/. En algunas realizaciones, la expresión "bajo contenido de oxígeno" pretende referirse a un nivel, cantidad o concentración de oxígeno (O_2) que es de aproximadamente 6,0 mg/l de DO o menos, por ejemplo, 6,0 mg/l, 5,0 mg/l, 4,0 mg/l, 3,0 mg/l, 2,0 mg/l, 1,0 mg/l o 0 mg/l, y cualquier fracción en los mismos, por ejemplo, 3,25 mg/l, 2,5 mg/l, 1,75 mg/l, 1,5 mg/l, 1,25 mg/l, 0,9 mg/l, 0,8 mg/l, 0,7 mg/l, 0,6 mg/l, 0,5 mg/l, 0,4 mg/l, 0,3 mg/l, 0,2 mg/l y 0,1 mg/l de DO, cuyas fracciones de ejemplo se enumeran aquí con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ninguna manera. El nivel de oxígeno en un líquido o solución también se puede informar como porcentaje de saturación de aire o como porcentaje de saturación de oxígeno (la relación entre la concentración de oxígeno (O_2) disuelto en la solución y la cantidad máxima de oxígeno que se disolverá en la solución a determinada temperatura, presión y salinidad en equilibrio estable). Las soluciones bien aireadas (por ejemplo, soluciones sometidas a mezcla y/o agitación) sin productores o consumidores de oxígeno están saturadas al 100 % con aire. En algunas realizaciones, la expresión "bajo contenido de oxígeno" pretende referirse al 40 % de saturación de aire o menos, por ejemplo, el 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % y el 0 % de saturación de aire, incluyendo todas y cada una de las fracciones incrementales de los mismos (por ejemplo, 30,25 %, 22,70 %, 15,5 %, 7,7 %, 5,0 %, 2,8 %, 2,0 %, 1,65 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,75 %, 0,68 %, 0,5 %, 0,44 %, 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,08 %, 0,075 %, 0,058 %, 0,04 %, 0,032 %, 0,025 %, 0,01 %, etc.) y cualquier intervalo de los niveles de saturación de aire entre el 0-40 %, inclusive (por ejemplo, 0-5 %, 0,05-0,1 %, 0,1-0,2 %, 0,1-0,5 %, 0,5-2,0 %, 0-10 %, 5-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, etc.). Las fracciones e intervalos de ejemplo enumerados aquí tienen fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ninguna manera. En algunas realizaciones, la expresión "bajo contenido de oxígeno" pretende referirse al 9 % de saturación de O_2 o menos, por ejemplo, el 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0 % de saturación de O_2 , incluyendo todas y cada una de las fracciones incrementales de los mismos (por ejemplo, 6,5 %, 5,0 %, 2,2 %, 1,7 %, 1,4 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,75 %, 0,68 %, 0,5 %, 0,44 %, 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,08 %, 0,075 %, 0,058 %, 0,04 %, 0,032 %, 0,025 %, 0,01 %, etc.) y cualquier intervalo de los niveles de saturación de O_2 entre el 0-9 %, inclusive (por ejemplo, 0-5 %, 0,05-0,1 %, 0,1-0,2 %, 0,1-0,5 %, 0,5-2,0 %, 0-8 %, 5-7 %, 0,3-4,2 % de O_2 , etc.). Las fracciones e intervalos de ejemplo enumerados aquí tienen fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Tabla A.

Compartimento	Tensión de oxígeno

Estómago	~60 torr (por ejemplo, 58 +/- 15 torr)
Duodeno y primera parte del yeyuno	~30 torr (por ejemplo, 32 +/- 8 torr); ~20 % de oxígeno en aire ambiente
Íleon (intestino delgado medio)	~10 torr; ~6 % de oxígeno en aire ambiente (por ejemplo, 11 +/- 3 torr)
Colon sigmoideo distal	~3 torr (por ejemplo, 3 +/- 1 torr)
Colon	<2 torr
Lumen del ciego	<1 torr
Tumor	<32 torr (la mayoría de los tumores son <15 torr)

Como se usa en esta invención, el término "gen" o "secuencia génica" pretende referirse a una secuencia genética, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico. El gen, secuencia génica o secuencia genética pretenden incluir una secuencia génica completa o una secuencia génica parcial. El gen, secuencia génica o secuencia genética pretenden incluir secuencia, que codifica una proteína o un polipéptido y, también, pretende incluir secuencia genética, que no codifica una proteína o un polipéptido, por ejemplo, una secuencia reguladora, secuencia líder, secuencia de señal o secuencia, que codifica no proteína.

"Microorganismo" se refiere a un organismo o un microbio de tamaño microscópico, submicroscópico o ultramicroscópico, que consiste típicamente en una célula única. Los ejemplos de microorganismos incluyen bacterias, levadura, virus, parásitos, hongos, determinadas algas y protozooario. En algunos aspectos, los microorganismos se modifican ("organismo modificado") para producir una o más moléculas o proteínas terapéuticas de interés. En determinados aspectos, el microorganismo se modifica para absorber y catabolizar ciertos metabolitos u otros compuestos de su ambiente, por ejemplo, los intestinos. En determinados aspectos, el microorganismo se modifica para sintetizar ciertos metabolitos u otros componentes beneficiosos (sintéticos o de origen natural) y liberarlos en su ambiente. En la presente invención, el microorganismo modificado es una bacteria manipulada. En determinados casos, el microorganismo manipulado es un virus manipulado.

"Bacteria no patogénica" se refiere a una bacteria que no es capaz de causar enfermedad o respuesta dañina en un huésped. En algunas realizaciones, las bacterias no patogénicas son bacterias gramnegativas. En algunas realizaciones, las bacterias no patogénicas son bacterias grampositivas. En algunas realizaciones, las bacterias no patogénicas son bacterias comensales, que están presentes en la microbiota de los intestinos. Los ejemplos de bacterias no patogénicas incluyen, pero sin limitación, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Brevibacteria*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Saccharomyces* y *Staphylococcus*, por ejemplo, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides subtilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces boulardii* (Sonnenborn et al., 2009; Dinleyici et al., 2014; Patente de EE.UU. N.º 6.835.376; Patente de EE.UU. N.º 6.203.797; Patente de EE.UU. N.º 5.589.168; Patente de EE.UU. N.º 7.731.976). Las bacterias patogénicas naturales se pueden modificar genéticamente para proporcionar reducción o eliminación de patogenicidad.

"Probiótico" se utiliza para hacer referencia a microorganismos vivos, no patogénicos, por ejemplo, bacterias, que pueden otorgar beneficios a un organismo huésped, que contiene

una cantidad apropiada del microorganismo. En algunas realizaciones, el organismo huésped es un mamífero. En algunas realizaciones, el organismo huésped es un humano. Algunas especies, cepas y/o subtipos de bacterias no patógenas se reconocen actualmente como probióticos. Los ejemplos de bacterias probióticas incluyen, pero sin limitación, *Bifidobacteria*, *Escherichia*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces*, por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, cepa Nissle de *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii* (Dinleyici et al., 2014; Patente de EE.UU. N.º 5.589.168; Patente de EE.UU. N.º 6.203.797; Patente de EE.UU. 6.835.376). El probiótico puede ser una variante o una cepa mutante de bacteria (Arthur et al., 2012; Cuevas-Ramos et al., 2010; Olier et al., 2012; Nougayrede et al., 2006). Las bacterias no patógenas pueden modificarse genéticamente para potenciar o mejorar propiedades biológicas deseadas, por ejemplo, capacidad de supervivencia. Las bacterias no patógenas se pueden modificar genéticamente para proporcionar propiedades probióticas. Las bacterias probióticas se pueden modificar genéticamente para potenciar o mejorar propiedades probióticas.

Como se usa en esta invención, bacteria "mantenido de manera estable" o "estable" se utiliza para hacer referencia a una célula huésped bacteriana, que lleva material genético no nativo, por ejemplo, un gen *PAL*, que se incorpora en el genoma huésped o se reproduce sobre un plásmido de autorreplicación extracromosómico, de tal modo que el material genético no nativo se retiene, se expresa y/o se propaga. La bacteria estable es capaz de sobrevivir y/o crecer *in vitro*, por ejemplo, en medio y/o *in vivo*, por ejemplo, en los intestinos. Por ejemplo, la bacteria estable puede ser una bacteria manipulada genéticamente, que comprende un gen *PAL*, donde el plásmido o el cromosoma, que lleva el gen *PAL* se mantiene estable en la célula huésped, de tal modo que *PAL* puede expresarse en la célula huésped, y la célula huésped es capaz de sobrevivir y/o crecer *in vitro* y/o *in vivo*. En algunas realizaciones, el número de copias afecta a la estabilidad de expresión de material genético no nativo, por ejemplo, un gen *PAL* o un gen *PAH*. En algunas realizaciones, el número de copias afecta al nivel de expresión de material genético no nativo, por ejemplo, un gen *PAL* o un gen *PAH*.

Como se usa en esta invención, los términos "modular" y "tratar" y similares se refieren a una mejora de una enfermedad, un trastorno y/o una afección o al menos de un síntoma distinguible del mismo. En otra realización, "modular" y "tratar" se refieren a una mejora de al menos un parámetro físico medible, pero no necesariamente distinguible por el paciente. En otra realización, "modular" y "tratar" se refieren a la inhibición de la progresión de una enfermedad, un trastorno y/o una afección, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En otra realización, "modular" y "tratar" se refieren a la ralentización de la progresión o la reversión de la progresión de una enfermedad, un trastorno y/o una afección. Como se utiliza en esta invención, "prevenir" y similares hacen referencia a la demora de la aparición o la reducción del riesgo de adquirir un síntoma asociado con tal enfermedad, trastorno y/o síntoma.

Aquellos, que necesitan tratamiento, pueden incluir individuos, que ya tienen una enfermedad médica particular, así como aquellos, que están en riesgo de tener, o quienes pueden adquirir la enfermedad finalmente. La necesidad de tratamiento se evalúa, por ejemplo, mediante la presencia de uno o más factores de riesgo asociados con el desarrollo de una enfermedad, la presencia o la progresión de una enfermedad o la receptividad probable de tratamiento de un sujeto, que tiene la enfermedad. Principalmente hiperfenilalaninemia, por ejemplo, PKU se causa por mutaciones genéticas congénitas, de las cuales no existen curas conocidas. Hiperfenilalaninemia, también, puede ser secundaria

en otras condiciones, por ejemplo, enfermedades de hígado. Tratar hiperfenilalaninemia puede abarcar reducir o eliminar el exceso de fenilalanina y/o síntomas asociados y no necesariamente abarcar la eliminación de la enfermedad subyacente.

- 5 Como se usa en esta invención una "composición farmacéutica" hace referencia a una preparación de bacterias manipuladas genéticamente de la invención con otros componentes, tales como un portador y/o un excipiente fisiológicamente adecuado.

10 Las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que se pueden utilizar indistintamente para hacer referencia a un portador o un diluyente, que no causa irritación significativa a un organismo y que no deroga la actividad biológica y las propiedades del compuesto bacteriano administrado. Un adyuvante se incluye en estas frases.

15 El término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aun más la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, bicarbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y tensioactivos, que incluyen, por ejemplo, polisorbato 20.

20 Los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan para hacer referencia a una cantidad de un compuesto que da como resultado la prevención, la demora de aparición de síntomas o la mejora de síntomas de una afección, por ejemplo, hiperfenilalaninemia. Una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, puede ser suficiente para tratar, prevenir, reducir la severidad, la demora de la aparición y/o la reducción del riesgo de aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o una afección asociados con el exceso de niveles de fenilalanina. Una cantidad terapéuticamente eficaz, así como también, una frecuencia terapéuticamente eficaz de administración se puede determinar utilizando los procedimientos conocidos en la técnica y descritos a continuación.

30 Como se usa en esta invención, el término "polipéptido" incluye "polipéptido", así como también, "polipéptidos" y se refiere a una molécula compuesta de monómeros de aminoácido unidos de manera lineal por enlaces amida (es decir, enlaces de péptido). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, "péptidos", "dipéptidos", "tripéptidos", "oligopéptidos", "proteína", "cadena de aminoácido" o cualquier otro término utilizado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos se incluyen en la definición de "polipéptido" y se puede utilizar el término "polipéptido" en vez de o indistintamente con cualquier otro término. El término "dipéptido" se refiere a un péptido de dos aminoácidos unidos. El término "tripéptido" se refiere a un péptido de tres aminoácidos unidos. El término "polipéptido" pretende hacer referencia a los productos de modificaciones postexpresión del polipéptido, que incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización, cribado proteolítico o modificación mediante aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o producir utilizando tecnología recombinante. En otros casos, el polipéptido se produce utilizando las bacterias manipuladas genéticamente o virus de la actual divulgación. Un polipéptido de la divulgación puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más, o 2000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen tal estructura. Se hace referencia a los polipéptidos con una estructura tridimensional definida como plegados, y se refiere a los polipéptidos, que no poseen una estructura tridimensional definida, pero, más bien, pueden adoptar un gran número de conformaciones

diferentes, como no plegados. El término "péptido" o "polipéptido" puede hacer referencia a una secuencia de aminoácido, que corresponde a una proteína o una porción de una proteína o puede hacer referencia a una secuencia de aminoácido, que corresponde con una secuencia de no proteína, por ejemplo, una secuencia seleccionada de una secuencia de péptido reguladora, secuencia de péptido líder, secuencia de péptido señal, secuencia de péptido de enlace y otras secuencia de péptido.

Un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo se refiere a un polipéptido, que no está en su ambiente natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Los polipéptidos y las proteínas producidas de manera recombinante expresados en células huésped, que incluyen, pero sin limitación, células bacterianas o de mamífero, se consideran aislados para los fines de la divulgación, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes, que se han separado, fraccionado o purificado parcialmente o sustancialmente utilizando cualquier técnica adecuada. Los péptidos, los polipéptidos o las proteínas recombinantes se refieren a péptidos, polipéptidos o proteínas producidas utilizando las técnicas de ADN recombinante, es decir, producidos a partir de células, microbianas o de mamíferos, transformadas mediante una construcción de expresión de ADN recombinante exógeno, que codifica el polipéptido. Las proteínas o los polipéptidos expresados en la mayoría de cultivos bacterianos serán típicamente libres de glicano. Los fragmentos, los derivados, los análogos o las variantes de los polipéptidos anteriores y cualquier combinación de los mismos, también, se incluyen como polipéptidos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" incluyen polipéptidos, que tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos del péptido original, e incluyen cualquier polipéptido, que retiene al menos una o más propiedades del polipéptido original correspondiente. Los fragmentos de polipéptidos de la presente divulgación incluyen fragmentos proteolíticos, así como también, fragmentos de delección. Los fragmentos incluyen también anticuerpo específico o fragmentos bioactivos o fragmentos activos inmunológicamente derivados de cualquier polipéptido descrito en esta invención. Las variantes pueden ser de origen natural o de origen no natural. Las variantes de origen no natural se pueden producir utilizando los procedimientos de mutagénesis conocidos en la técnica. Las variantes de polipéptidos pueden comprender sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácido conservativas o no conservativas.

Los polipéptidos incluyen, también, proteínas de fusión. Como se usa en esta invención, el término "variante" incluye una proteína de fusión, que comprende una secuencia del péptido original o suficientemente similar al péptido original. Como se usa en esta invención, el término "proteína de fusión" hace referencia a una proteína quimérica, que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas. Típicamente, las proteínas de fusión son el resultado de técnicas de recombinación *in vitro* bien conocidas. Las proteínas de fusión pueden tener una función estructural similar (pero no necesariamente en la misma medida) y/o función regulatoria similar (pero no necesariamente en la misma medida), y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente en la misma medida), y/o función inmunológica (pero no necesariamente en la misma medida) como las proteínas originales individuales, que son los componentes de las proteínas de fusión. Los "derivados" incluyen, pero sin limitación, péptidos, que contienen uno o más derivados de aminoácido de origen natural de los veinte aminoácidos estándares. La "similitud" entre dos péptidos se determina mediante la comparación de secuencia de aminoácidos de un péptido con la secuencia de un segundo péptido. Un aminoácido de un péptido es similar al aminoácido correspondiente de un segundo péptido, si es una sustitución de aminoácido idéntica o conservativa. Las sustituciones conservativas incluyen aquellas descritas en Dayhoff, M. O., edición, The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978), y en Argos, EMBO J. 8 (1989), 779-785. Por ejemplo, los aminoácidos, que pertenecen a uno de los siguientes grupos, representan cambios o

sustituciones conservativos: - Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; -Cys, Ser, Tyr, Thr; -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; -Lys, Arg, His; -Phe, Tyr, Trp, His; and -Asp, Glu.

5 Como se usa en esta invención, el término "suficientemente similar" se refiere a una
 10 secuencia de aminoácidos, que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de
 aminoácidos idénticos o equivalentes relativos a una segunda secuencia de aminoácidos,
 de tal modo que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos tienen un dominio
 estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de
 aminoácidos, que comprenden un dominio estructural común, que es de al menos
 10 aproximadamente 45 %, de al menos aproximadamente 50 %, de al menos
 aproximadamente 55 %, de al menos aproximadamente 60 %, de al menos
 aproximadamente 65 %, de al menos aproximadamente 70 %, de al menos
 aproximadamente 75 %, de al menos aproximadamente 80 %, de al menos
 aproximadamente 85 %, de al menos aproximadamente 90 %, de al menos
 15 aproximadamente 91 %, de al menos aproximadamente 92 %, de al menos
 aproximadamente 93 %, de al menos aproximadamente 94 %, de al menos
 aproximadamente 95 %, de al menos aproximadamente 96 %, de al menos
 aproximadamente 97 %, de al menos aproximadamente 98 %, de al menos
 aproximadamente 99 % o de al menos aproximadamente 100 % idéntica como se define en
 20 esta invención como suficientemente similar. Preferentemente, las variantes serán
 suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los péptidos de la divulgación.
 Tales variantes retienen generalmente la actividad funcional de los péptidos de la presente
 divulgación. Las variantes incluyen péptidos, que se difieren en secuencia de aminoácidos
 del péptido nativo y de peso, respectivamente, vía delección(es), adición(es) y/o
 25 sustitución(es) de uno o más aminoácidos. Estas pueden ser variantes de origen natural, así
 como, también, variantes manipuladas artificialmente.

Como se usa en esta invención, el término "enlazador", "péptido de enlace" o "enlaces de
 30 péptido o "enlazador" se refiere a secuencias de aminoácidos sintéticas o no naturales o de
 origen no natural, que conectan o enlazan dos secuencias de polipéptidos, por ejemplo, que
 enlazan dos dominios de polipéptidos. Como se usa en esta invención, el término "sintético"
 se refiere a secuencias de aminoácidos, que son de origen no natural. Los enlazadores de
 ejemplo se describen en esta invención. Los enlazadores de ejemplo adicionales se
 proporcionan en US 20140079701.

35 Como se usa en esta invención, el término "secuencia optimizada por codones" se refiere a
 una secuencia, que se modificó a partir de una secuencia codificadora existente o
 manipulada, por ejemplo, para mejorar la traducción en una célula o un organismo huésped
 de expresión de una molécula de ARN de transcripción, transcrita a partir de la secuencia
 40 codificadora, o para mejorar la transcripción de una secuencia codificadora. La optimización
 de codones incluye, pero sin limitación, procesos, que incluyen la selección de codones para
 la secuencia codificadora para adaptar la preferencia de codones del organismo huésped de
 expresión. La expresión "optimizado por codón" se refiere a la modificación de codones en
 el gen o regiones codificantes de una molécula de ácido nucleico para reflejar el uso típico
 45 de codones del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por la molécula de
 ácido nucleico. Dicha optimización incluye reemplazar al menos uno, o más de uno, o un
 número significativo de codones por uno o más codones que se usan con mayor frecuencia
 en los genes del organismo huésped. Una "secuencia optimizada por codones" se refiere a
 una secuencia que se modificó a partir de una secuencia codificante existente o se diseñó,
 50 por ejemplo, para mejorar la traducción en una célula huésped u organismo de expresión de
 una molécula de ARN de transcrito transcrita a partir de la secuencia codificante, o para
 mejorar la transcripción de una secuencia codificante. En algunas realizaciones, la mejora
 de la transcripción y/o la traducción implica aumentar el nivel de transcripción y/o traducción.

En algunas realizaciones, la mejora de la transcripción y/o la traducción implica disminuir el nivel de transcripción y/o traducción. En algunas realizaciones, la optimización de codones se usa para ajustar con precisión los niveles de expresión de una construcción de interés, por ejemplo, niveles de PAL3 y/o niveles de PheP. La optimización de codones incluye, pero sin limitación, procesos que incluyen la selección de codones para la secuencia codificante para adaptarse a la preferencia de codones del organismo huésped de expresión. Muchos organismos muestran un sesgo o preferencia por el uso de codones particulares para codificar la inserción de un aminoácido particular en una cadena polipeptídica en crecimiento. La preferencia de codones o el sesgo de codones, las diferencias en el uso de codones entre organismos, están permitidas por la degeneración del código genético y están bien documentadas entre muchos organismos. El sesgo de codones a menudo se correlaciona con la eficacia de la traducción del ARN mensajero (ARNm), que a su vez se cree que depende, entre otros, de las propiedades de los codones que se traducen y la disponibilidad de las moléculas de ARN de transferencia particular (ARNt). El predominio de ARNt seleccionados en una célula generalmente es un reflejo de los codones utilizados con mayor frecuencia en la síntesis de péptidos. Por consiguiente, los genes se pueden adaptar para la expresión génica óptima en un organismo dado basándose en la optimización de codones.

Como se usa en esta invención, los términos "sistema de secreción" o "proteína de secreción" se refieren a un mecanismo de secreción nativo o no nativo capaz de secretar o exportar la una o más proteínas de interés o una o más proteínas terapéuticas del microbiano, por ejemplo, citoplasma bacteriano. El sistema de secreción puede comprender una única proteína o puede comprender dos o más proteínas reunidas en un complejo, por ejemplo, HlyBD. Los ejemplos no limitativos de sistemas de secreción para las bacterias gramnegativas incluyen sistemas de secreción flagelar de tipo III, tipo I (por ejemplo, sistema de secreción de hemolisina), tipo II, tipo IV, tipo V, tipo VI y tipo VII, bombas de eflujo multifármaco, diferentes sistemas de secreción de membrana única. Los ejemplos no limitativos de sistemas de secreción para bacterias grampositivas incluyen sistemas de secreción Sec y TAT. En algunos casos, las proteínas de interés incluyen una "etiqueta de secreción" o de ARN o de origen peptídico para dirigir la una o más proteínas de interés o una o más proteínas terapéuticas para sistemas de secreción específicos. En algunas realizaciones, el sistema de secreción es capaz de eliminar esta etiqueta antes del cribado de la una o más proteínas de interés a partir de las bacterias manipuladas. Por ejemplo, en la secreción mediada por autosecreción de Tipo V la etiqueta de secreción de péptido del extremo N se elimina tras la translocación del péptido "pasajero" del citoplasma en el compartimento periplásmico mediante el sistema Sec nativo. Además, cuando el autosecretor se transloca sobre la membrana externa, se puede eliminar la etiqueta de secreción del extremo C utilizando un cribado autocatalítico o catalizado por proteasa, por ejemplo, OmpT, liberando de este modo la una o más proteínas de interés en el ambiente extracelular.]]

Como se usa en esta invención, el término "transportador" pretende hacer referencia a un mecanismo, por ejemplo, proteína o proteínas, para importar una molécula, por ejemplo, aminoácido, toxina, metabolito, sustrato, etc. en el microorganismo del ambiente extracelular. Por ejemplo, un transportador de fenilalanina, tal como PheP, importa fenilalanina al microorganismo.

Los artículos "uno" y "una", como se utilizan en esta invención, deberían entenderse como "al menos uno", al menos que se indica claramente lo contrario.

La frase "y/o", cuando se utiliza entre elementos en una lista, pretende significar o (1) que solamente un único elemento mencionado está presente o (2) que más de un elemento de

la lista está presente. Por ejemplo, "A, B, y/o C" indica que la selección puede ser solamente A; solamente B; solamente C; A y B; A y C; B y C; o A, B y C. La frase "y/o" se puede utilizar indistintamente con "al menos uno de" o "uno o más de" los elementos en una lista.

5 Bacterias

Las bacterias manipuladas genéticamente de la invención son capaces de reducir el exceso de fenilalanina. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son bacterias no patogénicas. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son bacterias comensales. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son bacterias probióticas. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son bacterias patogénicas naturales, que se modifican o mutan para reducir o eliminar patogenicidad. En algunas realizaciones, las bacterias no patogénicas son bacterias gramnegativas. En algunas realizaciones, las bacterias no patogénicas son bacterias grampositivas. Las bacterias de ejemplo incluyen, pero sin limitación, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Brevibacteria*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Saccharomyces* y *Staphylococcus*, por ejemplo, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides subtilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces boulardii*. En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se seleccionan del grupo, que consiste en *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Clostridium butyricum*, Nissle de *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactococcus lactis*.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son *Escherichia coli* de cepa Nissle 1917 (Nissle de *E. coli*), una bacteria gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae*, que ha evolucionado en uno de los probióticos mejor caracterizados (Ukena et al., 2007). La cepa se caracteriza por su completa inocuidad (Schultz, 2008) y tiene estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Reister et al., 2014, importancia añadida). La secuenciación genómica confirmó que Nissle de *E. coli* carece de factores de virulencia prominente (por ejemplo, *E. coli* α -hemolisina, adhesinas P-fimbriales) (Schultz, 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que Nissle de *E. coli* no lleva los factores de adhesión patogénicos, no produce ninguna enterotoxina o citotoxina, no es invasiva y no es uropatógena (Sonnenborn et al., 2009). Desde que en 1917 Nissle de *E. coli* se empaquetó en cápsulas medicinales, llamadas Mutaflor, para el uso terapéutico. Se acepta de manera común que la eficacia y la inocuidad terapéutica de Nissle de *E. coli* se ha probado de forma convincente (Ukena et al., 2007).

Un experto en la técnica apreciaría que las modificaciones genéticas descritas en esta invención se puedan adaptar a otras especies, cepas y subtipos de bacterias. Además, los genes de una o más especies diferentes se pueden introducir uno en el otro, por ejemplo, el gen *PAL* de *Rhodospiridium toruloides* puede expresarse en *Escherichia coli* (Sarkissian et al., 1999), y se conoce que las fenilalanina amonio liasas eucarióticas comparten secuencia homóloga (Xiang y Moore, 2005).

Nissle de *E. coli* no modificada y las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se pueden destruir, por ejemplo, utilizando factores de defensa en los intestinos o el suero sanguíneo (Sonnenborn et al., 2009) o mediante activación de un interruptor de destrucción,

varias horas o días después de la administración. Por lo tanto, las bacterias manipuladas genéticamente pueden requerir administración continua. En algunas realizaciones, el tiempo de residencia se calcula para un sujeto humano. El tiempo de residencia *in vivo* se puede calcular para las bacterias manipuladas genéticamente de la invención (véase, por ejemplo, la **figura 68**).

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen que codifica PAL, donde el gen *PAL* está unido de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden un gen *PAL* no nativo. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden copias adicionales de un gen *PAL* nativo. En algunas realizaciones, el promotor no está asociado con el gen *PAL* en la naturaleza. En algunas realizaciones, el promotor es uno cualquier o más de los promotores divulgados en esta invención.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen que codifica PAH, donde el gen *PAH* está unido de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden un gen *PAH* no nativo. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden copias adicionales de un gen *PAH* nativo. En algunas realizaciones, el promotor no está asociado con el gen *PAH* en la naturaleza. En algunas realizaciones, el promotor es uno cualquier o más de los promotores divulgados en esta invención.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen que codifica LAAD, donde el gen *LAAD* está unido de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden un gen *LAAD* no nativo. En algunas realizaciones, las bacterias comprenden copias adicionales de un gen *LAAD* nativo. En algunas realizaciones, el promotor no está asociado con el gen *LAAD* en la naturaleza. En algunas realizaciones, el promotor es uno cualquier o más de los promotores divulgados en esta invención.

Según la invención, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además un gen que codifica un transportador de fenilalanina (PheP). En determinadas realizaciones, las bacterias comprenden copias adicionales de un gen nativo que codifica un transportador de fenilalanina, donde el gen del transportador de fenilalanina está unido de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En realizaciones alternativas, las bacterias comprenden un gen que codifica un transportador de fenilalanina no nativo, donde el gen del transportador de fenilalanina está unido de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. Ambas realizaciones se abarcan por la expresión transportador de fenilalanina "no nativo". En algunas realizaciones, el promotor no está asociado con el gen *pheP* en la naturaleza. En algunas realizaciones, el mismo promotor controla la expresión de PheP y PAL y/o PAH y/o L-AAD. En algunas realizaciones, el promotor que controla la expresión de PheP difiere del promotor que controla la expresión de PAL y/o PAH y/o L-AAD. En algunas realizaciones, el promotor que controla la expresión de PheP es uno cualquiera o más de los promotores divulgados en esta invención.

En algunos casos, el promotor que está unido de manera operativa a *PAL*, *PAH*, *LAAD* y/o *pheP* se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas específicas del intestino de mamífero. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas específicas del intestino delgado de un mamífero. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas específicas del intestino grueso de un mamífero. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por condiciones de bajo

contenido de oxígeno o anaerobias y/o poco oxígeno tales como el entorno del intestino de mamífero. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por la presencia de moléculas o metabolitos que son específicos del intestino de un mamífero, por ejemplo, propionato. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por exposición a tetraciclina. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por la exposición a la arabinosa. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente mediante la exposición a IPTG. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por exposición a ramnosa u otro inductor químico y/o nutricional conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el promotor se regula directa o indirectamente por la temperatura ambiental exógena. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente mediante la exposición a IPTG u otro compuesto de unión a lacl. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por la exposición a la ramnosa. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente mediante el aumento de la temperatura. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente mediante la disminución de la temperatura. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se administra conjuntamente con las bacterias manipuladas genéticamente de la invención. Tal molécula puede ser tetraciclina o IPTG o arabinosa u otro inductor químico y/o nutricional conocido en la técnica.

En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por las condiciones en un recipiente de cultivo (por ejemplo, un matraz o un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado), en el que la cepa se cultiva o se mantiene antes de la administración *in vivo*. Los ejemplos no limitantes de dichas condiciones que se proporcionan durante el cultivo de la cepa antes de la administración *in vivo* incluyen condiciones de bajo contenido de oxígeno, anaerobias, microaerobias o aerobias, otros niveles definidos de oxígeno (tales como los que se ilustran a continuación), presencia de arabinosa, presencia de IPTG, ramnosa u otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. En algunos casos, las condiciones en un recipiente de cultivo se establecen en ciertos niveles de oxígeno, por ejemplo, entre el 1 % y el 10 % de oxígeno, entre el 10 % y el 20 % de oxígeno, entre el 20 % y el 30 % de oxígeno, entre el 30 % y el 40 % de oxígeno, entre el 40 % y el 50 % de oxígeno, entre el 60 % y el 70 % de oxígeno, entre el 70 % y el 80 % de oxígeno, entre el 80 % y el 90 % de oxígeno, entre el 90 % y el 100 % de oxígeno, y otros niveles de oxígeno como se describe en esta invención, momento en el que el promotor se induce directa o indirectamente.

Reducción de hiperfenilalaninemia

Las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación comprenden un gen que codifica una enzima metabolizadora de fenilalanina (PME). En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen que codifica una enzima metabolizadora de fenilalanina (PME), y son capaces de reducir la hiperfenilalaninemia.

Los ejemplos de enzimas metabolizadoras de fenilalanina, incluyen, pero sin limitación, fenilalanina hidroxilasa (PAH), fenilalanina amonio liasa (PAL), aminotransferasas, L-aminoácido desaminasa (L-AAD) y fenilalanina deshidrogenasas. Las reacciones con fenilalanina hidroxilasas, fenilalanina deshidrogenasas o aminotransferasas requieren cofactores, mientras que L-AAD y PAL no requieren ningún cofactor adicional. Aunque no se desea ceñirse a la teoría, la falta de necesidad de un cofactor significa que la degradación de fenilalanina utilizando la enzima codificada por las bacterias manipuladas genéticamente, depende de la disponibilidad del sustrato y no se limita por la disponibilidad del cofactor.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una

- secuencia génica que codifica uno o más polipéptidos de fenilalanina hidroxilasa (PAH). Según la invención, las bacterias manipuladas comprenden una secuencia génica que codifica uno o más polipéptidos de fenilalanina amonio liasa (PAL). Fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.24) es una enzima, que cataliza una reacción, que convierte L-fenilalanina en amonio y ácido transcinámico. La fenilalanina amonio liasa es específica para L-Phe y en grado menor, para L-Tirosina. La reacción catalizada por PAL es la desaminación espontánea no oxidativa de L-fenilalanina para producir ácido transcinámico y amonio. A diferencia de la enzima de mamíferos (PAH), PAL es un monómero y no requiere ningún cofactor (MacDonald et al., Biochem Cell Biol 2007;85:273-82. A modern view of phenylalanine ammonia lyase). En los microorganismos, tiene un papel catabólico, permitiendo utilizar L-fenilalanina (L-Phe) como una única fuente de carbono y nitrógeno. Las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen *PAL*. PAL es capaz de modificar fenilalanina a niveles no tóxicos de ácido transcinámico y amonio. El ácido transcinámico (TCA) se puede modificar más a ácidos benzoicos e hipúricos de metabolitos TCA (Sarkissian et al., J Mass Spectrom. Junio de 2007;42(6):811-7; Quantitation of phenylalanine and its trans-cinnamic, benzoic and hippuric acid metabolites in biological fluids in a single GC-MS analysis). La actividad de enzima PAL no necesita la actividad de cofactor THB.
- En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen *PAL* derivado de una especie bacteriana, que incluye, pero sin limitación, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photorhabdus luminescens*, *Anabaena variabilis* y *Agrobacterium tumefaciens*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Photorhabdus luminescens*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Anabaena variabilis*. En algunas realizaciones, PAL se codifica por un gen *PAL* derivado de una especie eucariota, por ejemplo, una especie de levadura, una especie de planta. Las proteínas PAL distintas múltiples se conocen en la técnica. Las bacterias manipuladas genéticamente modifican más fenilalanina, cuando se expresa el gen *PAL* que las bacterias no manipuladas del mismo subtipo bacteriano bajo las mismas condiciones. Por consiguiente, las bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden PAL se pueden utilizar para metabolizar fenilalanina en el cuerpo en moléculas no tóxicas para tratar afecciones asociadas a hiperfenilalaninemia, incluyendo PKU. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente expresan *Anabaena variabilis* PAL ("PAL1"). En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente expresan *Photorhabdus luminescens* PAL ("PAL3"). Los ejemplos no limitativos de secuencias PAL de interés se muestran en la **Tabla 2**.

- En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas comprenden una secuencia génica que codifica uno o más polipéptidos LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas comprenden una secuencia génica que codifica uno o más polipéptidos PAL y uno o más polipéptidos LAAD. LAAD cataliza el oxidante estereoespecífico, es decir, que consume oxígeno, desaminación de L-aminoácidos a α -cetoácidos junto con la producción de amonio y peróxido de hidrógeno vía un intermediario de aminoácido. L-AAD se encuentran en venenos de serpiente y en muchas bacterias (Bifulco et al. 2013), especialmente en las citomembranas de las bacterias *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*. L-AAD (EC 1.4.3.2) son flavoenzimas con una estructura dimérica. Cada subunidad contiene un flavín adenín dinucleótido unido de manera no covalente ((FAD) cofactor) y no requiere ningún cofactor externo. *Proteus mirabilis* contiene dos tipos de L-AAD (Duerre y Chakrabarty 1975). Uno tiene amplia especificidad de sustrato y cataliza la oxidación de L-aminoácidos alifáticos y aromáticos a cetoácidos, típicamente L-fenilalanina (GenBank: U35383.1) (Baek et al., Journal of Basic Microbiology 2011, 51, 129- 135; "Expression and characterization of a second L-amino acid deaminase isolated from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*"). El otro tipo funciona principalmente con L-aminoácidos básicos (GenBank: EU669819.1). LAAD de fuentes bacterianas, fúngicas y de plantas parecen estar implicadas en la utilización de L-

aminoácidos (es decir, amonio producido mediante la actividad enzimática) como una fuente de nitrógeno. La mayoría de L-aminoácidos desaminasas eucariotas y procariotas se secretan de manera extracelular, con la excepción de LAAD de especie *Proteus*, que están unidos con membrana. En *Proteus mirabilis*, se ha informado que L-AAD se localizan en la

5 membrana plasmática, en dirección del espacio periplasmático, donde reside la actividad enzimática (Pelmont J et al., (1972) "L-amino acid oxidases of *Proteus mirabilis*: general properties" *Biochimie* 54: 1359-1374).

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen *LAAD*. LAAD es capaz de modificar fenilalanina a niveles no tóxicos de fenilpiruvato, que, también, se puede degradar más, por ejemplo, utilizando enzimas de hígado, a fenil-lactato. Fenilpiruvato no puede atravesar la barrera hematoencefálica, que permite LAAD reducir los niveles de fenilalanina en el cerebro sin acumulación de otro metabolito potencialmente tóxico. En algunas realizaciones, LAAD se codifica por un gen LAAD

10 derivado de una especie bacteriana, que incluye, pero sin limitación, bacterias *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Proteus mirabilis*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Proteus vulgaris*. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente expresan enzima LAAD de *Proteus mirabilis* GenBank: U35383.1. Los ejemplos no limitativos de secuencias LAAD de interés se

15 muestran en la **Tabla 2**. En algunas realizaciones, la enzima LAAD se deriva de veneno de serpiente. Según la divulgación, bacterias manipuladas genéticamente modifican más fenilalanina, cuando se expresa el gen *LAAD* que las bacterias no manipuladas del mismo subtipo bacteriano bajo las mismas condiciones. Por consiguiente, las bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden LAAD, se pueden utilizar para metabolizar

20 fenilalanina en el cuerpo en moléculas no tóxicas para tratar afecciones asociadas a hiperfenilalaninemia, incluyendo PKU.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una enzima de tipo natural, como ocurre en la naturaleza. En algunas realizaciones, las bacterias

30 manipuladas genéticamente codifican una enzima, que comprende mutaciones relativas a la secuencia de tipo natural. En algunas realizaciones, las mutaciones aumentan la estabilidad de la enzima. En algunas realizaciones, las mutaciones aumentan la actividad catalítica de la enzima. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen, que codifica una o más proteínas mencionadas en la **Tabla 2**. En algunas

35 realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos, que comprenden secuencia de cualquiera de SEQ ID Números: 1-8. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican un polipéptido, que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID Números: 1-8. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una o más enzimas de la **Tabla 2**, que comprende una mutación. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen, que codifica PAH de tipo natural. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican un PAH mutado con estabilidad y/o actividad aumentada. En

40 algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen, que codifica PAL de tipo natural. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican un PAL mutado con estabilidad y/o actividad aumentada. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen, que codifica LAAD de tipo natural. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican un LAAD mutado con estabilidad y/o actividad aumentada. Los procedimientos de cribado de enzimas con propiedades deseadas se conocen en la técnica y se describen en esta invención.

50

Tabla 2. Secuencias de enzimas metabolizadoras de fenilalanina

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Fenilalanina amonio liasa (<i>Anabaena variabilis</i>) Ac. N.º: Q3M5Z3.1	MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTIN DVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNAV ESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASELQTNLVW FLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR LELIKRMIEFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYI TGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTL LPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAM GVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAAD QMISLLANSQVLRDEL DGKHDYRDHELIQDRYSLR CLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQ ASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIIGLLAKHLDV QIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKGLQIC GNSIMPLLTIFYGNSIADRFPTHAEQFNQINNSQGYT SATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKT GHYDARACLS PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYI WNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDILPCL H	SEQ ID NO: 1
histidina amonio liasa [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413] (Ac. N.º: ABA23593.1)	MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTIN DVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNAV ESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASELQTNLVW FLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR LELIKRMIEFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYI TGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTL LPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAM GVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAAD QMISLLANSQVLRDEL DGKHDYRDHELIQDRYSLR CLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQ ASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIIGLLAKHLDV QIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKGLQIC GNSIMPLLTIFYGNSIADRFPTHAEQFNQINNSQGYT SATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKT GHYDARACLS PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYI WNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDILPCL H	SEQ ID NO: 2
histidina amonioliase [<i>Photorhabdus luminescens</i>] (WP_011146 484)	MKAKDVQPTIINKNGLISLEDIYDIAIKQKKVEISTE ITELLTHGREKLEEKLSNGEVIYGIN TGFGGNANLV VPFEKIAEHQNNLTFLSAGTGDYMSKPCIKASQFT MLLSVCKGWSATRPIVAQAIVDHINHDIPLVPRYG SVGASGDLPLSYIARALCGIGKVYYMGAEIDAAEA IKRAGLTPLSLKAKEGLALINGTRVMSGISAITVIKL EKLFKASISAIALAVEALLASHEHYDARIQQVKNHP GQNAVASALRNLLAGSTQVNLLSGVKEQANKACR HQEITQLNDTLQEVYSIRCAPQVLGIVPESLATARKI LEREVISANDNPLIDPENGDLVHGGNFMGQYVART MDALKLDIALIANHLHAIV ALMMDNRFSRGLPNSL	SEQ ID NO: 3

	SPTPGMYQGFKGVQLSQTALVAAIRHDCASGIHT LATEQYNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRNIVSMT ILVVCQAIHLRGNISEIAPETAKFYHAVREISSPLITD RALDEDIIRIADAIINDQLPLPEIMLEE	
histidina amonio liasa (<i>Photorhabdus luminescens</i>) Ac. N.º: CAE15566	MKQLTIYPGKLTDELROVYLQPVKITLDSQIFPAIE RSVECVNAILAENRTAYGINTGFGLLASTRIEEDNL EKLQSLVSHAAGVGKALDDNMTRLIMVLKINSL SRGYS GIRLAVIQALIALVNAEIYPHIPCKGSVGASG DLAPLAHMSLLLLGEGQARYQGEWLPAKEALAKA NLQPITLAAKEGLALLNGTQVSTAFALRGLFEAEDL LAAAIVCGSLSVAAALGSRKPFDAHVHVVRGQQGQ IDVAALYRHVLEESSELSDSHINCPKVQDPYSLRCQ PQVMGACLTQLRHAADVILTEANAVSDNPLVFAEQ GEVISGGNFHAEPVAMASDNLALVLAIEIGALSERRI ALLMDSHMSQLPPFLVENGGVNSGFMIAQVTAAAL ASENKALAHPASVDSLPTSANQEDHVSMAPAAGR LWEMAENTRGILAEWLSACQGIDFRNGLKSSPILE EARVILRAKVDYDQDRFFAPDIDAAVKLLAEQHL SSLLPSGQILQRKNNR	SEQ ID NO: 4
aminoácido desaminasa (<i>Proteus mirabilis</i>) Ac. N.º: ACD36582	MAISRRKFI LGGTVVAVAAGAGVLT PMLTREGRFV PGTPRHGFVEGTGGPLPKQDDVVVIGAGILGIMTAI NLAERGLSVTIVEKGNIAGEQSSRFYGGQAI SYKMPD ETFLHHLGKHRWREMNAKV GIDTTYRTQGRVEV PLDEEDLENVRKWIDAKSKDVGS DIPFRTKMIEGAE LKQRLRGATTDWKIAGFEEDSGSFDPEVATFVMAE YAKKMGIKIFTNCAARGLETQAGVISDVVTEKGPIK TSRVVVAGGVGSRLFMQNLNVDVPTLPAYQSQQLI SAAPNAPGGNVALPGGIFFRDQADGTYATSPRVIVA PVVKESFTYGYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLNSFM QSTHWDLNEESPFEKYRDMTALPDLPELNASLEKL KKEFFAFKESTLIDQWSGAMAIAPDENPIISDVKEYP GLVINTATGWGMTESPVSAEITADLLL GKKPVLDA KPFSLYRF	SEQ ID NO: 5
aminoácido desaminasa [<i>Proteus mirabilis</i> H14320]) Ac. N.º: AAA86752.1	MNISRRKLLLGVGAAGVLAGGAALVPMVRRDGKF VEAKSRASFVEGTQGALPKEADVVIIGAGIQGIMTA INLAERGMSVTILEKGQIAGEQSGRAYSQIISYQTSP EIFPLHHYGKILWRGMNEKIGADTSYRTQGRVEAL ADEKALDKAQAWIKTAKEAAGFDTPLNTRIIGKEE LSNRLVGAQTPWTVAAFEEDSGSVDPEGTGPALAR YAKQIGVKIYTNC AVRGIETAGGKISDVVSEKGAIK TSQVVLAGGIWSRLFMGMNGIDIPTLNVYLSQQRV SGVPGAPRGNVHLPNGIHFEQADGTYAVAPRIFTS SIVKDSFLLGPKFMHLLGGGELPLEFSIGEDLFNSFK MPTSWNLDEKTPFEQFRVATATQNTQHLDAVFQR MKTEFPVFEKSEVVERWGAVVSPTFDELPIISEVKE YPGLVINTATVWGMTGPAAGEVTADIVMGKKPVI DPTPFSLDRFKK	SEQ ID NO: 6

L-AAD de <i>Proteus vulgaris</i> ; (Ac. N.º: BAA90864)	MAISRRKFIIGGTVVAVAAGAGILTPMLTREGRFVP GTPRHGFVEGTEGALPKOADVVVVGAGILGIMTAI NLVERGLSVVIVEKGNIAEQSSRFYGQAI SYKMPD ETFLHHLGKHRWREMNKVGIDTTYRTQGRVEV PLDEEDLVNVRKWIDERSKNVGSDFPKTRIIEGAEL NQRLRGATTDWKIAGFEEDSGSFDPEVATFVMAEY AKKMGVRIYTQCAARGLETQAGVISDVVTEKGAIK TSQVVVAGGVWSRLFMQNLNVDVPTLPAYQSQQ ISGSPTAPGGNVALPGGIFREQADGTYATSPRVIVA PVVKESFTYGYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLINSFM QSTHWNLDEVSPFEQFRNMTALPDLPELNASLEKL KAEFPAFKESKLIDQWSGAMAIAPDENPIISEVKEYP GLVINTATGWGMTESPVSAELTADLLL GK KPVLDP KPFSLYRF	SEQ ID NO: 7
Fenilalanina hidroxilasa [<i>Homo sapiens</i>] (Ac. N.º AAH26251)	MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSYIEDNCNQNGAIS LIFSLKEEVGALAKVLR LFEENDVNLTHIESRPSRLK KDEYEFFTHLDKRS LPA L T N I I K I L R H D I G A T V H E L S RDKKKDTPWFPRTIQELDRFANQILSYGAELDAD HPGFKDPVYRARRKQFADIA NYR H G Q I P R V E Y M EEGKKTWGT V F K T L K S L Y K T H A C Y E Y N H I F P L L E K YCGFHEDNIPQLEDVSQFLQTCTGFRLRPVAGLLSS RDFLGGLAFRVFHTQYIRHGS K P M Y T P E P D I C H E L LGHVPLFSDRSFAQFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATI YWFTVEFGLCKQGDSIKAYGAGLLSSFGELQYCLS EKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYYVAESFND KEKVRNFAATIPRPF SVRYDPYTQRIEVL DNTQQLK ILADSINSEIGILCSALQKIK	SEQ ID NO: 8

El uno o más genes PME, por ejemplo, PAL, LAAD o PAH, pueden estar presentes en un plásmido o cromosoma en las bacterias manipuladas genéticamente. En algunos casos, la una o más secuencias génicas de PME se expresan bajo el control de uno o más promotores constitutivos. En algunos casos, el gen PME se expresa bajo el control de un promotor que se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas, como se describe en esta invención. En algunos casos, el gen PME se expresa bajo el control de un promotor que se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas, tal como en presencia de moléculas o metabolitos específicos del intestino de un mamífero. En un caso, el gen PME se expresa bajo el control de un promotor que se induce directa o indirectamente por condiciones de bajo contenido de oxígeno, microaerobias o anaerobias, donde la expresión del gen PME, por ejemplo, el gen PAL, se activa en entornos de bajo contenido de oxígeno o anaerobios, tal como el entorno del intestino de mamífero.

Según la invención, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia génica que codifica una o más secuencias polipeptídicas de PAL. En algunos casos, las bacterias manipuladas comprenden una secuencia génica que codifica una o más secuencias polipeptídicas de PAL en las que la una o más secuencias génicas se inducen directa o indirectamente por condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias, tal como el intestino de mamífero. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas comprenden una secuencia génica que codifica uno o más polipéptidos LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas comprenden una secuencia génica que codifica

uno o más polipéptidos LAAD, en los que la una o más secuencias génicas se inducen directa o indirectamente por condiciones oxigenadas, de bajo contenido de oxígeno o microaerobias, tales como las condiciones encontradas en el intestino proximal, incluyendo, pero sin limitación, el estómago, el duodeno y el íleon. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas comprenden una o más secuencias génicas que codifican una o más secuencias polipeptídicas de PME en las que la una o más secuencias génicas se inducen directa o indirectamente por un factor ambiental que está presente de forma natural en un intestino de mamífero. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente por un factor ambiental que no está presente de forma natural en un intestino de mamífero, por ejemplo, arabinosa o IPTG. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente por un factor ambiental que está presente de forma natural en un intestino de mamífero en afecciones inflamatorias. En algunos casos, las bacterias manipuladas comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos PAL y una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos L-AAD en los que las secuencias génicas están bajo el control del mismo promotor o una copia diferente del mismo promotor, que se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas, tales como cualquiera de las condiciones ambientales analizadas en esta invención y tales como cualquiera de los promotores analizados en esta invención. En algunos casos, las bacterias manipuladas comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos PAL y una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos L-AAD en los que las secuencias génicas están bajo el control de un promotor diferente, que se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas, tales como cualquiera de las condiciones ambientales analizadas en esta invención y tales como cualquiera de los promotores analizados en esta invención. En algunos casos, las bacterias manipuladas comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos PAL y una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos L-AAD en los que las secuencias génicas están bajo el control de un promotor constitutivo. En algunos casos, las bacterias manipuladas comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos PAL y una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos L-AAD en los que las secuencias génicas de PAL están bajo el control de un promotor constitutivo y la una o más secuencias génicas de LAAD están bajo el control de un promotor inducible. En algunos casos, las bacterias manipuladas comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos PAL y una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos L-AAD en los que las secuencias génicas de LAAD están bajo el control de un promotor constitutivo y la una o más secuencias génicas de PAL están bajo el control de un promotor inducible. En cualquiera de estos casos, las bacterias pueden comprender además una secuencia génica que codifica uno o más polipéptidos del transportador de Phe, cuya una o más secuencias génicas pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo o inducible y pueden ser el mismo promotor o diferente del promotor que controla la una o más secuencias génicas de Pal y/o LAAD.

En otras realizaciones, las bacterias manipuladas codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo* durante el cultivo de células bacterianas; es decir, una o más secuencias génicas de PME se expresan bajo el control de un promotor inducible que es sensible a moléculas o metabolitos específicos, la temperatura, los niveles de oxígeno u otros parámetros proporcionados en el cultivo de la bacteria a medida que se cultiva en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo* durante el cultivo de células bacterianas; donde la una o más secuencias génicas de PME

se expresan en condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo* durante el cultivo de células bacterianas; donde la una o más secuencias génicas de PME se expresan en condiciones aerobias. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo* durante el cultivo de células bacterianas; donde la una o más secuencias génicas de PME se expresan en condiciones microaerobias. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo* durante el cultivo de células bacterianas; donde la una o más secuencias génicas de PME se expresan en presencia de arabinosa. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas codifican una o más secuencias génicas de PME que se inducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo* durante el cultivo de células bacterianas; donde la una o más secuencias génicas de PME se expresan en presencia de IPTG.

Las bacterias han desarrollado factores de transcripción que son capaces de detectar los niveles de oxígeno. Diferentes vías de señalización pueden desencadenarse por diferentes niveles de oxígeno y tener lugar con diferentes cinéticas. Un promotor dependiente del nivel de oxígeno es una secuencia de ácido nucleico a la que pueden unirse uno o más factores de transcripción sensibles al nivel de oxígeno, donde la unión y/o la activación del factor de transcripción correspondiente activa la expresión génica cadena abajo. En un caso, el gen PME se expresa bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno. En un aspecto más específico, el gen *PAL* está bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno que se activa en entornos de bajo contenido de oxígeno o anaerobias, tal como el entorno del intestino de mamífero.

En determinados casos, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de PME, por ejemplo, *PAL*, expresado bajo el control del promotor regulador de fumarato y nitrato reductasa (FNR). En *E. coli*, FNR es un importante activador transcripcional que controla el cambio de metabolismo aerobio a anaerobio (Unden et al., 1997). En el estado anaerobio y/o de bajo contenido de oxígeno, FNR se dimeriza en una proteína de unión al ADN activa que activa cientos de genes responsables de la adaptación al crecimiento anaerobio. En el estado aerobio, el oxígeno evita que FNR se dimerice y está inactivo. En algunas realizaciones, se insertan múltiples secuencias de ácido nucleico de FNR distintas en las bacterias manipuladas genéticamente. En casos alternativos, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una PME, por ejemplo, *PAL*, expresada bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno alternativo, por ejemplo, un promotor ANR (Ray et al., 1997), un promotor DNR (Trunk et al., 2010). En algunos casos, el metabolismo de la fenilalanina se activa particularmente en un entorno de bajo contenido de oxígeno o anaerobio, tal como en el intestino.

En *P. aeruginosa*, la regulación anaerobia de la arginina deiminasa y el regulador transcripcional de reducción de nitrato (ANR) es "requerida para la expresión de funciones fisiológicas que son inducibles en condiciones de oxígeno o anaerobias" (Winteler et al., 1996; Sawers 1991). *P. aeruginosa* ANR es homólogo con FNR de *E. coli*, y "el sitio consenso FNR (TTGAT----ATCAA) fue reconocido eficientemente por ANR y FNR" (Winteler et al., 1996). Al igual que FNR, en estado anaerobio, ANR activa numerosos genes responsables de la adaptación al crecimiento anaerobio. En el estado aerobio, ANR está inactivo. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas mendocina* tienen análogos funcionales de ANR (Zimmermann et al., 1991). Los promotores que están regulados por ANR se conocen en la técnica, por ejemplo, el promotor del operón *arcDABC* (véase, por ejemplo, Hasegawa et al., 1998).

La familia FNR también incluye el regulador disimilatorio de la respiración de nitrato (DNR) (Arai et al., 1995), un regulador transcripcional que se requiere junto con ANR para la "respiración anaerobia de nitrato de *Pseudomonas aeruginosa*" (Hasegawa et al., 1998). Para determinados genes, los motivos de unión a FNR "probablemente solo son reconocidos por DNR" (Hasegawa et al., 1998). Puede usarse cualquier regulador transcripcional adecuado que esté controlado por condiciones ambientales exógenas y la región reguladora correspondiente. Los ejemplos no limitantes incluyen ArcA/B, ResD/E, NreA/B/C y AirSR, y otros son conocidos en la técnica.

Las secuencias del promotor FNR se conocen en la técnica, y cualquier secuencia o secuencias del promotor FNR adecuadas pueden usarse en las bacterias manipuladas genéticamente de la invención. Cualquier promotor o promotores FNR adecuado puede combinarse con cualquier *PAL* adecuado. Las secuencias del promotor FNR no limitantes se proporcionan en la **Tabla 3**, y las secuencias *PAL* no limitantes también se proporcionan en esta invención. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden una o más de: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, promotor *nirB1* (SEQ ID NO: 11), promotor *nirB2* (SEQ ID NO: 12), promotor *nirB3* (SEQ ID NO: 13), promotor *ydfZ* (SEQ ID NO: 14), promotor *nirB* fusionado con un sitio de unión al ribosoma fuerte (SEQ ID NO: 15), promotor *ydfZ* fusionado con un sitio de unión al ribosoma fuerte (SEQ ID NO: 16), *fnrS*, un gen de ARN pequeño inducido de forma anaerobia (promotor *fnrS1* SEQ ID NO: 9 o promotor *fnrS2* SEQ ID NO: 17), promotor *nirB* fusionado con un sitio de unión a *crp* (SEQ ID NO: 18), y *fnrS* condensado con un sitio de unión a *crp* (SEQ ID NO: 19).

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias de ácido nucleico que son al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homólogas con la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, o un fragmento funcional de las mismas.

Tabla 3. Secuencias de FNR

SEQ ID NO	Secuencia de región reguladora sensible a FNR
SEQ ID NO: 9	ATCCCCATCACTCTTGATGGAGATCAATTCCCCAAGCTGCTAGAGCGTTACCTTGCCCTTAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCACAGGAGAAAACCG
SEQ ID NO: 10	CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTCAGAGCGTTACCTTGCCCTTAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCACAGGAGAAAACCG
<i>nirB1</i> SEQ ID NO: 11	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGTTTCATGCCGGGCGGCACTATCGTCGTCGGCCTTTCTCTCTTACTCTGCTACGTACATCTATTTCTATAAATCCGTTCAATTGTCTGTTTTTGCACAAACATGAAATATCAGACAATCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAATCAGCAATATACCCCTTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAAGGTAGGCGGTAAAGAAAAGAAATCGAGGCCAAAA
<i>nirB2</i> SEQ ID NO: 12	

	CGGCCCGATCGTTGAACATAGCGGTCCGCAGGCGGCACTGCTTA CAGCAAACGGTCTGTACGCTGTCGTCTTTGTGATGTGCTTCCTGT TAGGTTTTCGTCAGCCGTCACCGTCAGCATAACACCCTGACCTCT CATTAATTGCTCATGCCGGACGGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTT CCTCTCTTCCCCCGCTACGTGCATCTATTTCTATAAACCCTGCTCA TTTTGTCTATTTTTTGCACAAACATGAAATATCAGACAATTCCGT GACTTAAGAAAATTTATACAAATCAGCAATATAACCCATTAAGGA GTATATAAAGGTGAATTTGATTACATCAATAAGCGGGGTTGCT GAATCGTTAAGGTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAA Aatgtttgtttaactttaagaaggagatatatat
<i>nirB3</i> SEQ ID NO: 13	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGCTCATGCCGGAC GGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCTCTCTTCCCCCGCTACGTG CATCTATTTCTATAAACCCTGCTATTTTGTCTATTTTTTGCACAA ACATGAAATATCAGACAATTCCTGACTTAAGAAAATTTATACA AATCAGCAATATAACCCATTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTGA TTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAAGGTAGGCGGT AATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAA
<i>ydfZ</i> SEQ ID NO: 14	ATTCCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTCCCCCGACTT ATGGCTCATGCATGCATCAAAAAAGATGTGAGCTTGATCAAAA ACAAAAAATATTTCACTCGACAGGAGTATTTATATTGCGCCCGT TACGTGGGCTTCGACTGTAAATCAGAAAGGAGAAAAACACCT
<i>nirB</i> +RBS SEQ ID NO: 15	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGTTTCATGCCGGGC GGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCTCTCTTACTCTGCTACGTA CATCTATTTCTATAAATCCGTTCAATTTGTCTGTTTTTGCACAA ACATGAAATATCAGACAATTCCTGACTTAAGAAAATTTATACA AATCAGCAATATAACCCCTTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTGA TTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAAGGATCCCTCT <u>AGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT</u>
<i>ydfZ</i> +RBS SEQ ID NO: 16	CATTCCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTCCCCCGACT TATGGCTCATGCATGCATCAAAAAAGATGTGAGCTTGATCAAAA ACAAAAAATATTTCACTCGACAGGAGTATTTATATTGCGCCCGG <u>ATCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA</u> <u>CAT</u>
<i>fnrS1</i> SEQ ID NO: 17	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTAA ATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAA ACGCCGTAAAGTTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTC AGGGCAATATCTCTCTTGGATCCCTCTAGAAATAATTTGTTTA <u>ACTTTAAGAAGGAGATATACAT</u>
<i>fnrS2</i> SEQ ID NO: 18	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTAA ATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAA ACGCCGCAAAGTTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTC AGGGCAATATCTCTCTTGGATCCAAAGTGAACCTCTAGAAATAAT <u>TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT</u>

<i>nirB+crp</i> SEQ ID NO: 19	TCGTCTTTGTGATGTGCTTCCTGTTAGGTTTCGTCAGCCGTCACC GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAAATTGCTCATGCCGGAC GGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCTCTTCCCCCGCTACGTG CATCTATTTCTATAAACCCGCTCATTTTGTCTATTTTTTGCACAA ACATGAAATATCAGACAATTCGCTGACTTAAGAAAATTTATACA AATCAGCAATATACCCATTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTGA TTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAAGGTAGaaatgtgat ctagttcacatttGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAAatgtttgtaac ttaagaaggagatatacat
<i>fnrS+crp</i> SEQ ID NO: 20	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGGTGGTCTTTATGGTTGCATCGTAGTAA ATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAA ACGCCGCAAAGTTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTC AGGGCAATATCTCTCaaatgtgatctagttcacattttgtttaactttaagaaggagatatacat

- En otros casos, una o más PME, por ejemplo, *PAL*, se expresan bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno fusionado con un sitio de unión para un activador transcripcional, por ejemplo, CRP. La PCR (proteína receptora de AMP cíclico o proteína activadora de catabolitos o CAP) desempeña un papel regulador importante en las bacterias al reprimir los genes responsables de la captación, el metabolismo y la asimilación de fuentes de carbono menos favorables cuando están presentes carbohidratos rápidamente metabolizables, tales como la glucosa (Wu et al., 2015). Esta preferencia por la glucosa se ha denominado represión por glucosa, así como represión por catabolitos de carbono (Deutscher, 2008; Görke y Stülke, 2008). En algunos casos, la expresión de PME, por ejemplo, *PAL*, se controla por un promotor dependiente del nivel de oxígeno fusionado con un sitio de unión a CRP. En algunos casos, la expresión de *PAL* se controla por un promotor FNR fusionado con un sitio de unión a CRP. En estos casos, el AMP cíclico se une a la CRP cuando no hay glucosa presente en el ambiente. Esta unión provoca un cambio conformacional en la CRP y permite que la CRP se una fuertemente a su sitio de unión. A continuación, la unión de CRP activa la transcripción del gen PME, por ejemplo, el gen *PAL*, al reclutar ARN polimerasa para el promotor FNR a través de interacciones directas proteína-proteína. En presencia de glucosa, el AMP cíclico no se une a la CRP y se reprime la transcripción del gen PME, por ejemplo, *PAL*. En algunos casos, un promotor dependiente del nivel de oxígeno (por ejemplo, un promotor FNR) fusionado con un sitio de unión para un activador transcripcional se usa para garantizar que una PME, por ejemplo, *PAL*, no se exprese en condiciones anaerobias cuando hay cantidades suficientes de glucosa, por ejemplo, añadiendo glucosa a los medios de crecimiento *in vitro*.
- En otra realización, una o más PME, por ejemplo, *LAAD*, se expresa bajo el control de un promotor inducible fusionado con un sitio de unión para un activador transcripcional, por ejemplo, CRP, de tal forma que la expresión se reprime en presencia de glucosa.
- En algunas realizaciones, *LAAD* está bajo el control de un promotor FNR. En algunas realizaciones, *LAAD* está bajo el control de un promotor distinto del promotor FNR. *LAAD* requiere oxígeno para catalizar la degradación de fenilalanina a fenilpiruvato. Por lo tanto, es deseable inducir la expresión de *LAAD* en condiciones oxigenadas, o incluso en condiciones de oxígeno reducido, en las que sea activa (**figura 25**).
- En algunos casos, una o más PME, por ejemplo, *PAL* y/o *LAAD*, se expresan bajo el control de un promotor inducible que es sensible a moléculas o metabolitos específicos en el

entorno, por ejemplo, el intestino de mamífero. Por ejemplo, el propionato de ácido graso de cadena corta es un importante metabolito de fermentación microbiana localizado en el intestino (Hosseini et al., 2011). En un caso, la expresión de uno o más genes PME está bajo el control de un promotor inducible por propionato. En un caso más específico, la expresión del gen PME está bajo el control de uno o más promotores inducibles por propionato que se activan por la presencia de propionato en el intestino de mamífero. Cualquier molécula o metabolito que se encuentre en el intestino de mamífero, en un estado sano y/o enfermo, puede usarse para inducir la expresión del gen PME. Los ejemplos no limitantes incluyen propionato, bilirrubina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, factores de coagulación sanguínea II, VII, IX y X, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa, antígenos y anticuerpos de hepatitis, alfa fetoproteína, antimitocondrial, músculo liso y anticuerpos antinucleares, hierro, transferrina, ferritina, cobre, ceruloplasmina, amoníaco y manganeso. En casos alternativos, la expresión génica de PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, está bajo el control de un promotor P_{araBAD}, que se activa en presencia del azúcar arabinosa. En una realización, la expresión de LAAD está bajo el control del promotor P_{araBAD}. En una realización, la expresión de LAAD se produce en condiciones aerobias o microaerobias. En un caso, la expresión de PAL está bajo el control del promotor P_{araBAD}. En un caso, la expresión de PAL se produce en condiciones aerobias o microaerobias. En un caso, la expresión de PAL se produce en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno y la expresión de LADD se produce en condiciones aerobias o microaerobias. En un caso, la expresión de PAL se produce en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno y la expresión de LADD está bajo el control del promotor P_{araBAD}.

En algunos casos, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por exposición a un inductor químico y/o nutricional. En algunos casos, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunos casos, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por exposición a arabinosa. En algunas realizaciones, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por exposición a un inductor IPTG u otro inductor LacI. En algunos casos, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por exposición a ramnosa. En algunos casos, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunas realizaciones, se expresa más de un gen PME, por ejemplo, el gen *PAL* y *LAAD*, y cada gen se expresa bajo el control de diferentes promotores, tales como cualquiera de los promotores analizados en este párrafo y en otras partes de esta invención.

En algunas realizaciones, el uno o más genes PME, por ejemplo, el gen *PAL* y/o *LAAD* se expresan bajo el control de un promotor que se induce por un cambio en la temperatura de una temperatura no permisiva a una temperatura permisiva. En algunas realizaciones, la expresión génica se optimiza adicionalmente mediante los procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, optimizando los sitios de unión al ribosoma, manipulando reguladores transcripcionales y/o aumentando la estabilidad del ARNm. Se conocen en la técnica herramientas bioinformáticas para el ajuste preciso y la optimización de RBS.

En cualquiera de los casos descritos anteriormente en esta invención (y en cualquier otro lugar de esta invención), las bacterias manipuladas genéticamente pueden comprender adicionalmente una secuencia génica que codifica uno o más transportadores de Phe, cuya una o más secuencias génicas pueden estar bajo el control de cualquiera de los promotores analizados en esta invención.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un plásmido o cromosoma mantenido de forma estable que porta el gen *PAL*, de tal forma que *PAL* se puede expresar en la célula huésped, y la célula huésped es capaz de sobrevivir y/o crecer *in vitro*, por ejemplo, en medio, y/o *in vivo*, por ejemplo, en el intestino. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dos o más genes *PAL* distintos. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden múltiples copias del mismo gen *PAL*. En algunas realizaciones, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce bajo condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias. En algunas realizaciones, el gen *PAL* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en el cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce bajo condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a arabinosa. En algunas realizaciones, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a un inductor IPTG u otro inductor *LacI*. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a ramnosa. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunas realizaciones, el gen *PAL* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por un cambio en la temperatura de una temperatura no permisiva a una temperatura permisiva. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a arabinosa. En algunas realizaciones, el gen *PAL* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a un inductor IPTG u otro inductor *LacI*. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a ramnosa. En algunos casos, el gen *PAL* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunas realizaciones, el gen *PAL* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por un cambio en la temperatura de una temperatura no permisiva a una temperatura permisiva.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un plásmido o cromosoma mantenido de forma estable que porta el gen *LAAD*, de tal forma que *LAAD* se puede expresar en la célula huésped, y la célula huésped es capaz de sobrevivir y/o crecer *in vitro*, por ejemplo, en medio, y/o *in vivo*, por ejemplo, en el intestino. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dos o más genes *LAAD* distintos. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden múltiples copias del mismo gen *LAAD*. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que es inducible, por ejemplo, por arabinosa o tetraciclina. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor inducible directa o indirectamente. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en el cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce, por ejemplo, por arabinosa o tetraciclina. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce

por exposición a arabinosa. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a un inductor IPTG u otro inductor LacI. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a ramnosa. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por un cambio en la temperatura de una temperatura no permisiva a una temperatura permisiva. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor constitutivo. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un plásmido y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a tetraciclina. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a arabinosa. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a un inductor IPTG u otro inductor LacI. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por exposición a ramnosa. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor que se induce por un cambio en la temperatura de una temperatura no permisiva a una temperatura permisiva. En algunas realizaciones, el gen *LAAD* está presente en un cromosoma y se une de manera operativa a un promotor constitutivo.

En cualquiera de estos casos de bacterias que comprenden uno o más genes PME, por ejemplo, *PAL*, *PAH* y/o *LAAD*, las bacterias pueden comprender además una secuencia génica que codifica uno o más transportadores de Phe, cuya una o más secuencias génicas del transportador de Phe pueden estar presentes en un plásmido o cromosoma, que pueden ser los mismos o un plásmido o cromosoma diferentes de la ubicación del gen PME. La una o más secuencias génicas del transportador de Phe pueden estar bajo el control del mismo o diferente promotor de la una o más secuencias génicas de *PMR*.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un regulador transcripcional dependiente del nivel de oxígeno, por ejemplo, *FNR*, *ANR* o *DNR*, y un promotor correspondiente de una especie bacteriana diferente. El regulador transcripcional dependiente de nivel de oxígeno no nativo y el promotor aumentan la transcripción de genes unidos de manera operativa con dicho promotor, por ejemplo, *PAL* o *PAH*, en un entorno de bajo contenido de oxígeno o anaerobio, en comparación con el regulador transcripcional nativo y el promotor en las bacterias bajo las mismas condiciones. En determinadas realizaciones, el regulador transcripcional dependiente de nivel de oxígeno es una proteína *FNR* de *N. gonorrhoeae* (véase, por ejemplo, Isabella et al., 2011). En algunas realizaciones, el correspondiente regulador transcripcional de tipo natural se deja intacto y retiene la actividad de tipo natural. En realizaciones alternativas, el correspondiente regulador transcripcional de tipo natural se elimina o muta para reducir o eliminar la actividad de tipo natural.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un regulador transcripcional dependiente del nivel de oxígeno de tipo natural, por ejemplo, *FNR*, *ANR* o *DNR*, y un promotor correspondiente que muta con respecto al promotor de tipo natural de bacterias del mismo subtipo. El promotor mutado mejora la unión al regulador transcripcional de tipo natural y aumenta la transcripción de genes unidos de manera operativa a dicho promotor, por ejemplo, *PAL* o *PAH*, en un entorno de bajo contenido de oxígeno o anaerobio, en comparación con el promotor de tipo natural bajo las mismas condiciones. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un promotor dependiente del nivel de oxígeno de tipo natural, por ejemplo, un promotor *FNR*, *ANR* o *DNR*, y un regulador transcripcional correspondiente que muta con

respecto al regulador transcripcional del mismo tipo de bacterias del mismo subtipo. El regulador transcripcional mutado mejora la unión al promotor de tipo natural y aumenta la transcripción de genes unidos de manera operativa a dicho promotor, por ejemplo, *PAL* o *PAH*, en un entorno de bajo contenido de oxígeno o anaerobio, en comparación con el regulador transcripcional de tipo natural bajo las mismas condiciones. En determinadas realizaciones, el regulador transcripcional dependiente del nivel de oxígeno mutante es una proteína FNR que comprende sustituciones de aminoácidos que mejoran la dimerización y la actividad de FNR (véase, por ejemplo, Moore et al., 2006).

- En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden múltiples copias del gen endógeno que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno, por ejemplo, el gen *FNR*. En algunas realizaciones, el gen que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno está presente en un plásmido. En algunas realizaciones, el gen que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno y el gen que codifica *PAL* están presentes en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, el gen que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno y el gen que codifica *PAL* están presentes en el mismo plásmido. En algunas realizaciones, el gen que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno está presente en un cromosoma. En algunas realizaciones, el gen que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno y el gen que codifica *PAL* están presentes en diferentes cromosomas. En algunas realizaciones, el gen que codifica el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno y el gen que codifica *PAL* están presentes en el mismo cromosoma. En algunos casos, puede ser ventajoso expresar el regulador transcripcional sensible al nivel de oxígeno bajo el control de un promotor inducible para mejorar la estabilidad de expresión. En algunas realizaciones, la expresión del regulador transcripcional se controla por un promotor diferente del promotor que controla la expresión del gen que codifica la enzima metabolizadora de fenilalanina. En algunas realizaciones, la expresión del regulador transcripcional se controla por el mismo promotor que controla la expresión de la enzima metabolizadora de fenilalanina. En algunas realizaciones, el regulador transcripcional y la enzima metabolizadora de fenilalanina se transcriben de forma divergente a partir de una región promotora.

- En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación producen *PAL* en condiciones ambientales exógenas, tales como el entorno de bajo contenido de oxígeno del intestino de mamífero, para reducir la fenilalanina en sangre en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo subtipo en las mismas condiciones. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación producen *PAL* en condiciones ambientales exógenas, tales como el entorno de bajo contenido de oxígeno del intestino de mamífero, y aumentan el ácido hipúrico en la orina en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo subtipo en las mismas condiciones.

aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo subtipo en las mismas condiciones. Ciertas bacterias no modificadas no tendrán niveles apreciables de procesamiento de fenilalanina para hipurato. En algunos casos, usando formas modificadas genéticamente de estas bacterias, el procesamiento de fenilalanina mediado por PAL será apreciable en condiciones ambientales exógenas.

En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación producen PAL en condiciones ambientales exógenas, tales como condiciones de cultivo bacteriano *in vitro*, y aumentan el ácido transcinámico en el medio en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo subtipo en las mismas condiciones. La fenilalanina se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, muestreo de sangre y espectrometría de masas. En algunos casos, el cinamato se mide mediante procedimientos conocidos en la técnica para evaluar la actividad de PAL. La producción de cinamato está directamente relacionada con la degradación de fenilalanina y, en algunos casos, ese cinamato puede usarse como un biomarcador alternativo para la actividad de la cepa (**figura 16B**). El cinamato puede degradarse aún más en ácido hipúrico por las enzimas hepáticas; ambos pueden medirse como se describe en el Ejemplo 24-26. Como se muestra en esta invención, el TCA se convierte rápidamente en ácido hipúrico *in vivo* y el ácido hipúrico se acumula posteriormente en la orina. Por lo tanto, el hipurato, en la sangre y en particular en la orina, puede ser un biomarcador aún mejor para la degradación de la fenilalanina *in vivo*. En algunos casos, la expresión de PAL se mide mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, la medición de los niveles de fenilalanina en sangre. El ácido hipúrico se puede medir según los procedimientos descritos en esta invención en los Ejemplos y los procedimientos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención producen LAAD, para reducir la fenilalanina en sangre en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo subtipo en las mismas condiciones. Ciertas bacterias no modificadas no tendrán niveles apreciables de procesamiento de fenilalanina. En algunas realizaciones, usando formas modificadas genéticamente de estas bacterias, el procesamiento de fenilalanina mediado por LAAD será apreciable en condiciones ambientales exógenas. La fenilalanina se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, muestreo de sangre y espectrometría de masas. Ácido pirúvico y fenilpiruvato, los productos de degradación generados por LAAD pueden medirse usando espectrometría de masas como se describe en los Ejemplos 24-26, y pueden usarse como una lectura adicional de la actividad de LAAD.

En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención producen más

- de una PME, por ejemplo, PAL, PAH y/o LAAD, en condiciones ambientales exógenas, tales como *in vivo* o en condiciones de cultivo bacteriano *in vitro*, y reducen la fenilalanina en sangre y/o aumentan el ácido transcinámico en el medio en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo subtipo en las mismas condiciones. En cualquiera de estos casos, las bacterias pueden comprender además una o más secuencias génicas que codifican uno o más polipéptidos del transportador de Phe.
- 15 En algunas realizaciones, una o más PME, por ejemplo, PAL, LAAD y/o PAH, se expresan en un plásmido de bajo número de copias. En algunas realizaciones, el plásmido de bajo número de copias puede ser útil para aumentar la estabilidad de la expresión. En algunas realizaciones, el plásmido de bajo número de copias puede ser útil para reducir la expresión permeable en condiciones no inductoras. En algunas realizaciones, una o más PME, por ejemplo, PAL, LAAD y/o PAH, se expresan en un plásmido de alto número de copias. En algunas realizaciones, el plásmido de alto número de copias puede ser útil para aumentar la expresión de PME, por ejemplo, PAL, LAAD y/o PAH, aumentando así el metabolismo de la fenilalanina y reduciendo la hiperfenilalaninemia. En algunas realizaciones, una bacteria manipulada genéticamente que comprende una PME, por ejemplo, PAL, LAAD y/o PAH, expresada en un plásmido de alto número de copias no aumenta el metabolismo de la fenilalanina ni disminuye los niveles de fenilalanina en comparación con una bacteria manipulada genéticamente que comprende la misma PME, por ejemplo, PAL, LAAD y/o PAH, expresada en un plásmido de bajo número de copias en ausencia de *pheP* heteróloga y copias adicionales de una *pheP* nativa. Se generaron bacterias manipuladas genéticamente que comprendían los mismos genes PME, por ejemplo, uno o más genes PAL, LAAD y/o PAH en plásmidos de alto número de copias y bajo número de copias. Por ejemplo, se generaron PAL1 o PAL3 en un plásmido de alto número de copias y un plásmido de bajo número de copias, y cada uno metabolizó y redujo la fenilalanina a niveles similares (**figura 15**). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la etapa limitante de la velocidad del metabolismo de la fenilalanina es la disponibilidad de la fenilalanina (véase, por ejemplo, la **figura 16**). En estas realizaciones, puede ser ventajoso aumentar el transporte de fenilalanina al interior de la célula, mejorando así el metabolismo de la fenilalanina. Junto con *pheP*, incluso los plásmidos PAL de bajo número de copias son capaces de eliminar casi por completo la Phe de una muestra de prueba (véase, por ejemplo, la **figura 16A**). Además, en algunas realizaciones que incorporan *pheP*, puede haber ventajas adicionales al usar un plásmido que expresa PAL de bajo número de copias en conjunto para mejorar la estabilidad de la expresión de PAL mientras se mantiene un alto metabolismo de fenilalanina y para reducir la presión de selección negativa en la bacteria transformada. En realizaciones alternativas, el transportador de fenilalanina se usa junto con el plásmido de alto número de copias.

En algunos casos, un transportador puede no aumentar la degradación de fenilalanina. Por ejemplo, LAAD de *Proteus mirabilis* se localiza en la membrana plasmática y la catálisis enzimática se produce en el periplasma. La fenilalanina puede atravesar fácilmente la membrana externa sin necesidad de un transportador. Por lo tanto, en los casos en los que las bacterias manipuladas genéticamente expresan LAAD, es posible que no se necesite un transportador o mejorar el metabolismo de la fenilalanina.

En algunos casos, la una o más PME, por ejemplo, uno o más genes *PAL*, *LAAD* y/o *PAH*, se expresan en un cromosoma. En algunos casos, la expresión del cromosoma puede ser útil para aumentar la estabilidad de la expresión de la PME. En algunos casos, el gen PME, por ejemplo, uno o más genes *PAL*, *LAAD* y/o *PAH*, se integra en el cromosoma bacteriano en uno o más sitios de integración en las bacterias manipuladas genéticamente. En algunos casos, el gen PME, por ejemplo, uno o más genes *PAL*, *LAAD* y/o *PAH*, se inserta en el genoma bacteriano, en uno o más de los siguientes sitios de inserción en Nissle de *E. coli*: *malE/K*, *insB/I*, *araC/BAD*, *lacZ*, *agall/rsml*, *thyA* y *malP/T*. Se puede usar cualquier sitio de inserción adecuado (véase, por ejemplo, la **figura 66**). El sitio de inserción puede estar en cualquier parte del genoma, por ejemplo, en un gen necesario para la supervivencia y/o el crecimiento, tal como *thyA* (para crear un auxótrofo); en un área activa del genoma, tal como cerca del sitio de replicación del genoma; y/o entre promotores divergentes para reducir el riesgo de transcripción no deseada, tal como entre AraB y AraC del operón de arabinosa. En algunos casos, más de una copia, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más copias del gen PME, por ejemplo, *PAL*, *PAH* y/o *LAAD*, se integra en el cromosoma bacteriano en uno o más sitios de integración en las bacterias manipuladas genéticamente. La más de una copia de un gen PME puede ser más de una copia del mismo gen PME o más de una copia de diferentes genes PME.

Se muestran construcciones de ejemplo en **4-13** a continuación. La **Tabla 4** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica PheP y una secuencia del promotor FNR para la inserción cromosómica (SEQ ID NO: 21), con la secuencia de *pheP* subrayada y la secuencia del promotor FNR en negrita. La **Tabla 5** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL1* y una secuencia del promotor FNR en un plásmido de alto número de copias (SEQ ID NO: 22), con la secuencia de *PAL1* subrayada y la secuencia del promotor FNR en negrita. La **Tabla 6** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y una secuencia del promotor FNR en un plásmido de alto número de copias (SEQ ID NO: 23), con la secuencia de *PAL3* subrayada y la secuencia del promotor FNR en negrita. La **Tabla 7** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL1* y una secuencia del promotor Tet en un plásmido de alto número de copias (SEQ ID NO: 24), con la secuencia de *PAL1* subrayada y la secuencia del promotor Tet en negrita. La **Tabla 8** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y una secuencia del promotor Tet en un plásmido de alto número de copias (SEQ ID NO: 25), con la secuencia de *PAL3* subrayada y la secuencia del promotor Tet en negrita. La **Tabla 9** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL1* y una secuencia del promotor FNR en un plásmido de bajo número de copias (SEQ ID NO: 26), con la secuencia de *PAL1* subrayada y la secuencia del promotor FNR en negrita. La **Tabla 10** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y una secuencia del promotor FNR en un plásmido de bajo número de copias (SEQ ID NO: 27), con la secuencia de *PAL3* subrayada y la secuencia del promotor FNR en negrita. La **Tabla 11** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL1* y una secuencia del promotor Tet en un plásmido de bajo número de copias (SEQ ID NO: 28), con la secuencia de *PAL1* subrayada y la secuencia del promotor Tet en negrita. La **Tabla 12** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y una secuencia del promotor Tet en un plásmido de bajo número de copias (SEQ ID NO: 29), con la secuencia de *PAL3* subrayada y la secuencia del promotor Tet en negrita. La **Tabla 13** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica PheP, un gen que codifica TetR, y una secuencia del promotor Tet para la inserción cromosómica (SEQ ID NO: 30), con la secuencia de *pheP* subrayada, la secuencia de TetR enmarcada y la secuencia del promotor FNR en negrita.

Tabla 4

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-PheP (SEQ ID NO: 21)
<u>CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTCAGAGCGTTACCTTGCCC</u> <u>TAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCCACAG</u> <u>GAGAAAACCGATGAAAAACGCGTCAACCGTATCGGAAGATACTGCGTCGA</u> <u>ATCAAGAGCCGACGCTTCATCGCGGATTACATAACCGTCATATTCAACTGAT</u> <u>TGCGTTGGTGGCGCAATTGGTACTGGTCTGTTTCTTGGCATTGGCCCGGCG</u> <u>ATTCAGATGGCGGGTCCGGCTGTATTGCTGGGCTACGGCGTCGCCGGGATC</u>
<u>ATCGCTTTCCTGATTATGCGCCAGCTTGCGGAAATGGTGGTTGAGGAGCCGG</u> <u>TATCCGGTTCATTTGCCACTTTGCCTATAAATACTGGGGACCGTTTGCGGG</u> <u>CTTCCTCTCTGGCTGGAATACTGGGTAATGTTTCGTGCTGGTGGGAATGGCA</u> <u>GAGCTGACCGCTGCGGGCATCTATATGCAGTACTGGTTCCCGGATGTTCCAA</u> <u>CGTGGATTGGGCTGCCGCTTCTTTATTATCATCAACGCCGTTAACCTGGT</u> <u>GAACGTGCGCTTATATGGCGAAACCGAGTTCTGGTTTGCGTTGATTAAAGTG</u> <u>CTGGCAATCATCGGTATGATCGGCTTTGGCCTGTGGCTGCTGTTTTCTGGTC</u> <u>ACGGCGGCGAGAAAGCCAGTATCGACAACCTCTGGCGCTACGGTGGTTTCT</u> <u>TCGCCACCGGCTGGAATGGGCTGATTTTGTGCTGGCGGTAATTATGTTCTC</u> <u>CTTCGGCGGTCTGGAGCTGATTGGGATTACTGCCGCTGAAGCGCGCGATCCG</u> <u>GAAAAAAGCATTCCAAAAGCGGTAAATCAGGTGGTGTATCGCATCCTGCTG</u> <u>TTTTACATCGGTTCACTGGTGGTTTACTGGCGCTCTATCCGTGGGTGGAAG</u> <u>TGAAATCCAACAGTAGCCCGTTTGTGATGATTTTCCATAATCTCGACAGCAA</u> <u>CGTGGTAGCTTCTGCGCTGAACCTTCGTCATTCTGGTAGCATCGCTGTCAGTG</u> <u>TATAACAGCGGGGTTTACTCTAACAGCCGCATGCTGTTTGGCCTTTCTGTGC</u> <u>AGGGTAATGCGCCGAAGTTTTTGACTCGCGTCAGCCGTCGCGGTGTGCCGAT</u> <u>TAACCTCGCTGATGCTTTCCGGAGCGATCACTTCGCTGGTGGTGTAAATCAAC</u> <u>TATCTGCTGCCGCAAAAAGCGTTTGGTCTGCTGATGGCGCTGGTGGTAGCAA</u> <u>CGCTGCTGTTGAACTGGATTATGATCTGTCTGGCGCATCTGCGTTTTCTGTC</u> <u>AGCGATGCGACGTCAGGGGGCTGAAACACAGTTTAAGGCGCTGCTCTATCC</u> <u>GTTTCGGCAACTATCTCTGCATTGCCTTCCTCGGCATGATTTTGCTGCTGATGT</u> <u>GCACGATGGATGATATGCGCTTGTGAGCGATCCTGCTGCCGGTGTGGATTGT</u> <u>ATTCTGTTTATGGCATTATAAACGCTGCGTCGGAAATAA</u>

Tabla 5

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-PALI, alto número de copias (SEQ ID NO: 22)
<u>CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTCAGAGCGTTACCTTGCCC</u> <u>TAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCCACAG</u> <u>GAGAAAACCGATGAAAACACTATCACAGGCCCAATCTAAAACCTTCTCACA</u> <u>GCAATTCAGCTTTACCGGGAACCTCGTCTGCGAATGTAATTATCGGCAATCAA</u> <u>AAGCTGACCATTAATGATGTAGCTCGCGTTGCCCGGAATGGCACTTTGGTGT</u> <u>CACTGACGAACAATACCGACATTCTGCAAGGTATTCAAGCTAGCTGCGATT</u> <u>ATATCAATAACGCCGTTGAATCTGGCGAGCCAATCTACGGGGTAACAAGCG</u> <u>GTTTTGGTGGGATGGCGAACGTTGCCATTAGCCGTGAACAGGCGAGCGAAC</u> <u>TTCAGACCAACCTCGTTTGGTTCCTAAAGACAGGAGCTGGTAATAAGTTACC</u> <u>TCTGGCTGACGTAAGAGCCGCGATGCTGCTTCGCGCTAATAGTCACATGCGC</u> <u>GGCGCCAGTGGTATCCGTCTTGAGCTTATCAAGAGGATGGAAATCTTCCTCA</u> <u>ACGCGGGTGTACACCATATGTTTATGAGTTTGGTAGTATCGGAGCCAGTGG</u> <u>TGATCTTGTTCCCTGAGTTATATTACGGGTTCAATTGATTGGTTTAGACCCGT</u> <u>CCTTTAAAGTGGATTTTAACGGGAAAGAAATGGACGCCCCGACCGCTTTAC</u> <u>GACAGCTTAATCTGAGCCCACTTACTTTGCTCCCTAAAGAAGGTCTTGCCAT</u> <u>GATGAATGGCACCTCTGTGATGACTGGAATTGCCGCGAATTGTGTGTATGAC</u> <u>ACGCAGATCCTAACGGCCATTGCCATGGGTGTTACGCGTTGGACATTCAAG</u>

CCCTGAATGGTACAAACCAGTCGTTTCATCCGTTTATCCATAATTCAAAACC
 CCATCCGGGACAGCTTTGGGCTGCTGATCAGATGATCTCACTCCTGGCCAAT
 AGTCAACTGGTTTCGGGACGAGCTCGACGGCAAACATGATTATCGCGATCAT
 GAGCTCATCCAGGACCGGTATTCCTTCGTTGTCTCCACAATACCTGGGGC
 CTATCGTTGATGGTATATCTCAAATTGCGAAGCAAATTGAAATTGAGATCAA
 TAGCGTAACCGACAACCCGCTTATCGATGTTGATAATCAGGCCTCTTATCAC
 GGTGGCAATTTTCTGGGCCAGTATGTTGGTATGGGGATGGATCACCTGCGGT
 ACTATATTGGGCTTCTGGCTAAACATCTTGATGTGCAGATTGCCTTATTAGC
 TTCACCAGAATTTTCAAATGGACTGCCGCCATCATTGCTCGGTAAACAGAGAA
 AGGAAAGTAAATATGGGCCTTAAGGGCTTCAGATATGTGGTAACTCAATC
 ATGCCCTCCTGACCTTTTATGGGAACTCAATTGCTGATCGTTTTCCGACAC
 ATGCTGAACAGTTTAAACAAAACATTAACACAGGGCTATACATCCGCGA
 CGTTAGCGCGTCGGTCCGTGGATATCTCCAGAATTATGTTGCTATCGCTCT
 GATGTTTCGGCGTACAGGCCGTTGATTTGCGCACTTATAAAAAAACCGGTCAC
 TACGATGCTCGGGCTTGCCTGTCGCCTGCCACCGAGCGGCTTTATAGCGCCG
 TACGTCATGTTGTGGGTCAGAAACCGACGTCGGACCGCCCTATATTTGGAA
 TGATAATGAACAAGGGCTGGATGAACACATCGCCCGGATATCTGCCGATAT
 TGCCGCCGGAGGTGTCATCGTCCAGGCGGTACAAGACATACTTCCTTGCCTG
 CATTAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
 TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC
 CTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG
 CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC
 AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCT
 CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
 TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
 AACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
 GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAT
 CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
 GCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCT
 TACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAT
 AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGG
 GCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA
 GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAG
 TTCTTGAAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA
 TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTG
 ATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAAGCAG
 CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA
 CGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCA
 TGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAG
 TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
 TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCAT
 AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCA
 TCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA
 GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
 CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTA

GAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC
 AGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
 TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
 GTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGT
 TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
 GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAT
 AGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATA
 CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
 GGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTA
 ACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTT
 CTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAA
 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTA
 GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCGACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC
 TGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGT
 ATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCT
 GACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG
 GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGG
 GCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATA
 TGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGC
 GCCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
 CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
 TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTT

Tabla 6

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-PAL3, alto número de copias (SEQ ID NO: 23)

CTCTTGATCGTTATCAATTCACGCTGTTTCAGAGCGTTACCTTGCCC
 TTAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCACAG
 GAGAAAACCGATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTAATA
 AAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAAAA
 AAAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAA
 AAATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACA
 GGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAAATCGCAGAG
 CATCAGCAAAATCTGTAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTC
 CAAACCTTGTATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAA
 GGTGTTGCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCAATTGTTGATCATATTA
 ATCATGACATTGTTCTCTGTTCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGG
 TGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAA
 GTTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAACGTGCA
 GGGTTGACACCATTATCGTTAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACG
 GCACCCGGGTAATGTCAGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAAACTGGAAA
 AACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAAGCATTACTT
 GCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTG

GTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGC
 AGGTTAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGTCGTCA
 TCAAGAAATTACCCAACATAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAATTCGC
 TGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGA
 AAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGATCC
 AGAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAAATTTTATGGGGCAATATGTCGC
 CCGAACAATGGATGCATTAATAACTGGATATTGCTTTAATTGCCAATCATCTT
 CACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTA
 ATTCAGTGAAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAAC
 TTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGT
 ATTCATACCCTCGCCACAGAACAATAACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTC
 TGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTGT
 TTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCATTATCTTCGCGGCAATATT
 AGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATC
 AGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCCTTGGATGAAGATATAATCCGCATTG
 CGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGA
 ATAAGCTTGCGCTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATC
 CGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT
 GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
 CGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA
 CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCA
 CTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
 AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA
 ACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
 TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC
 GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
 GCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCT
 TACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
 AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGG
 GCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA
 GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAG
 TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA
 TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTG
 ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAAGCAG
 CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA
 CGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCA
 TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAG
 TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
 TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCAT
 AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGGCTTACCA
 TCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCA
 GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
 CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTA
 GAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC
 AGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGT

TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
 GTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGCAGTGT
 TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
 GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAT
 AGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATA
 CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
 GGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTA
 ACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT
 CTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAA
 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA
 GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC
 TGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGT
 ATCACGAGGCCCTTTCTGCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCT
 GACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG
 GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCTGGG
 GCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATA
 TGGCGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGC
 GCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
 CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
 TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGTT

Tabla 7

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor Tet-PAL1, alto número de copias (SEQ ID NO: 24)

CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAACA
 CTATCACAGGCCCAATCTAAAACCTTTCACAGCAATTCAGCTTTACCGGGA
 ACTCGTCTGCGAATGTAATTATCGGCAATCAAAGCTGACCATTAATGATGT
 AGCTCGCGTTGCCCCGAATGGCACTTTGGTGTCACTGACGAACAATACCGA
 CATTCTGCAAGGTATTCAAGCTAGCTGCGATTATATCAATAACGCCGTTGAA
 TCTGGCGAGCCAATCTACGGGGTAACAAGCGGTTTTGGTGGGATGGCGAAC
 GTTGCCATTAGCCGTGAACAGGCGAGCGAACTTCAGACCAACCTCGTTTGGT
 TCCTAAAGACAGGAGCTGGTAATAAGTTACCTCTGGCTGACGTAAGAGCCG
 CGATGCTGCTTCGCGCTAATAGTCACATGCGCGGCCAGTGGTATCCGTCT
 TGAGCTTATCAAGAGGATGGAAATCTTCCTCAACGCGGGTGTACACCATAT
 GTTTATGAGTTTGGTAGTATCGGAGCCAGTGGTGATCTTGTTCCCTGAGTT
 ATATTACGGGTTCAATTGATTGGTTTAGACCCGTCCTTTAAAGTGGATTTAA
 CGGGAAAGAAATGGACGCCCGACCGCTTTACGACAGCTTAATCTGAGCCC
 ACTTACTTTGCTCCCTAAAGAAGGTCTTGCCATGATGAATGGCACCTCTGTG
 ATGACTGGAATTGCCGCGAATTGTGTGTATGACACGCAGATCCTAACGGCC
 ATTGCCATGGGTGTTACGCGTGGACATTCAAGCCCTGAATGGTACAAACC
 AGTCGTTTCATCCGTTTATCCATAATTCAAAACCCCATCCGGGACAGCTTG
 GGCTGCTGATCAGATGATCTCACTCCTGGCCAATAGTCAACTGGTTCGGGAC
 GAGCTCGACGGCAAACATGATTATCGCGATCATGAGCTCATCCAGGACCGG

TATTCACCTTCGTTGTCTCCCAACAATACCTGGGGCCTATCGTTGATGGTATATC
 TCAAATTGCGAAGCAAATTGAAATTGAGATCAATAGCGTAACCGACAACCC
 GCTTATCGATGTTGATAATCAGGCCTCTTATCACGGTGGCAATTTTCTGGGC
 CAGTATGTTGGTATGGGGATGGATCACCTGCGGTACTATATTGGGCTTCTGG
 CTAAACATCTTGATGTGCAGATTGCCCTATTAGCTTCACCAGAATTTTCAAA
 TGGACTGCCGCCATCATTGCTCGGTAACAGAGAAAGGAAAGTAAATATGGG
 CCTTAAGGGCCTTCAGATATGTGGTAACTCAATCATGCCCCCTCCTGACCTTT
 TATGGGAACTCAATTGCTGATCGTTTTCCGACACATGCTGAACAGTTTAACC
 AAAACATTAACCTCACAGGGCTATACATCCGCGACGTTAGCGCGTCGGTCCG
 TGGATATCTTCCAGAAATATGTTGCTATCGCTCTGATGTTCCGGCGTACAGGC
 CGTTGATTTGCGCACTTATAAAAAAACCGGTCCTACGATGCTCGGGCTTGC
 CTGTCGCCTGCCACCGAGCGGCTTTATAGCGCCGTACGTCATGTTGTGGGTC
 AGAAACCGACGTCGGACCGCCCCTATATTGGAATGATAATGAACAAGGGC
 TGGATGAACACATCGCCCGGATATCTGCCGATATTGCCGCGGAGGTGTAT
 CGTCCAGGCGGTACAAGACATACTTCCTTGCCTGCATTAAGCTTGGCGTAAT
 CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA
 CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
 GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGA
 AACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC
 GGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
 GGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG
 GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
 GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
 ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAA
 GCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCC
 GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT
 ATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
 CCCCCTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
 AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG
 ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGG
 CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
 AGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAA
 CCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
 AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
 CAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
 AGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCT
 AAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA
 GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCC
 CCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
 CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT
 AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATC
 CGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCG
 CCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT
 CACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAG
 GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGT

CCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA
 TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
 GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
 CCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC
 AGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCT
 CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
 CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
 ACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATG
 TTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTT
 ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAAT
 AGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAC
 CATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTT
 CGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCC
 CGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
 GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACATATG
 CGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
 CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTCA
 GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC
 GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGC
 CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGTAA
 GACCCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTCTAATCCGCATATGATCAATTCAAG
 GCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTGATCAAATAATTCGATAGC
 TTGTCGTAATAATGGCGGCATACTATCAGTAGTAGGTGTTTCCCTTTCTTCTT
 TAGCGACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCAACCTAAAGTAAAATGCC
 CACAGCGCTGAGTGCATATAATGCATTCTCTAGTGAAAAACCTTGTGGCAT
 AAAAAGGCTAATTGATTTTCGAGAGTTTCATACTGTTTTCTGTAGGCCGTG
 TACCTAAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAGTAAAGCACATCTAAA
 ACTTTTAGCGTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTTTCCCCTTCTAAAGGG
 CAAAAGTGAGTATGGTGCCTATCTAACATCTCAATGGCTAAGGCGTCGAGC
 AAAGCCCCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAGGCTGCTCTACACCTA
 GCTTCTGGGCGAGTTTACGGGTGTTAAACCTTCGATTCCGACCTCATTAAAG
 CAGCTCTAATGCGCTGTTAATCACTTTACTTTTATCTAATCTAGACATCATT
 ATTCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACCTC
 CCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAA

Tabla 8

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor Tet-PAL3, alto número de copias (SEQ ID NO: 25)

CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGCT
AAAGATGTTTACGCCAACCAATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTGG
AAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAAAAAAGTAGAAATATCAACGG
AGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAA
ATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCA

ATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTTAAC
 TTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAACCTTGTATTAAAGCGT
 CACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACC
 AATTGTGCTCAAGCAATTGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTCTCTG
 GTTCTCTGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTATCTTA
 TATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAAGTTTATTATATGGGCGCAGAA
 ATTGACGCTGCTGAAGCAATTAACGTCAGGGTTGACACCATTATCGTTAA
 AAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGAA
 TCAGTGCAATCACCGTCATTAACTGGAAAAACTATTTAAAGCCTCAATTC
 TCGGATTGCCCTTGCTGTGAAGCATTAATTGCATCTCATGAACATTATGAT
 GCCCGGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAAGT
 GCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATCTGGGG
 TTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGTGCTCATCAAGAAATTACCCAATAA
 ATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGG
 TATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAAATATTGGAACGGGAAGT
 TATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGATCCAGAAAAATGGCGATGTTCTA
 CACGGTGGAATTTTATGGGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTA
 AAATGGAATATTGCTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTAT
 GATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTCCGACACCC
 GGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAACCTTCTCAAACCGCTTTAGTTG
 CTGCAATTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGA
 ACAATACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTT
 TTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAG
 TTTGTCAGGCCATTATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAAC
 TGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGAT
 CGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATC
 AACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGAATAAGCTTGCGGTAATCATG
 GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC
 ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC
 TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACC
 TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
 TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
 GTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
 TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
 GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG
 GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTC
 CCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCT
 TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT
 CAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCC
 GTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC
 CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
 GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTA
 ACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
 AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAC
 CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA

```

AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
GGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAG
TATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA
CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT
CGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGC
AATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAA
CCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCA
GTTAATAGTTTTCGCAACGTTTGTTCCTTGTACAGGCATCGTGGTGTAC
GCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTGAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCG
AGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTT
CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTG
ACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG
AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
ACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAA
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAA
CTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTG
AATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG
GGGTTCGCGCGACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA
TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG
TCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAAGTATGCG
GCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCG
CACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGG
CTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAG
GGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGTTAAGAC
CCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTTCTAATCCGCATATGATCAATTCAAGGCC
GAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTGATCAAATAATTCGATAGCTTGT
CGTAATAATGGCGGCATACTATCAGTAGTAGGTGTTTCCCTTTCTTCTTAGC
GACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCAACCTAAAGTAAATGCCCCACA
GCGCTGAGTGATATAATGCATTCTCTAGTGAAAAACCTTGTTGGCATAAAA
AGGCTAATTGATTTTCGAGAGTTTCATACTGTTTTTCTGTAGGCCGTGTACCT
AAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAGTAAAGCACATCTAAAACCTT
TAGCGTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTTTCCCTTCTAAAGGGCAAAA
GTGAGTATGGTGCTATCTAACATCTCAATGGCTAAGGCGTCGAGCAAAGC
CCGCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAGGCTGCTCTACACCTAGCTTCT
GGGCGAGTTTACGGGTTGTAAACCTTCGATTCGACCTCATTAAGCAGCTC
TAATGCGCTGTAAATCACTTTACTTTTATCTAATCTAGACATCATTAATTCCT
AATTTTTGTTGACACTCTATCATTTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTAT
CAGTGATAGAGAAAAGTGAA

```

Tabla 9

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-PAL1, bajo número de copias (SEQ ID NO: 26)

CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTCAGAGCGTTACCTTGCCC
TTAAACATTAGCAATGTTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCCACAG
GAGAAAACCGATGAAAACACTATCACAGGCCCAATCTAAAACTTCTTCACA
GCAATTCAGCTTTACCGGGAACCTCGTCTGCGAATGTAATTATCGGCAATCAA
AAGCTGACCATTAATGATGTAGCTCGCGTTGCCCGGAATGGCACTTTGGTGT
CACTGACGAACAATACCGACATTCTGCAAGGTATTCAAGCTAGCTGCGATT
ATATCAATAACGCCGTTGAATCTGGCGAGCCAATCTACGGGGTAACAAGCG
GTTTTGGTGGGATGGCGAACGTTGCCATTAGCCGTGAACAGGCGAGCGAAC
TTCAGACCAACCTCGTTTGGTTCCTAAAGACAGGAGCTGGTAATAAGTTACC
TCTGGCTGACGTAAGAGCCGCGATGCTGCTTCGCGCTAATAGTCACATGCGC
GGCGCCAGTGGTATCCGTCTTGAGCTTATCAAGAGGATGGAAATCTTCCTCA
ACGCGGGTGTACACCATATGTTTATGAGTTTGGTAGTATCGGAGCCAGTGG
TGATCTTGTTCCCCTGAGTTATATTACGGGTTTATTGATTGGTTTAGACCCGT
CCTTTAAAGTGGATTTTAAACGGGAAAGAAATGGACGCCCCGACCGCTTTAC
GACAGCTTAATCTGAGCCCACTTACTTTGCTCCCTAAAGAAGGTCTTGCCAT
GATGAATGGCACCTCTGTGATGACTGGAATTGCCGCGAATTGTGTGTATGAC
ACGCAGATCCTAACGGCCATTGCCATGGGTGTTACGCGGTTGGACATTCAAG
CCCTGAATGGTACAAACAGTCGTTTCATCCGTTTATCCATAATTCAAAACC
CCATCCGGGACAGCTTTGGGCTGCTGATCAGATGATCTCACTCCTGGCCAAT
AGTCAACTGGTTCGGGACGAGCTCGACGGCAAACATGATTATCGCGATCAT
GAGCTCATCCAGGACCGGTATTCACTTCGTTGTCTCCCACAATACCTGGGGC
CTATCGTTGATGGTATATCTCAAATTGCGAAGCAAATTGAAATTGAGATCAA
TAGCGTAACCGACAACCCGCTTATCGATGTTGATAATCAGGCCTCTTATCAC
GGTGGCAATTTTCTGGGCCAGTATGTTGGTATGGGGATGGATCACCTGCGGT
ACTATATTGGGCTTCTGGCTAAACATCTTGATGTGCAGATTGCCTTATTAGC
TTCAACAGAATTTTCAAATGGACTGCCGCCATCATTGCTCGGTAACAGAGAA
AGGAAAGTAAATATGGGCCTTAAGGGCCTTCAGATATGTGGTAACTCAATC
ATGCCCCCTCCTGACCTTTTATGGGAACTCAATTGCTGATCGTTTTCCGACAC
ATGCTGAACAGTTTAACCAAAACATTAACCTCACAGGGCTATACATCCGCGA
CGTTAGCGCGTCGGTCCGTGGATATCTTCCAGAATTATGTTGCTATCGCTCT
GATGTTTCGGCGTACAGGCCGTTGATTGCGCACTTATAAAAAAACCGGTCAC
TACGATGCTCGGGCTTGCTGTGCGCTGCCACCGAGCGGCTTTATAGCGCCG
TACGTCATGTTGTGGGTGAGAAACCGACGTCGGACCGCCCCTATATTGGAA
TGATAATGAACAAGGGCTGGATGAACACATCGCCCGGATATCTGCCGATAT
TGCCGCGGAGGTGTCATCGTCCAGGCGGTACAAGACATACTTCCTTGCCTG
CATTAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC
CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG
CCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC

AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC GTATTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCGCT
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
TCAAAGGCGGTAGTACGGGTTTTGCTGCCCGCAAACGGGCTGTTCTGGTGTT
GCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGATCCGGCTTCAGGTTTGCCGGCTGAAAG
CGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCCCACGGGAGGCGTCACTG
GCTCCCGTGTTGTCGGCAGCTTTGATTGATAAGCAGCATCGCCTGTTTCAG
GCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATT
TCATGTTCTAGTTGCTTTGTTTTACTGGTTTTCACCTGTTCTATTAGGTGTTAC
ATGCTGTTTCATCTGTTACATTGTCGATCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTAAATG
CACCAAAAACTCGTAAAAGCTCTGATGATCTATCTTTTTTACACCGTTTTCA
TCTGTGCATATGGACAGTTTTCCCTTTGATATCTAACGGTGAACAGTTGTTCT
ACTTTTGTTTGTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATACAAGAGCCATAAGA
ACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCTAGTGTGGTTTCGTTGTT
TTTGCGTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCATGCTTACTTTGCATGTC
ACTCAAAAATTTGCTCAAAACCTGGTGAGCTGAATTTTTGCAGTTAAAGCA
TCGTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGG
TTGTTGGTATTTTGTCAACCATTCATTTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTA
CGAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAAAATCAACGTATCAGTCGG
GCGGCCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGCTGTAAGTGTTAAATCTT
TACTTATTGGTTTCAAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTAACTCATGGTAGTTA
TTTTCAAGCATTAACATGAACCTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTG
CCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAATAACCACTCATAAATCCTC
ATAGAGTATTTGTTTTCAAAAGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTATGA
ATTTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTTCACTAAAAACTAATTC
TAATTTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAAGTTTGTCCACTGGAAAATCTCAAAG
CCTTTAAACCAAAGGATTCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCTGGT
TGCTTTAGCTAATACACCATAAGCATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAG
CGTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCCCTGTAGGGTTTTCA
ATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAATTAGCTTGGTTTCATGCT
CCGTAAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTTCATTTGCTTTGAAAACAATAA
TTCAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTAATCACTATAACCAATTG
AGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTTCCCTTGAGTTGTGGGTA
TCTGTAAATTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATTCTGCTAGACC
CTCTGTAAATTCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTTGTATTATTTCAAGTGG
TTATAATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATC
CCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTTCCGCAGTATTACAAAAG
GATGTCGCAAACGCTGTTTGCTCCTCTACAAAACAGACCTTAAACCCATAAA
GGCTTAAGTAGCACCTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATATTCCTTTTG
TCTCCGACCATCAGGCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTCGTGACATTCAGTTCCG
TGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGTAAATGGCACTACAGGCGCCT
TTTATGGATTCATGCAAGGAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCAC
GGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTT
TTTGCTGTTACAGAGTTCCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGAT
TATCCCGTGACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGG
TATCATCAACAGGCTTACCCGTCCTTACTGTCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTC
AGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA

GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTA
AAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATA
AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCC
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGC
CAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTC
ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC
CTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTAT
GGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
CCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC
AGAAGTTTAAAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCT
CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACC
CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
ACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATG
TTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAAT
AGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAC
CATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTT
CGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCC
CGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAATATG
CGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTCA
GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC
GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTACGC
CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTCG

Tabla 10

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-PAL3, bajo número de copias (SEQ ID NO: 27)

CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTCAGAGCGTTACCTTGCCC
TTAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCCACAG
GAGAAAACCGATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTAATAA
AAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAAAAA
AAAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAA
AAATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACA
GGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAAATCGCAGAG
CATCAGCAAAATCTGTTAACTTTTCTTCTGCTGCTACTGGGGACTATATGTC
CAAACCTTGTATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAA
GGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCAATTGTTGATCATATTA

ATCATGACATTGTTCCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGG
 TGATTAAATTCCTTTATCTTATATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAA
 GTTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAACGTGCA
 GGGTTGACACCATTTATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACG
 GCACCCGGGTAATGTGAGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAAACTGGAAA
 AACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAAGCATTACTT
 GCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTG
 GTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGC
 AGGTAAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGTCGTCA
 TCAAGAAATTAACCAACTAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAATTCGC
 TGTGACACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGA
 AAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGATCC
 AGAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAATTTTATGGGGCAATATGTGCG
 CCGAACAATGGATGCATTAAACTGGATATTGCTTTAATTGCCAATCATCTT
 CACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTA
 ATTCACTGAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAAC
 TTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGT
 ATTCATACCCTCGCCACAGAACAATAACAATCAAGATATTGTCAGTTAGGTC
 TGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTGT
 TTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCATTATCTTCGCGGCAATATT
 AGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATC
 AGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTG
 CGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGA
 ATAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC
 CGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT
 GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
 CGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA
 CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCA
 CTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
 AAAGGCGGTAGTACGGGTTTTGCTGCCCGCAAACGGGCTGTTCTGGTGTTGC
 TAGTTTGTTATCAGAATCGCAGATCCGGCTTCAGGTTTGCCGGCTGAAAGCG
 CTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCCCACGGGAGGCGTCACTGGCT
 CCCGTGTTGTCGGCAGCTTTGATTCGATAAGCAGCATCGCCTGTTTCAGGCT
 GTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATTTCA
 TGTTCATCTGTTACATTGTCGATCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTAAATGCAC
 CAAAAACTCGTAAAAGCTCTGATGTATCTATCTTTTTTACACCGTTTTTCATCT
 GTGCATATGGACAGTTTTCCCTTTGATATCTAACGGTGAACAGTTGTTCTAC
 TTTTGTTTGTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATAACAAGAGCCATAAGAAC
 CTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTT
 TGCGTGAGCCATGAGAACGAACCATGAGATCATGCTTACTTTGCATGTCAC
 TCAAAAATTTTGCTCAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGCAGTTAAAGCATC
 GTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGGTT
 GTTGGTATTTTGTACCATTCATTTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTAC
 GAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGAAAAATCAACGTATCAGTCGGG
 CGGCCTCGCTTATCAACCACCAATTTATATTGCTGTAAGTGTTTAAATCTTT

ACTTATTGGTTTCAAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTAT
 TTTCAAGCATTAACATGAACTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGC
 CTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAATAACCACTCATAAATCCTCA
 TAGAGTATTTGTTTTCAAAAGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTATGAAT
 TTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTTCACTAAAACTAATTCTA
 ATTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGGAAAATCTCAAAGCC
 TTTAACCAAAGGATTCCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCTGGTTG
 CTTTAGCTAATAACACCATAAGCATTTCCTTACTGATGTTTCATCATCTGAGC
 GTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCCCTGTAGGGTTTTCAA
 TCGTGGGGTTGAGTAGTGCACACAGCATAAAATTAGCTTGGTTTCATGCTC
 CGTTAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTTCATTTGCTTTGAAAACAATAAT
 TCAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTAATCACTATAACCAATTGA
 GATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTTCCTTTGAGTTGTGGGTAT
 CTGTAAATTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATTCTGCTAGACCC
 TCTGTAAATTCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTTGTATTATTCAAGTGGT
 TATAATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATC
 CCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTTCCGCAGTATTACAAAAG
 GATGTCGCAAACGCTGTTTGCTCCTCTACAAAACAGACCTTAAAACCCTAAA
 GGCTTAAGTAGCACCCCTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATATTCCTTTTG
 TCTCCGACCATCAGGCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTCGTGACATTCAGTTCGC
 TCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGGCACTACAGGCGCCT
 TTTATGGATTTCATGCAAGGAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCAC
 GGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTT
 TTTGCTGTTACGAGTTCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGAT
 TATCCCGTGACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGG
 TATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTACTGTCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTC
 AGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA
 GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTA
 AAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
 GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
 CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
 GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTATCAGCAATA
 AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCC
 GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGC
 CAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTC
 ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
 CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC
 CTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTAT
 GGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
 GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
 CCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC
 AGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCT
 CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
 CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
 ACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATG
 TTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT

ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAAT
 AGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAC
 CATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTT
 CGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCC
 CGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
 GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACATG
 CGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
 CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTCA
 GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC
 GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGC
 CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCG

Tabla 11

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor Tet-PAL1, bajo número de copias (SEQ ID NO: 28)

ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAACTCTAGAAATAATTTTGT
TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAACACTATCACAGGCCCAATC
TAAAACCTTCTTCACAGCAATTCAGCTTTACCGGGAACTCGTCTGCGAATGTA
ATTATCGGCAATCAAAAAGCTGACCATTAATGATGTAGCTCGCGTTGCCCGGA
ATGGCACTTTGGTGTCACTGACGAACAATACCGACATTCTGCAAGGTATTCA
AGCTAGCTGCGATTATATCAATAACGCCGTTGAATCTGGCGAGCCAATCTAC
GGGGTAACAAGCGGTTTTTGGTGGGATGGCGAACGTTGCCATTAGCCGTGAA
CAGGCGAGCGAACTTCAGACCAACCTCGTTTGGTTCCTAAAGACAGGAGCT
GGTAATAAGTTACCTCTGGCTGACGTAAGAGCCGCGATGCTGCTTCGCGCTA
ATAGTCACATGCGCGGGCGCCAGTGGTATCCGTCTTGAGCTTATCAAGAGGAT
GGAAATCTTCCTCAACGCGGGTGTACACCATATGTTTATGAGTTTGGTAGT
ATCGGAGCCAGTGGTGATCTTGTTCCTCGAGTTATATTACGGGTTTCATTGA
TTGGTTTAGACCCGTCCTTTAAAGTGGAATTTAACGGGAAAGAAATGGACGC
CCCGACCGCTTTACGACAGCTTAATCTGAGCCCACTACTTTGCTCCCTAAA
GAAGGTCTTGCCATGATGAATGGCACCTCTGTGATGACTGGAATTGCCGCG
AATTGTGTGTATGACACGCAGATCCTAACGGCCATTGCCATGGGTGTTCACG
CGTTGGACATTCAAGCCCTGAATGGTACAAACCAGTCGTTTCATCCGTTTAT
CCATAATTCAAAACCCCATCCGGGACAGCTTTGGGCTGCTGATCAGATGATC
TCACTCCTGGCCAATAGTCAACTGGTTTCGGGACGAGCTCGACGGCAAACAT
GATTATCGCGATCATGAGCTCATCCAGGACCGGTATTCACCTTCGTTGTCTCC
CACAATACCTGGGGCCTATCGTTGATGGTATATCTCAAATTGCGAAGCAAAT
TGAAATTGAGATCAATAGCGTAACCGACAACCCGCTTATCGATGTTGATAAT
CAGGCCTCTTATCACGGTGGCAATTTTCTGGGCCAGTATGTTGGTATGGGGA
TGGATCACCTGCGGTACTATATTGGGCTTCTGGCTAAACATCTTGATGTGCA
GATTGCCTTATTAGCTTCACCAGAATTTTCAAATGGACTGCCGCCATCATTG
CTCGGTAACAGAGAAAGGAAAGTAAATATGGGCCTTAAGGGCCTTCAGATA
TGTGGTAACTCAATCATGCCCTCCTGACCTTTTATGGGAACTCAATTGCTG
ATCGTTTTCCGACACATGCTGAACAGTTTAACCAAAACATTAACACAGGG
CTATACATCCGCGACGTTAGCGCGTCGGTCCGTGGATATCTTCCAGAATTAT
GTTGCTATCGCTCTGATGTTCCGGGTACAGGCCGTTGATTTGCGCACTTATA

AAAAAACCGGTCACCTACGATGCTCGGGCTTGCCTGTCGCCTGCCACCGAGC
 GGCTTTATAGCGCCGTACGTCATGTTGTGGGTCAGAAACCGACGTCGGACC
 GCCCCTATATTTGGAATGATAATGAACAAGGGCTGGATGAACACATCGCCC
 GGATATCTGCCGATATTGCCGCCGGAGGTGTCATCGTCCAGGCGGTACAAG
 ACATACTTCCTTGCCTGCATTAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
 CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAG
 CATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
 TCGGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTG
 CATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGC
 TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCG
 AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAGTACGGGTTTTGCTGCCCGCAA
 CGGGCTGTTCTGGTGTGCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGATCCGGCTTCA
 GGTTTGCCGGCTGAAAGCGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCCC
 ACGGGAGGCGTCACTGGCTCCCGTGTGTCGGCAGCTTTGATTCGATAAGCA
 GCATCGCCTGTTTCAGGCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTG
 TCTCAGGTGTTCAATTTTCATGTTCTAGTTGCTTTGTTTTACTGGTTTCACCTGT
 TCTATTAGGTGTTACATGCTGTTTCATCTGTTACATTGTCGATCTGTTTCATGGT
 GAACAGCTTTAAATGCACCAAAAACCTCGTAAAAGCTCTGATGTATCTATCTT
 TTTTACACCGTTTTTCATCTGTGCATATGGACAGTTTTCCCTTTGATATCTAAC
 GGTGAACAGTTGTTCTACTTTTGTGTTGTTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGAT
 ACAAGAGCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCT
 AGTGTGGTTCGTTGTTTTTGCCTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCAT
 GCTTACTTTGCATGTCACTCAAAAATTTTGCCTCAAAAACCTGGTGAGCTGAAT
 TTTTGCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTGTTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTAGG
 AATCTGATGTAATGGTTGTTGGTATTTTGTCAACCATTCATTTTTATCTGGTTG
 TTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGAAAAA
 TCAACGTATCAGTCGGGCGGCCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGCT
 GTAAGTGTTTAAATCTTTACTTATTGGTTTCAAAACCCATTGGTTAAGCCTTT
 TAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCATTAAACATGAACCTAAATTCATCAAG
 GCTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAATAA
 CCACTCATAAATCCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAAGACTTAACATGTTCC
 AGATTATATTTTATGAATTTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTT
 CACTAAAAACTAATTCTAATTTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCA
 CTGGAATCTCAAAGCCTTTAACCAGGATTTCCTGATTTCCACAGTTCTC
 GTCATCAGCTCTCTGGTTGCTTTAGCTAATAACCCATAAGCATTTCCTACT
 GATGTTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCT
 TTCCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAA
 TTAGCTTGGTTTCATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTTCATTT
 GCTTTGAAAACAACCTAATTCAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTT
 AATCACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTT
 CCTTTGAGTTGTGGGTATCTGTAAATTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCT
 GTAAATTCTGCTAGACCCTCTGTAAATTCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTT
 TGTTTATATTCAAGTGGTTATAATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAAA
 GATAAAAAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTT
 CCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAACGCTGTTTGTCTCTACAAAACA
 GACCTTAAAACCTAAAGGCTTAAGTAGCACCTCGCAAGCTCGGGCAAAT
 CGCTGAATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACCTGAGTCGCTGTCTTTT

TCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAA
 TGGCACTACAGGCGCCTTTTATGGATTCATGCAAGGAACTACCCATAATAC
 AAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATG
 TGGTGCTATCTGACTTTTTGCTGTTACAGAGTTCCTGCCCTCTGATTTTCCAG
 TCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCAC
 CCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTACTGTCTTTTCT
 ACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTC
 ATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAA
 GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCA
 ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCC
 ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTAC
 CATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCC
 AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTG
 GTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGC
 TAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCG
 GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
 CGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCAT
 CCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
 ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAT
 ACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTT
 CGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA
 ACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT
 CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAA
 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA
 GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACC
 TGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGT
 ATCAGGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCT
 GACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG
 GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGG
 GCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATA
 TGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGC
 GCCATTTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
 CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
 TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG
 CCAGTGAATTCGTTAAGACCCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTCTAATCCGC
 ATATGATCAATTCAAGGCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTGAT
 CAAATAATTCGATAGCTTGTGCGTAATAATGGCGGCATACTATCAGTAGTAGG
 TGTTTCCCTTTCTTCTTTAGCGACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCAAC
 CTAAAGTAAAATGCCCCACAGCGCTGAGTGCATATAATGCATTCTCTAGTGA
 AAAACCTTGTTGGCATAAAAAGGCTAATTGATTTTCGAGAGTTTCATACTGT
 TTTTCTGTAGGCCGTGTACCTAAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAG
 TAAAGCACATCTAAAACCTTTAGCGTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTT
 TCCCCTTCTAAAGGGCAAAAGTGAGTATGGTGCCTATCTAACATCTCAATGG
 CTAAGGCGTCGAGCAAAGCCCGCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAGG

CTGCTCTACACCTAGCTTCTGGGCGAGTTTACGGGTTGTAAACCTTCGATT
 CCGACCTCATTAAGCAGCTCTAATGCGCTGTTAATCACTTTACTTTTATCTAA
 TCTAGACATCATTAATTCCCTAATTTTT**GTGACACTCTATCATTGATAGAG**
TTATTTT

Tabla 12

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor Tet-PAL3, bajo número de copias (SEQ ID NO: 29)

ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAACCTAGAAATAATTTTGT
 TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGCCAAC
 CATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATT
 GCGATAAAACAAAAAAAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAACTTTTG
 ACGCATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATA
 TATGGAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTG
 AGAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTAACTTTTCTTTCTGCTGGTAC
 TGGGGACTATATGTCCAAACCTTGTATTAAGCGTCACAATTTACTATGTTA
 CTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTGCTCAAGCAA
 TTGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTTCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCA
 GTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGAGCATTAT
 GTGGTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAG
 CAATTAACGTCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTC
 TTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGAATCAGTGCAATCACCGT
 CATTAACTGGAAAACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCT
 GTTGAAGCATTACTTGCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTCAACAAG
 TAAAAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATT
 GGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAA
 TAAAGCTTGTGTCATCAAGAAATTACCCAATAAATGATACCTTACAGGA
 AGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCT
 TTAGCTACCGCTCGGAAAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGAT
 AATCCATTGATAGATCCAGAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAATTTTA
 TGGGGCAATATGTGCCCCGAACAATGGATGCATTAAAACTGGATATTGCTTT
 AATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTTTCT
 CTCGTGGATTACCTAATTCAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTT
 TAAAGGCGTCCAACCTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCATGAT
 TGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGAACAATACAATCAAGATA
 TTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAA
 ATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCATTTCAT
 CTTGCGGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAACTGCTAAATTTTACCATG
 CAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGGATGAAGA
 TATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAA
 ATCATGCTGGAAGAATAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
 GTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT
 AAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC
 GTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT
 TAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCT
 TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTGCGCTGCGGCGAG

ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTAC
 CATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCC
 AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTG
 GTCCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
 TAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCG
 GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
 CGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCAT
 CCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
 ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAT
 ACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTT
 CGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA
 ACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT
 CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAA
 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA
 GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC
 TGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGT
 ATCACGAGGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCT
 GACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG
 GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGG
 GCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATA
 TGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGC
 GCCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
 CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
 TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG
 CCAGTGAATTCGTTAAGACCCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTTCTAATCCGC
 ATATGATCAATTCAAGGCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTGAT
 CAAATAATTCGATAGCTTGTCTGTAATAATGGCGGCATACTATCAGTAGTAGG
 TGTTTCCCTTTCTTCTTTAGCGACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCAAC
 CTAAGTAAAATGCCCCACAGCGCTGAGTGCATATAATGCATTCTCTAGTGA
 AAAACCTTGTGGCATAAAAAGGCTAATTGATTTTCGAGAGTTTCATACTGT
 TTTTCTGTAGGCCGTGTACCTAAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAG
 TAAAGCACATCTAAAACCTTTTAGCGTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTT
 TCCCCTTCTAAAGGGCAAAAGTGAGTATGGTGCCTATCTAACATCTCAATGG
 CTAAGGCGTCGAGCAAAGCCCGCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAGG
 CTGCTCTACACCTAGCTTCTGGGCGAGTTTACGGGTTGTTAAACCTTCGATT
 CCGACCTCATTAAGCAGCTCTAATGCGCTGTTAATCACTTTACTTTTATCTAA
 TCTAGACATCATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAG
 TTATTTT

Tabla 13

Secuencias de nucleótidos de construcción de TetR-PheP, bajo número de copias (SEQ ID NO: 30)

```

ccagtgaattcgttaagaccactttcacatttaagttgttttctaataccgcataatgaattcaagccgaataagaagcgtgg
ctctgcaccttggtgatcaataatcgatagcttgcgttaataatggcgccatactatcagtagtaggtgttccctttctttag
cgacttgatgctcttgatctccaatcgcaacctaaagtaaaatgccccacagcgctgagtgcatataatgcattctctagtga
aaacctgttggcataaaaaggctaattgatttcgagagtttcatactgttttctgtaggccgtgtacctaaatgtactttgtcca
tcgcatgacttagtaaaagcacatctaaacttttagcgttattacgttaaaaatcttgccagcttccccctttaaaggcgcaaaag
tgagtatggtgcctatctaactcctaattggttaaggcgtcgagcaaaagcccgcttatttttacatgccaatacaatgtaggctg
ctctacacctagcttctggggcagtttacgggtgttaaaccttcgattccgacctcattaagcagctcattgctgttaatacct
ttacttttatctaactagacatcattaatcctaattttgttgacactctatcattgatagagttattttaccactccctatcagtg
atagagaaaagtgaaactctagaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatATGAAAAACGCGTCAA
CCGTATCGGAAGATACTGCGTCGAATCAAGAGCCGACGCTTCATCGCGGAT
TACATAACCGTCATATTCAACTGATTGCGTTGGGTGGCGCAATTGGTACTGG
TCTGTTTCTTGGCATTGGCCCCGGCGATTTCAGATGGCGGGTCCGGCTGTATTG
CTGGGCTACGGCGTCGCCGGGATCATCGCTTTCCTGATTATGCGCCAGCTTG
GCGAAATGGTGGTTGAGGAGCCGGTATCCGGTTCATTTGCCCACTTTGCCTA
TAAATACTGGGGACCGTTTGGCGGCTTCCTCTCTGGCTGGAATACTGGGTA
ATGTTTCGTGCTGGTGGGAATGGCAGAGCTGACCGCTGCGGGCATCTATATG
CAGTACTGGTTCCCGGATGTTCCAACGTGGATTTGGGCTGCCGCCTTCTTTA
TTATCATCAACGCCGTTAACCTGGTGAACGTGCGCTTATATGGCGAAACCGA
GTTCTGGTTTTCGTTGATTAAAGTGCTGGCAATCATCGGTATGATCGGCTTT
GGCCTGTGGCTGCTGTTTTCTGGTACGGCGGCGAGAAAGCCAGTATCGAC
AACCTCTGGCGCTACGGTGGTTTCTTCGCCACCGGCTGGAATGGGCTGATT
TGTCGCTGGCGGTAATTATGTTCTCCTTCGGCGGTCTGGAGCTGATTGGGAT
TACTGCCGCTGAAGCGCGCATCCGGAAGCAAGCAATTCGCAAGCGGTAAA
TCAGGTGGTGATCGCATCCTGCTGTTTTACATCGGTTCACTGGTGGTTTTAC
TGGCGCTCTATCCGTGGGTGGAAGTGAAATCCAACAGTAGCCCGTTTGTGAT
GATTTTCCATAATCTCGACAGCAACGTGGTAGCTTCTGCGCTGAACTTCGTC
ATTCTGGTAGCATCGCTGTCAGTGTATAACAGCGGGGTTTACTCTAACAGCC
GCATGCTGTTTGGCCTTTCTGTGCAGGGTAATGCGCCGAAGTTTTTGAATCG
CGTCAGCCGTCGCGGTGTGCCGATTAATCGCTGATGCTTTCCGGAGCGATC
ACTTCGCTGGTGGTGTAACTCAACTATCTGCTGCCGCAAAAAGCGTTTGGTC
TGCTGATGGCGCTGGTGGTAGCAACGCTGCTGTTGAACTGGATTATGATCTG
TCTGGCGCATCTGCGTTTTCTGTGCAGCGATGCGACGTCAGGGGCGTGAAAC
ACAGTTTAAAGCGCTGCTCTATCCGTTTCGGCAACTATCTCTGCATTGCCTTCC
TCGGCATGATTTTGCTGCTGATGTGCACGATGGATGATATGCGCTTGTGAGC
GATCCTGCTGCCGGTGTGGATTGTATTCCTGTTTATGGCATTAAACGCTG
CGTCGGAAATAA

```

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente contienen una o más secuencias génicas que comprenden una o más secuencias de cualquiera de las SEQ ID No: 21-30. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente contienen una o más secuencias génicas que comprenden una o más secuencias que tienen al menos un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de las SEQ ID No: 21-30.

10 Transporte de fenilalanina

Cada uno de *PAL1* y *PAL3* se expresa en un plásmido de alto número de copias y un plásmido de bajo número de copias en Nissle de *E. coli* modificada genéticamente. Sorprendentemente, cada construcción metabolizó y redujo la fenilalanina a niveles similares (**figura 15**), y la etapa limitante de la velocidad del metabolismo de la fenilalanina fue la disponibilidad de fenilalanina (**figura 16**). Por lo tanto, en algunas realizaciones, resulta ventajoso aumentar el transporte de fenilalanina al interior de la célula, mejorando así el metabolismo de la fenilalanina. Inesperadamente, incluso los plásmidos PAL de bajo

número de copias son capaces de eliminar casi por completo la Phe de una muestra de prueba cuando se expresan junto con *pheP* (**figura 16A**). Además, puede haber ventajas adicionales al usar un plásmido que expresa PAL de bajo número de copias con *pheP* para mejorar la estabilidad de la expresión de PAL mientras se mantiene un alto metabolismo de fenilalanina y para reducir la presión de selección negativa en la bacteria transformada. En realizaciones alternativas, el transportador de fenilalanina se usa junto con el plásmido de alto número de copias.

Las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además un gen que codifica un transportador de fenilalanina. Los transportadores de fenilalanina pueden expresarse o modificarse en las bacterias manipuladas genéticamente de la invención para potenciar el transporte de fenilalanina al interior de la célula.

PheP es una proteína de transporte de membrana que es capaz de transportar fenilalanina al interior de las células bacterianas (véase, por ejemplo, Pi et al., 1991). En algunas realizaciones, el gen *pheP* nativo en las bacterias modificadas genéticamente de la invención no está modificado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden múltiples copias del gen *pheP* nativo. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden múltiples copias de un gen *pheP* no nativo. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden un gen *pheP* que está controlado por su promotor nativo, un promotor inducible, un promotor que es más fuerte que el promotor nativo, por ejemplo, el promotor GlnRS o el promotor P(Bla), o un promotor constitutivo. En algunas realizaciones, la expresión del gen *pheP* se controla por un promotor diferente que el promotor que controla la expresión del gen que codifica la enzima metabolizadora de fenilalanina y/o el regulador transcripcional. En algunas realizaciones, la expresión del gen *pheP* se controla por el mismo promotor que controla la expresión de la enzima metabolizadora de fenilalanina y/o el regulador transcripcional. En algunas realizaciones, el gen *pheP* y la enzima metabolizadora de fenilalanina y/o el regulador transcripcional se transcriben de forma divergente a partir de una región promotora. En algunas realizaciones, la expresión de cada uno de los genes que codifican PheP, la enzima metabolizadora de fenilalanina, y el regulador transcripcional se controla por un promotor diferente. En algunas realizaciones, la expresión de los genes que codifican PheP, la enzima metabolizadora de fenilalanina, y el regulador transcripcional se controla por el mismo promotor.

En algunas realizaciones, el gen *pheP* nativo en las bacterias modificadas genéticamente no está modificado, y una o más copias adicionales del gen *pheP* nativo se insertan en el genoma bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de PAL, por ejemplo, el promotor FNR, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de PAL, o un promotor constitutivo. En realizaciones alternativas, el gen *pheP* nativo no está modificado, y una copia de un gen *pheP* no nativo de una especie bacteriana diferente se inserta en el genoma bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de PAL, por ejemplo, el promotor FNR, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de PAL, o un promotor constitutivo.

En algunas realizaciones, el gen *pheP* nativo en las bacterias modificadas genéticamente no está modificado, y una o más copias adicionales del gen *pheP* nativo están presentes en las bacterias en un plásmido y bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de PAL, por ejemplo, el promotor FNR, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de la PME, o un promotor constitutivo. En realizaciones alternativas, el gen *pheP* nativo no está modificado, y una copia de un gen *pheP* no nativo de una especie bacteriana diferente está presente en las bacterias en un plásmido y bajo el

control del mismo promotor inducible que controla la expresión de *PAL*, por ejemplo, el promotor FNR, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de *PAL*, o un promotor constitutivo.

5 En algunas realizaciones, el gen *pheP* nativo muta, se seleccionan mutantes que exhiben un mayor transporte de fenilalanina, y el gen de *pheP* mutagenizado se aísla y se inserta en las bacterias manipuladas genéticamente (véase, por ejemplo, Pi et al., 1996; Pi et al., 1998). Las modificaciones del transportador de fenilalanina descritas en esta invención pueden estar presentes en un plásmido o cromosoma.

10 En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente es Nissle de *E. coli*, y el gen *pheP* nativo en Nissle de *E. coli* no está modificado; una o más copias adicionales de los genes *pheP* de Nissle de *E. coli* nativos se insertan en el genoma de Nissle de *E. coli* bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de *PAL*, por ejemplo,
 15 el promotor FNR, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de *PAL*, o un promotor constitutivo. En una realización alternativa, el gen *pheP* nativo en Nissle de *E. coli* no está modificado, y una copia de un gen *pheP* no nativo de una bacteria diferente se inserta en el genoma de Nissle de *E. coli* bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de *PAL*, por ejemplo, el promotor FNR, o un promotor inducible
 20 diferente que el que controla la expresión de *PAL*, o un promotor constitutivo. En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente es Nissle de *E. coli*, y el gen *pheP* nativo en Nissle de *E. coli* no está modificado; una o más copias adicionales de los genes *pheP* de Nissle de *E. coli* nativos están presentes en la bacteria en un plásmido y bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de *PAL*, por ejemplo, el
 25 promotor FNR, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de *PAL*, o un promotor constitutivo. En una realización alternativa, el gen *pheP* nativo en Nissle de *E. coli* no está modificado, y una copia de un gen *pheP* no nativo de una bacteria diferente, están presentes en la bacteria en un plásmido y bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de *PAL*, por ejemplo, el promotor FNR, o un promotor inducible
 30 diferente que el que controla la expresión de *PAL*, o un promotor constitutivo.

En otras realizaciones, el uno o más genes que codifican uno o más transportadores de Phe pueden estar ubicados en un plásmido o en el cromosoma y la expresión génica puede regularse mediante cualquiera de los promotores divulgados en esta invención, que pueden
 35 ser iguales o diferentes de los promotores que regulan el uno o más genes PME.

Se ha informado que *Escherichia coli* tiene cinco sistemas de transporte distintos (AroP, Mtr, PheP, TnaB y TyrP) para la acumulación de aminoácidos aromáticos. Una permeasa de aminoácidos general, codificada por el gen *aroP*, transporta tres aminoácidos aromáticos,
 40 incluida la fenilalanina, con alta afinidad y se cree, junto con PheP, responsable de la mayor parte de la importación de fenilalanina. Además, se observó un bajo nivel de acumulación de fenilalanina en una cepa de *E. coli* deficiente en el transportador de aminoácidos aromáticos (Δ aroP Δ pheP Δ mtr Δ tna Δ tyrP), y se atribuyó a la actividad del sistema LIV-I/LS, que es un transportador de aminoácidos de cadena ramificada que consiste en dos proteínas de unión
 45 periplásmicas, la proteína de unión a LIV (sistema LIV-I) y la proteína de unión a LS (sistema LS), y componentes de membrana, LivHMGF (Koyanagi et al., y referencias en el mismo; Identification of the LIV-I/LS System as the Third Phenylalanine Transporter in *Escherichia coli* K-12).

50 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un gen *aroP*. En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente es Nissle de *E. coli*, y el gen *aroP* nativo en Nissle de *E. coli* no está modificado; una o más copias adicionales de los genes *aroP* de Nissle de *E. coli* nativos están presentes en la bacteria en un plásmido o

en el cromosoma y bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de la PME, por ejemplo, el promotor FNR, o el promotor araBAD, un promotor inducible diferente del que controla la expresión de la PME, o un promotor constitutivo. En una realización alternativa, el gen *aroP* nativo en Nissle de *E. coli* no está modificado, y una

- 5 copia de un gen *aroP* no nativo de una bacteria diferente, están presentes en la bacteria en un plásmido o en el cromosoma y bajo el control del mismo promotor inducible que controla la expresión de la PME, por ejemplo, el promotor FNR o el promotor AraBAD, o un promotor inducible diferente que el que controla la expresión de la PME, o un promotor constitutivo.
- 10 En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden AroP y PheP, bajo el control del mismo o diferentes promotores inducibles o constitutivos.

En algunas realizaciones, el gen *pheP* se expresa en un cromosoma. En algunas realizaciones, la expresión del cromosoma puede ser útil para aumentar la estabilidad de la

15 expresión de *pheP*. En algunas realizaciones, el gen *pheP* se integra en el cromosoma bacteriano en uno o más sitios de integración en las bacterias manipuladas genéticamente. En algunas realizaciones, el gen *pheP* se inserta en el genoma bacteriano en uno o más de los siguientes sitios de inserción en Nissle de *E. coli*: *malE/K*, *insB/I*, *araC/BAD*, *lacZ*, *agal/rsml*, *thyA* y *malP/T*. Se puede usar cualquier sitio de inserción adecuado (véase, por

20 ejemplo, la **figura 66**). El sitio de inserción puede estar en cualquier parte del genoma, por ejemplo, en un gen necesario para la supervivencia y/o el crecimiento, tal como *thyA* (para crear un auxótrofo); en un área activa del genoma, tal como cerca del sitio de replicación del genoma; y/o entre promotores divergentes para reducir el riesgo de transcripción no deseada, tal como entre AraB y AraC del operón de arabinosa.

- 25 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican uno o más transportadores de Phe que se preinducen directa o indirectamente antes de la administración *in vivo*, por ejemplo, se expresan bajo el control de un promotor inducible que es responsable de las moléculas o metabolitos específicos que se proporcionan en el cultivo
- 30 de la bacteria en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo, durante la producción de la cepa antes de la administración *in vivo*.

En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente codifican uno o más transportadores de Phe que se inducen directa o indirectamente de la administración *in vivo*,

35 por ejemplo, se expresan bajo el control de un promotor inducible que es responsable de las condiciones o de las moléculas o metabolitos específicos en el entorno *in vivo* exógeno, por ejemplo, el intestino. En algunas realizaciones, el promotor se induce por moléculas específicas del intestino o condiciones de bajo contenido de oxígeno. En algunas realizaciones, las cepas bacterias se administran en combinación con un inductor químico

40 y/o nutricional.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente comprende múltiples mecanismos de acción y/o uno o más auxotrofias. En determinadas realizaciones, las bacterias se modifican genéticamente para comprender cinco copias de *PAL* bajo el control

45 de un promotor dependiente del nivel de oxígeno (por ejemplo, P_{fnrS} -*PAL3*) insertado en diferentes sitios de integración en el cromosoma (por ejemplo, *MalE/K*, *yicS/nepl*, *malP/T*, *agal/rsml* y *cea*) y una copia de un gen transportador de fenilalanina bajo el control de un promotor dependiente del nivel de oxígeno (por ejemplo, P_{fnrS} -*pheP*) insertado en un sitio de integración diferente en el cromosoma (por ejemplo, *lacZ*). En un aspecto más específico,

50 las bacterias se manipulan genéticamente para incluir además un gen de resistencia a la kanamicina y una auxotrofia de *thyA*, en las que el gen *thyA* se elimina y/o se reemplaza por un gen no relacionado.

Promotores inducibles independientes del nivel de oxígeno

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que son inducibles a través de un sistema inducible por arabinosa. Los genes del metabolismo de la arabinosa están organizados en un operón, AraBAD, que está controlado por el promotor PAraBAD. El promotor PAraBAD (o Para) cumple adecuadamente los criterios de los sistemas de expresión inducibles. PAraBAD muestra un control más estricto de la expresión génica de la carga útil que muchos otros sistemas, probablemente debido a la doble función reguladora de AraC, que funciona tanto como inductor como represor. Además, el nivel de expresión basado en ParaBAD se puede modular en una amplia gama de concentraciones de L-arabinosa para ajustar con precisión los niveles de expresión de la carga útil. Sin embargo, la población celular expuesta a concentraciones de L-arabinosa por debajo de la saturación se divide en dos subpoblaciones de células inducidas y no inducidas, lo que se determina por las diferencias entre las células individuales en la disponibilidad del transportador de L-arabinosa (Zhang et al., Development and Application of an Arabinose-Inducible Expression System by Facilitating Inducer Uptake in *Corynebacterium glutamicum*; Appl. Environ. Microbiol. Agosto de 2012 vol. 78 n.º 16 5831-5838). Como alternativa, la expresión inducible a partir del ParaBad se puede controlar o ajustar con precisión a través de la optimización del sitio de unión al ribosoma (RBS), como se describe en esta invención. En la **figura 62C** se representa una construcción de ejemplo (construcción para la expresión de PAL bajo el control de un promotor inducible por arabinosa).

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por arabinosa. En un caso, la expresión de PAL se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por arabinosa. En una realización, la expresión de PheP se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por arabinosa. En una realización, la expresión de LAAD se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por arabinosa. En una realización, la expresión de FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por arabinosa.

En otra realización, uno o más promotores inducibles por arabinosa impulsan la expresión de uno o más mensajes bicistrónicos. Los mensajes bicistrónicos inducidos por arabinosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. Los ejemplos no limitantes de dichos mensajes bicistrónicos incluyen, en cualquier orientación, PAL y PheP, PAL y LAAD, PAL y FNRS24Y, PheP y LAAD, PheP y FNRS24Y, LAAD y FNRS24Y. Los mensajes bicistrónicos también incluyen dos transcritos del mismo gen, por ejemplo, PAL-PAL, LAAD-LAAD, PheP-PheP y/o FNRSY24S-FNRSY24S. En esta invención se describen ejemplos no limitantes de mensajes bicistrónicos e incluyen Para-FNRS24Y-LAAD, por ejemplo, según lo comprendido en la SEQ ID NO: 73.

En una realización, uno o más promotores inducibles por arabinosa impulsan la expresión de mensajes tricistrónicos. Los mensajes tricistrónicos inducidos por arabinosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. Dichos mensajes tricistrónicos pueden incluir, por ejemplo (1) la transcripción de tres mensajes del mismo gen; (2) un mensaje de un primer gen y dos mensajes de un segundo gen; o (3) la transcripción de tres mensajes de tres genes diferentes. Cualquier combinación de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o PheP puede estar contenida en un

mensaje tricistrónico. En esta invención se describen ejemplos no limitantes de mensajes tricistrónicos e incluyen PAL-PAL-PheP, por ejemplo, según lo comprendido en la SEQ ID NO: 95 (en negrita).

- 5 En una realización, uno o más promotores inducibles por arabinosa impulsan la expresión de mensajes multicistrónicos. Los mensajes multicistrónicos inducidos por arabinosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. Dichos mensajes multicistrónicos pueden incluir, por ejemplo (dispuestos en perlas de tipo
- 10 ADN en una cadena), (1) la transcripción de varios mensajes de uno y el mismo gen; (2) uno o más mensajes de un primer gen, y uno o más mensajes de un segundo gen; o (3) la transcripción de uno o más mensajes de uno o más genes diferentes. Cualquier combinación de una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y, puede estar
- 15 contenida en un mensaje multicistrónico.

En algunos casos, el promotor inducible por arabinosa es útil para o se induce durante la expresión *in vivo* de la una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por

20 ejemplo, FNRS24Y. En algunos casos, la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por arabinosa *in vivo*. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se administra conjuntamente con las bacterias

25 manipuladas genéticamente de la divulgación, por ejemplo, arabinosa

En algunos casos, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o

30 más promotores inducibles por arabinosa durante el crecimiento, la preparación o la fabricación *in vitro* de la cepa antes de la administración *in vivo*. En algunos casos, el uno o más promotores inducibles por arabinosa se inducen en cultivo, por ejemplo, cultivados en un matraz, un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se añade al cultivo

35 bacteriano para inducir la expresión y precargar la bacteria con la carga útil antes de la administración, por ejemplo, arabinosa. En algunos casos, los cultivos, que se inducen por arabinosa, se hacen crecer de forma aerobia. En algunos casos, los cultivos, que se inducen por arabinosa, se hacen crecer de forma anaerobia.

40 En un caso, el promotor inducible por arabinosa impulsa la expresión de una construcción que comprende una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, junto con un segundo promotor, por ejemplo, un segundo promotor constitutivo o inducible. En algunos casos, dos promotores se posicionan proximalmente a la

45 construcción e impulsan su expresión, donde el promotor inducible por arabinosa impulsa la expresión en un primer conjunto de condiciones exógenas, y el segundo promotor impulsa la expresión en un segundo conjunto de condiciones exógenas. En un ejemplo no limitante, la primera y segunda condiciones pueden ser dos condiciones de cultivo secuenciales (es decir, durante la preparación del cultivo en un matraz, fermentador u otro recipiente de

50 cultivo apropiado, por ejemplo, arabinosa e IPTG). En otro ejemplo no limitante, las primeras condiciones de inducción pueden ser condiciones de cultivo, por ejemplo, incluyendo la presencia de arabinosa, y las segundas condiciones de inducción pueden ser condiciones *in vivo*. Dichas condiciones *in vivo* incluyen condiciones de bajo contenido de oxígeno,

microaerobias o anaerobias, la presencia de metabolitos intestinales, y/o metabolitos administrados en combinación con la cepa bacteriana. En algunos casos, el uno o más promotores de arabinosa impulsan la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, en combinación con el promotor FNR que impulsa la expresión de la una o más secuencias génicas.

En algunos casos, el promotor inducible por arabinosa impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias o un plásmido de un sistema de bioseguridad descritos en esta invención. En algunos casos, el promotor inducible por arabinosa impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano. En esta invención se describen sitios de inserción de ejemplo.

En algunos casos, una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se insertan en el operón de arabinosa y se impulsan por el promotor nativo inducible por arabinosa. En algunos casos, FNRS24Y se inserta en el operón de arabinosa y se impulsan por el promotor nativo inducible por arabinosa. En algunos casos, FNRS24Y-LAAD se inserta en el operón de arabinosa y se impulsa por el promotor nativo inducible por arabinosa.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 67. En algunas realizaciones, la construcción inducible por arabinosa comprende además un gen que codifica AraC, que se transcribe de forma divergente a partir del mismo promotor como la una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 66. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican un polipéptido que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con el polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 66.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que son inducibles a través de un sistema inducible por ramnosa. Los genes rhaBAD están organizados en un operón que está controlado por el promotor rhaP BAD. El promotor rhaP BAD está regulado por dos activadores, RhaS y RhaR, y los genes correspondientes pertenecen a una unidad de transcripción que se transcribe de forma divergente en la dirección opuesta a rhaBAD. En presencia de L-ramnosa, RhaR se une al promotor rhaP RS y activa la producción de RhaR y RhaS. A continuación, RhaS junto con L-ramnosa se unen al promotor rhaP BAD y rhaP T y activan la transcripción de los genes estructurales. A diferencia del sistema de arabinosa, en el que se proporciona AraC y se transcribe de forma divergente en la una o más secuencias génicas, no es necesario expresar las proteínas reguladoras en cantidades mayores en el sistema de expresión de

ramnosa porque las cantidades expresadas desde el cromosoma son suficientes para activar la transcripción incluso en plásmidos de múltiples copias. Por lo tanto, sólo el promotor rhaP BAD se clona cadena arriba del gen que se va a expresar. La inducción completa de la transcripción de rhaBAD también requiere la unión del complejo CRP-cAMP, que es un regulador clave de la represión catabólica. Como alternativa, la expresión inducible a partir del rhaBAD se puede controlar o ajustar con precisión a través de la optimización del sitio de unión al ribosoma (RBS), como se describe en esta invención. En la **figura 62B** se representa una construcción de ejemplo (construcción para la expresión de PAL bajo el control de un promotor inducible por ramnosa).

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por ramnosa. En un caso, la expresión de PAL se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por ramnosa. En una realización, la expresión de PheP se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por ramnosa. En una realización, la expresión de LAAD se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por ramnosa. En una realización, la expresión de FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por ramnosa. En un ejemplo no limitante, la expresión de PAL se impulsa por una construcción que comprende PAL inducible por ramnosa, por ejemplo, según lo comprendido en la SEQ ID NO: 106.

En otra realización, uno o más promotores inducibles por ramnosa impulsan la expresión de uno o más mensajes bicistrónicos. Los mensajes bicistrónicos inducidos por ramnosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa.

En una realización, uno o más promotores inducibles por ramnosa impulsan la expresión de mensajes tricistrónicos. Los mensajes tricistrónicos inducidos por ramnosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. Los mensajes tricistrónicos inducidos por ramnosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa.

En una realización, uno o más promotores inducibles por ramnosa impulsan la expresión de mensajes multicistrónicos. Los mensajes multicistrónicos inducidos por ramnosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y. Los mensajes multicistrónicos inducidos por ramnosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa.

En algunos casos, el promotor inducible por ramnosa es útil para o se induce durante la expresión *in vivo* de la una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y. En algunos casos, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por ramnosa *in vivo*. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o

indirectamente por una molécula que se administra conjuntamente con las bacterias manipuladas genéticamente de la invención, por ejemplo, ramnosa

En algunos casos, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por ramnosa durante el crecimiento, la preparación o la fabricación *in vitro* de la cepa antes de la administración *in vivo*. En algunos casos, el uno o más promotores inducibles por ramnosa se inducen en cultivo, por ejemplo, cultivados en un matraz, un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se añade al cultivo bacteriano para inducir la expresión y precargar la bacteria con la carga útil antes de la administración, por ejemplo, ramnosa. En algunos casos, los cultivos, que se inducen por ramnosa, se hacen crecer de forma aerobia. En algunos casos, los cultivos, que se inducen por ramnosa, se hacen crecer de forma anaerobia.

En un caso, el promotor inducible por ramnosa impulsa la expresión de una construcción que comprende una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y, junto con un segundo promotor, por ejemplo, un segundo promotor constitutivo o inducible. En algunos casos, dos promotores se posicionan proximalmente a la construcción e impulsan su expresión, donde el promotor inducible por ramnosa impulsa la expresión en un primer conjunto de condiciones exógenas, y el segundo promotor impulsa la expresión en un segundo conjunto de condiciones exógenas. En un ejemplo no limitante, la primera y segunda condiciones pueden ser dos condiciones de cultivo secuenciales (es decir, durante la preparación del cultivo en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado, por ejemplo, ramnosa y arabinosa). En otro ejemplo no limitante, las primeras condiciones de inducción pueden ser condiciones de cultivo, por ejemplo, incluyendo la presencia de ramnosa, y las segundas condiciones de inducción pueden ser condiciones *in vivo*. Dichas condiciones *in vivo* incluyen condiciones de bajo contenido de oxígeno, microaerobias o anaerobias, la presencia de metabolitos intestinales, y/o metabolitos administrados en combinación con la cepa bacteriana. En algunos casos, el uno o más promotores de ramnosa impulsan la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, en combinación con el promotor FNR que impulsa la expresión de la una o más secuencias génicas.

En algunos casos, el promotor inducible por ramnosa impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias o un plásmido de un sistema de bioseguridad descritos en esta invención. En algunos casos, el promotor inducible por ramnosa impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano. En esta invención se describen sitios de inserción de ejemplo.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 107.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más

secuencias génicas que son inducibles a través de un sistema inducible por isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) u otro compuesto que induce la transcripción del promotor Lac. IPTG es un mimético molecular de la alolactosa, un metabolito de la lactosa que activa la transcripción del operón lac. A diferencia de la alolactosa, el átomo de azufre en IPTG crea una unión química no hidrolizable, que evita la degradación de IPTG, lo que permite que la concentración permanezca constante. IPTG se une al represor lac y libera el represor tetramérico (lacI) del operador lac de manera alostérica, lo que permite la transcripción de genes en el operón lac. Dado que IPTG no se metaboliza por *E. coli*, su concentración permanece constante y la tasa de expresión controlada por el promotor Lac está estrictamente controlada, tanto *in vivo* como *in vitro*. La captación de IPTG es independiente de la acción de la lactosa permeasa, ya que también intervienen otras vías de transporte. La expresión inducible de PLac puede controlarse o ajustarse con precisión mediante la optimización del sitio de unión al ribosoma (RBS), como se describe en esta invención. Se pueden usar otros compuestos que inactivan LacI en lugar de IPTG de manera similar.

En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por IPTG. En una realización, la expresión de PAL se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por IPTG. En una realización, la expresión de PheP se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por IPTG. En una realización, la expresión de LAAD se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por IPTG. En una realización, la expresión de FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por IPTG. Los ejemplos no limitantes de una construcción que comprende PAL bajo el control de un promotor inducible por IPTG, por ejemplo, según lo comprendido en la SEQ ID NO: 74 (véase, por ejemplo, la **figura 60**).

En otra realización, uno o más promotores inducibles por IPTG impulsan la expresión de uno o más mensajes bicistrónicos. Los mensajes bicistrónicos inducidos por IPTG pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa. En una realización, uno o más promotores inducibles por IPTG impulsan la expresión de mensajes tricistrónicos. Los mensajes tricistrónicos inducidos por IPTG pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa. En una realización, uno o más promotores inducibles por IPTG impulsan la expresión de mensajes multicistrónicos. Los mensajes multicistrónicos inducidos por IPTG pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa.

En algunas realizaciones, el promotor inducible por IPTG es útil para o se induce durante la expresión *in vivo* de la una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. En algunas realizaciones, la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por IPTG *in vivo*. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se administra conjuntamente con las bacterias manipuladas genéticamente de la invención, por ejemplo, IPTG.

En algunas realizaciones, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por IPTG durante el crecimiento, la preparación o la fabricación *in vitro* de la cepa antes de la administración *in vivo*. En algunas realizaciones, el uno o más promotores inducibles por IPTG se inducen en cultivo, por ejemplo, cultivados en un matraz, un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se añade al cultivo bacteriano para inducir la expresión y precargar la bacteria con la carga útil antes de la administración, por ejemplo, IPTG. En algunas realizaciones, los cultivos, que se inducen por IPTG, se cultivan de forma aerobia. En algunas realizaciones, los cultivos, que se inducen por IPTG, se cultivan de forma anaerobia.

En un caso, el promotor inducible por IPTG impulsa la expresión de una construcción que comprende una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, junto con un segundo promotor, por ejemplo, un segundo promotor constitutivo o inducible. En algunos casos, dos promotores se posicionan proximalmente a la construcción e impulsan su expresión, donde el promotor inducible por IPTG impulsa la expresión en un primer conjunto de condiciones exógenas, y el segundo promotor impulsa la expresión en un segundo conjunto de condiciones exógenas. En un ejemplo no limitante, la primera y segunda condiciones pueden ser dos condiciones de cultivo secuenciales (es decir, durante la preparación del cultivo en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado, por ejemplo, arabinosa e IPTG). En otro ejemplo no limitante, las primeras condiciones de inducción pueden ser condiciones de cultivo, por ejemplo, incluyendo la presencia de IPTG, y las segundas condiciones de inducción pueden ser condiciones *in vivo*. Dichas condiciones *in vivo* incluyen condiciones de bajo contenido de oxígeno, microaerobias o anaerobias, la presencia de metabolitos intestinales, y/o metabolitos administrados en combinación con la cepa bacteriana. En algunos casos, el uno o más promotores inducibles por IPTG impulsan la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, en combinación con el promotor FNR que impulsa la expresión de la una o más secuencias génicas.

En algunas realizaciones, el promotor inducible por IPTG impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias o un plásmido de un sistema de bioseguridad descritos en esta invención. En algunas realizaciones, el promotor inducible por IPTG impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano. En esta invención se describen sitios de inserción de ejemplo.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO:76. En algunas realizaciones, la construcción inducible por IPTG comprende además un gen que codifica laclI, que se transcribe de forma divergente a partir del mismo promotor como la una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al

menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 75. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican un polipéptido que

5 tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con el polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 75.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más

10 secuencias génicas que son inducibles a través de un sistema inducible por tetraciclina. El sistema inicial desarrollado por Gossen y Bujard (Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Gossen M & Bujard H. PNAS, 15 de junio de 1992;89(12):5547-51) se conoce como tetraciclina off: en presencia de tetraciclina, se reduce la expresión de un promotor inducible por tet. El transactivador controlado por

15 tetraciclina (tTA) se creó fusionando tetR con el dominio del extremo C de VP16 (proteína 16 del virión) del virus del herpes simple. En ausencia de tetraciclina, la porción tetR del tTA se unirá a las secuencias tetO en el promotor tet, y el dominio de activación promueve la expresión. En presencia de tetraciclina, la tetraciclina se une a tetR, impidiendo que tTA se una a las secuencias tetO. A continuación, se desarrolló un represor Tet inverso (rTetR),

20 que creó una confianza en presencia de tetraciclina para la inducción, en lugar de represión. El nuevo transactivador rTA (transactivador controlado por tetraciclina inverso) se creó fusionando rTetR con VP16. La tetraciclina en el sistema también se conoce como sistema dependiente de rTA.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por tetraciclina. En un caso, la expresión de PAL se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por tetraciclina. En una realización, la expresión de

30 PheP se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por tetraciclina. En una realización, la expresión de LAAD se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por tetraciclina. En una realización, la expresión de FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por un promotor inducible por tetraciclina.

En otra realización, uno o más promotores inducibles por tetraciclina impulsan la expresión de uno o más mensajes bicistrónicos. Los mensajes bicistrónicos inducidos por tetraciclina pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por

40 arabinosa. En una realización, uno o más promotores inducibles por tetraciclina impulsan la expresión de mensajes tricistrónicos. Los mensajes tricistrónicos inducidos por tetraciclina pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por

45 arabinosa. En una realización, uno o más promotores inducibles por tetraciclina impulsan la expresión de mensajes multicistrónicos. Los mensajes multicistrónicos inducidos por tetraciclina pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción

50 por arabinosa.

En algunos casos, el promotor inducible por tetraciclina es útil para o se induce durante la expresión *in vivo* de la una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más

transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. En algunos casos, la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por tetraciclina *in vivo*. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se administra conjuntamente con las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación, por ejemplo, tetraciclina

En algunos casos, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores inducibles por tetraciclina durante el crecimiento, la preparación o la fabricación *in vitro* de la cepa antes de la administración *in vivo*. En algunos casos, el uno o más promotores inducibles por tetraciclina se inducen en cultivo, por ejemplo, cultivados en un matraz, un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado. En algunos casos, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se añade al cultivo bacteriano para inducir la expresión y precargar la bacteria con la carga útil antes de la administración, por ejemplo, tetraciclina. En algunos casos, los cultivos, que se inducen por tetraciclina, se cultivan de forma aerobia. En algunos casos, los cultivos, que se inducen por tetraciclina, se cultivan de forma anaerobia.

En un caso, el promotor inducible por tetraciclina impulsa la expresión de una construcción que comprende una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, junto con un segundo promotor, por ejemplo, un segundo promotor constitutivo o inducible. En algunos casos, dos promotores se posicionan proximalmente a la construcción e impulsan su expresión, donde el promotor inducible por tetraciclina impulsa la expresión en un primer conjunto de condiciones exógenas, y el segundo promotor impulsa la expresión en un segundo conjunto de condiciones exógenas. En un ejemplo no limitante, la primera y segunda condiciones pueden ser dos condiciones de cultivo secuenciales (es decir, durante la preparación del cultivo en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado, por ejemplo, tetraciclina e IPTG). En otro ejemplo no limitante, las primeras condiciones de inducción pueden ser condiciones de cultivo, por ejemplo, incluyendo la presencia de tetraciclina, y las segundas condiciones de inducción pueden ser condiciones *in vivo*. Dichas condiciones *in vivo* incluyen condiciones de bajo contenido de oxígeno, microaerobias o anaerobias, la presencia de metabolitos intestinales, y/o metabolitos administrados en combinación con la cepa bacteriana. En algunos casos, el uno o más promotores de tetraciclina impulsan la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, en combinación con el promotor FNR que impulsa la expresión de la una o más secuencias génicas.

En algunos casos, el promotor inducible por tetraciclina impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias o un plásmido de un sistema de bioseguridad descritos en esta invención. En algunos casos, el promotor inducible por tetraciclina impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano. En esta invención se describen sitios de inserción de ejemplo.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más

secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias en **negrita** de SEQ ID NO: 39 (el promotor tet está en **negrita**). En algunos casos, la construcción inducible por tetraciclina comprende además un gen que codifica AraC, que se transcribe de forma divergente a partir del mismo promotor como la una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 39 en *cursiva* (el represor tet está en *cursiva*). En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican un polipéptido que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con el polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 39 en *cursiva* (el represor tet está en *cursiva*).

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas cuya expresión se controla por un mecanismo sensible a la temperatura. Los termorreguladores son ventajosos debido a un fuerte control transcripcional sin el uso de productos químicos externos o medios especializados (véase, por ejemplo, Nemani et al., Magnetic nanoparticle hyperthermia induced cytosine deaminase expression in microencapsulated E. coli for enzyme-prodrug therapy; J Biotechnol. 10 de junio de 2015; 203: 32-40, y las referencias en el mismo). La expresión de proteínas termorregulada usando el represor cl857 mutante y los promotores del fago λ pL y/o pR se han usado para manipular cepas bacterianas recombinantes. A continuación, el gen de interés clonado cadena abajo de los promotores λ puede regularse de forma eficaz mediante el represor mutante termolábil cl857 del bacteriófago λ . A temperaturas por debajo de 37 °C, cl857 se une a las regiones oL u oR del promotor pR y bloquea la transcripción por la ARN polimerasa. A temperaturas más altas, el dímero cl857 funcional se desestabiliza, se anula la unión a las secuencias de ADN de oL u oR y se inicia la transcripción del ARNm. En la **figura 62A** se representa una construcción de ejemplo. La expresión inducible de ParaBad puede controlarse o ajustarse con precisión adicionalmente mediante la optimización del sitio de unión al ribosoma (RBS), como se describe en esta invención.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados. En una realización, la expresión de PAL se impulsa directa o indirectamente por un promotor termorregulado. En una realización, la expresión de PheP se impulsa directa o indirectamente por un promotor termorregulado. En una realización, la expresión de LAAD se impulsa directa o indirectamente por un promotor termorregulado. En una realización, la expresión de FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por un promotor termorregulado. Los ejemplos no limitantes de una construcción en la que la expresión de PAL se induce a 37 °C y 42 °C y no se induce a temperaturas inferiores, están comprendidos en la SEQ ID NO: 101 (véase, por ejemplo, la **figura 60** y la **figura 62A**).

En otra realización, uno o más promotores termorregulados impulsan la expresión de uno o más mensajes bicistrónicos. Los mensajes bicistrónicos inducidos por temperatura, por ejemplo, 37 °C y/o 42 °C, pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente.

para la inducción por arabinosa. En una realización, uno o más promotores termorregulados impulsan la expresión de mensajes tricistrónicos. Los mensajes tricistrónicos inducidos por temperatura, por ejemplo, 37 °C y/o 42 °C, pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa. En una realización, uno o más promotores termorregulados impulsan la expresión de mensajes multicistrónicos. Los mensajes multicistrónicos inducidos por termorregulación pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa.

En algunos casos, el promotor termorregulado es útil para o se induce durante la expresión *in vivo* de la una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. En algunos casos, la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados *in vivo*. En algunas realizaciones, el promotor se induce directa o indirectamente por una molécula que se administra conjuntamente con las bacterias manipuladas genéticamente de la invención, por ejemplo, la temperatura.

En algunos casos, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados durante el crecimiento, la preparación o la fabricación *in vitro* de la cepa antes de la administración *in vivo*. En algunos casos, puede ser ventajoso desactivar la producción de la una o más PME y/o PheP. Esto se puede hacer en un sistema termorregulado cultivando la cepa a temperaturas más bajas, por ejemplo, 30 C. A continuación, la expresión se puede inducir elevando la temperatura a 37 C y/o 42 C. En algunas realizaciones, el uno o más promotores termorregulados se inducen en cultivo, por ejemplo, cultivados en un matraz, un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado. En algunas realizaciones, los cultivos, que se inducen por temperaturas entre 37 C y 42 C, se cultivan de forma aerobia. En algunas realizaciones, los cultivos, que se inducen por temperaturas entre 37 °C y 42 °C, se cultivan de forma anaerobia.

En un caso, el promotor termorregulado impulsa la expresión de una construcción que comprende una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, junto con un segundo promotor, por ejemplo, un segundo promotor constitutivo o inducible. En algunos casos, dos promotores se posicionan proximalmente a la construcción e impulsan su expresión, donde el promotor termorregulado impulsa la expresión en un primer conjunto de condiciones exógenas, y el segundo promotor impulsa la expresión en un segundo conjunto de condiciones exógenas. En un ejemplo no limitante, la primera y segunda condiciones pueden ser dos condiciones de cultivo secuenciales (es decir, durante la preparación del cultivo en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado, por ejemplo, termorregulación y arabinosa). En otro ejemplo no limitante, las primeras condiciones de inducción pueden ser condiciones de cultivo, por ejemplo, temperatura permisiva, y las segundas condiciones de inducción pueden ser condiciones *in vivo*. Dichas condiciones *in vivo* incluyen condiciones de bajo contenido de oxígeno, microaerobias o anaerobias, la presencia de metabolitos intestinales, y/o metabolitos administrados en combinación con la cepa bacteriana. En algunos casos, el uno o más promotores termorregulados impulsan la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o

uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, en combinación con el promotor FNR que impulsa la expresión de la una o más secuencias génicas.

- 5 En algunos casos, el promotor termorregulado impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias o un plásmido de un sistema de bioseguridad descritos en esta invención. En algunos casos, el promotor termorregulado
- 10 impulsa la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano. En esta invención se describen sitios de inserción de ejemplo.
- 15 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 103. En algunas realizaciones, la construcción termorregulada comprende además un gen que codifica un represor cl857
- 20 mutante, que se transcribe de forma divergente a partir del mismo promotor como la una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores, por ejemplo, FNRS24Y. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 102. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican un polipéptido que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con el polipéptido
- 30 codificado por cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 102.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que son inducible indirectamente a través de un sistema impulsado por el promotor PssB. El promotor Pssb está activo en condiciones aerobias, y se desactiva en

35 condiciones anaerobias.

Este promotor se puede usar para expresar un gen de interés en condiciones aerobias. Este promotor también se puede usar para controlar estrechamente la expresión de un producto génico de tal forma que solo se exprese en condiciones anaerobias. En este caso, el

40 promotor PssB inducido por oxígeno induce la expresión de un represor, que reprime la expresión de un gen de interés. Como resultado, el gen de interés solo se expresa en ausencia del represor, es decir, en condiciones anaerobias. Esta estrategia tiene la ventaja de un nivel adicional de control para un ajuste preciso mejorado y un control más estricto. La **figura 63A** representa un esquema de la organización génica de un promotor PssB.

45 En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se regula indirectamente por un represor expresado bajo el control de uno o más promotores PssB. En una realización, la expresión de PAL se regula

50 indirectamente por un represor expresado bajo el control de uno o más promotores PssB. En una realización, la expresión de PheP se regula indirectamente por un represor expresado bajo el control de uno o más promotores PssB. En una realización, la expresión de LAAD se regula indirectamente por un represor expresado bajo el control de uno o más

promotores PssB. En una realización, la expresión de FNRS24Y, se regula indirectamente por un represor expresado bajo el control de uno o más promotores PssB.

En otra realización, la inducción del uno o más promotores RssB impulsa la expresión de uno o más mensajes bicistrónicos. Los mensajes bicistrónicos inducidos pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa. En otra realización, la inducción del uno o más promotores RssB impulsa la expresión de uno o más mensajes tricistrónicos. Los mensajes tricistrónicos inducidos pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa. En una realización, la inducción del uno o más promotores RssB impulsa indirectamente la expresión de uno o más mensajes multicistrónicos. Los mensajes multicistrónicos inducidos por arabinosa pueden incluir una o más PME, por ejemplo, PAL o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, y son los mismos que los descritos anteriormente para la inducción por arabinosa.

En algunos casos, la inducción del uno o más promotores RssB impulsa indirectamente la expresión *in vivo* de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y. En algunos casos, la inducción del uno o más promotores RssB impulsa indirectamente la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y durante el crecimiento, la preparación o la fabricación *in vitro* de la cepa antes de la administración *in vivo*. En algunas realizaciones, las condiciones para la inducción del uno o más promotores RssB se proporcionan en cultivo, por ejemplo, en un matraz, un fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado.

En algunos casos, el promotor PssB impulsa indirectamente la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias o un plásmido de un sistema de bioseguridad descritos en esta invención. En algunos casos, el promotor PssB impulsa indirectamente la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano. En esta invención se describen sitios de inserción de ejemplo.

En otro ejemplo no limitante, esta estrategia puede usarse para controlar la expresión de thyA y/o dapA, por ejemplo, para hacer un auxótrofo condicional. La copia cromosómica de dapA o ThyA se desactiva. En condiciones anaerobias, se expresan dapA o thyA, según sea el caso, y la cepa puede crecer en ausencia de dap o timidina. En condiciones aerobias, la expresión de dapA o thyA se desactiva y la cepa no puede crecer en ausencia de dap o timidina. Tal estrategia puede emplearse, por ejemplo, para permitir la supervivencia de bacterias en condiciones anaerobias, por ejemplo, el intestino, pero evitar la supervivencia en condiciones aerobias (interruptor de bioseguridad). En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que tienen al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 117.

Además de los promotores que se inducen en respuesta a los niveles de oxígeno, el uno o más genes PME y/o el uno o más genes transportadores de Phe pueden regularse mediante promotores que se inducen en respuesta a condiciones inflamatorias, tales como en presencia de especies reactivas de nitrógeno o en presencia de especies reactivas de oxígeno. Se encuentran ejemplos de dichos promotores inducibles se encuentran en la solicitud internacional en trámite junto con la presente y de propiedad compartida, PCT/LTS2016/050836, presentada el 08/09/2016.

Inducción de una o más PME y/o transportadores de Phe durante el cultivo de cepas

En algunas realizaciones, es deseable preinducir la expresión de PME y la actividad de PME antes de la administración a un sujeto. Es decir, en algunas realizaciones, es deseable preinducir la expresión de PME y la actividad de PME en cultivo antes de su activación *in vivo*. En dichas situaciones, las cepas están precargadas con PME activa (PAL3 y/o LAAD) y/o un transportador de Phe, por ejemplo, PheP. En tales casos, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención expresan una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, en las condiciones proporcionadas en el cultivo bacteriano durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular antes de la administración *in vivo*. Dichas condiciones de cultivo se pueden proporcionar en un matraz, fermentador u otro recipiente de cultivo apropiado, por ejemplo, usado durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. Como se usa en esta invención, el término "cultivo bacteriano" o "cultivo de células bacterianas" o "cultivo" se refiere a células bacterianas o microorganismos, que se mantienen o se cultivan *in vitro* durante varios procesos de producción, incluido el crecimiento celular, la expansión, la recuperación, la purificación, la fermentación y/o la fabricación celular. Como se usa en esta invención, el término "fermentación" se refiere al crecimiento, expansión y mantenimiento de bacterias en condiciones definidas. La fermentación puede tener lugar en una serie de condiciones de cultivo celular, incluidas condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno u oxigenadas, en presencia de inductores, nutrientes, a temperaturas definidas y similares.

Las condiciones de cultivo se seleccionan para lograr un alto rendimiento y una alta viabilidad de las células bacterianas, manteniendo al mismo tiempo una actividad óptima de las células. Se controlan y se ajustan varios parámetros de cultivo celular para lograr una actividad óptima, un alto rendimiento y una alta viabilidad, incluidos los niveles de oxígeno (por ejemplo, bajo contenido de oxígeno, microaerobio, aerobio), la temperatura del medio y los nutrientes, inductores químicos y otros componentes proporcionados en el medio. En algunas realizaciones, se añade fenilalanina a los medios, por ejemplo, para reforzar la salud celular. Sin desear limitarse a la teoría, la adición de fenilalanina al medio puede evitar que las bacterias catabolicen la fenilalanina producida endógenamente necesaria para el crecimiento celular.

En algunas realizaciones, la una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe se inducen directa o indirectamente, mientras que las cepas se cultivan para la administración *in vivo*. Sin desear limitarse a la teoría, la preinducción puede reforzar la actividad *in vivo*. Esto es particularmente importante en las regiones proximales del intestino a las que llegan primero las bacterias, por ejemplo, el intestino delgado. Si el tiempo de residencia de las bacterias en este compartimento es relativamente corto, las bacterias pueden atravesar el intestino delgado sin alcanzar la capacidad de inducción total *in vivo*. Por el contrario, si una cepa se preinduce y se precarga, las cepas ya están completamente activas, lo que permite una mayor actividad más rápidamente a medida que las bacterias llegan al intestino. Ergo, no se "desperdicia" tiempo de tránsito, en el que la cepa no está óptimamente activa. A medida que las bacterias continúan desplazándose por el intestino, la inducción *in vivo* se

produce en las condiciones ambientales del intestino (por ejemplo, bajo contenido de oxígeno o en presencia de metabolitos intestinales).

5 En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular.

25 En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistrónico. En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados. En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales se impulsa desde el uno o más promotores diferentes.

35 En algunas realizaciones, las cepas se administran sin ningún protocolo de preinducción durante el crecimiento de la cepa antes de la administración *in vivo*.

Inducción anaerobia

40 En algunos casos, las células se inducen en condiciones anaerobias o con bajo contenido de oxígeno en cultivo. En tales casos, las células se cultivan (por ejemplo, durante 1,5 a 3 horas) hasta que alcanzan una determinada DO, por ejemplo, DO dentro del intervalo de 0,1 a 10, lo que indica una determinada densidad, por ejemplo, que varía de 1×10^8 a 1×10^{11} , y un crecimiento exponencial y, a continuación, se cambian a condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno durante aproximadamente 3 a 5 horas. En algunos casos, las cepas se inducen en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, para inducir la actividad del promotor FNR e impulsar la expresión de una o más PME y/o transportadores de Phe bajo el control de uno o más promotores FNR.

50 En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce

- durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno.
- En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistrónico en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno.
- Sin desear limitarse a la teoría, las cepas que comprenden una o más PME y/o uno o más transportadores de PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR, pueden permitir la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales de estos promotores *in vitro*, en condiciones de cultivo anaerobio o de bajo contenido de oxígeno, e *in vivo*, en las condiciones de bajo contenido de oxígeno que se encuentran en el intestino.
- En algunas realizaciones, los promotores inducibles por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales se pueden inducir en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno en presencia del inductor químico y/o nutricional.

En particular, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de promotores FNR y otros que están bajo el control de promotores inducidos por inductores químicos y/o nutricionales. En algunas realizaciones, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores FNR, y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores constitutivos descritos en esta invención. En algunas realizaciones, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores termorregulados descritos en esta invención.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la

expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es arabinosa y el promotor es inducible por arabinosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es IPTG y el promotor es inducible por IPTG. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es ramnosa y el promotor es inducible por ramnosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es tetraciclina y el promotor es inducible por tetraciclina.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistónico en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno.

En una realización, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales, en condiciones anaerobias o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales. En algunas realizaciones, las cepas comprenden una o más secuencias génicas bajo el control de un tercer promotor inducible, por ejemplo, un promotor anaerobio/de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, un promotor FNR. En una realización, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor inducido químicamente o un promotor de bajo contenido de oxígeno y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En una realización, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor FNR y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En una realización, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, uno inducido químicamente y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias

génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. Además, las cepas pueden comprender una construcción que está bajo control termorregulador. En algunos casos, las cepas bacterianas comprenden además PME y/o una o más secuencias del transportador de Phe bajo el control de uno o más promotores constitutivos activos en condiciones de bajo contenido de oxígeno.

10 Inducción aerobia

En algunas realizaciones, es deseable preparar, precargar y preinducir las cepas en condiciones aerobias. Esto permite un crecimiento y una viabilidad más eficientes y, en algunos casos, reduce la acumulación de metabolitos tóxicos. En tales casos, las células se cultivan (por ejemplo, durante 1,5 a 3 horas) hasta que alcanzan una determinada DO, por ejemplo, DO dentro del intervalo de 0,1 a 10, lo que indica una determinada densidad, por ejemplo, que varía de 1×10^8 a 1×10^{11} , y un crecimiento exponencial y, a continuación, se inducen mediante la adición del inductor o por otros medios, tales como el cambio a una temperatura permisiva, durante aproximadamente 3 a 5 horas.

En algunas realizaciones, los promotores inducibles por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica se pueden inducir en condiciones aerobias en presencia del inductor químico y/o nutricional durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la

recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistónico en condiciones aerobias. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados en condiciones aerobias. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes en condiciones aerobias.

En una realización, el inductor químico y/o nutricional es arabinosa y el promotor es inducible por arabinosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es IPTG y el promotor es inducible por IPTG. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es ramnosa y el promotor es inducible por ramnosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es tetraciclina y el promotor es inducible por tetraciclina.

En algunas realizaciones, se inducen promotores regulados por la temperatura durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular. En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la

- expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones aerobias.
- En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistrónico en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados en condiciones aerobias. En una realización, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales se impulsa directa o indirectamente por uno o más promotores termorregulados y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes en condiciones aerobias.
- En una realización, las capas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos en condiciones aerobias. En algunas realizaciones, una cepa comprende tres o más promotores diferentes que se inducen en condiciones de cultivo aerobias.
- En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor químicamente inducible, y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, dos o más secuencias génicas de promotores inducidos químicamente se combinan con una construcción termorregulada descrita en esta invención. En un caso, el inductor químico y/o nutricional es arabinosa y el promotor es inducible por arabinosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es IPTG y el promotor es inducible por IPTG. En un caso, el inductor químico y/o nutricional es ramnosa y el promotor es inducible por ramnosa. En un caso, el inductor químico y/o nutricional es tetraciclina y el promotor es inducible por tetraciclina.
- En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor FNR y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, uno inducido químicamente y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En algunos casos, las cepas pueden

comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. Además, las cepas pueden comprender una construcción que está bajo control termorregulador. En algunos casos, las cepas bacterianas comprenden además PME y/o una o más secuencias del transportador de Phe bajo el control de uno o más promotores constitutivos activos en condiciones aerobias.

En algunas realizaciones, las cepas modificadas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de PAL, LAAD y PheP que se inducen en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

En algunos casos, las cepas manipuladas genéticamente comprenden secuencias génicas de PAL, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunos casos, dichas cepas manipuladas genéticamente comprenden además secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunos casos, dichas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunos casos, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunos casos, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

En algunas realizaciones, las cepas manipuladas genéticamente comprenden secuencias génicas de PAL, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, dichas cepas manipuladas genéticamente comprenden además secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, dichas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

En algunas realizaciones, las cepas manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PAL, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

5 En algunas realizaciones, las cepas manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PAL, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas
10 realizaciones, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

15 En algunas realizaciones, las cepas manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PAL, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones,
20 estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

25 En algunas realizaciones, las cepas manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PAL, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas
30 realizaciones, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.
35

En algunas realizaciones, las cepas manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas de LAAD, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias
40 génicas de PAL, que son inducibles por arabinosa en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, tal cepa comprende además una o más secuencias génicas de PheP, que son inducibles por IPTG en condiciones de cultivo aerobias. En algunas realizaciones, estas cepas comprenden además una o más secuencias génicas de PME y/o del transportador de Phe inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino. En
45 algunas realizaciones, estas cepas no comprenden además una o más secuencias génicas inducibles por FNR para la activación *in vivo* en el intestino.

Como resulta evidente a partir de los ejemplos no limitantes anteriores, las cepas manipuladas genéticamente comprenden secuencias génicas de PME y/o del transportador
50 de Phe inducibles, que se pueden inducir en numerosas combinaciones. Por ejemplo, se puede usar ramnosa o tetraciclina como inductor con los promotores apropiados además o en lugar de arabinosa y/o IPTG o con termorregulación. Además, dichas cepas bacterianas también se pueden introducir con los inductores químicos y/o nutricionales en condiciones

anaerobias.

Inducción microaerobia

- 5 En algunas realizaciones, la viabilidad, el crecimiento y la actividad se optimizan preinduciendo la cepa bacteriana en condiciones microaerobias. En algunas realizaciones, las condiciones microaerobias son las más adecuadas para "encontrar un equilibrio" entre las condiciones óptimas de crecimiento, actividad y viabilidad y las condiciones óptimas para la inducción; en particular, si la expresión de la una o más PME y/o uno o más
- 10 transportadores de Phe se impulsa por un promotor anaerobio y/o de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, un promotor FNR. En tales casos, las células se cultivan (por ejemplo, durante 1,5 a 3 horas) hasta que alcanzan una determinada DO, por ejemplo, DO dentro del intervalo de 0,1 a 10, lo que indica una determinada densidad, por ejemplo, que varía de 1×10^8 a 1×10^{11} , y un crecimiento exponencial y, a continuación, se inducen mediante la
- 15 adición del inductor o por otros medios, tales como el cambio a una temperatura permisiva, durante aproximadamente 3 a 5 horas.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales,

20 por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la

25 recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En una realización, la expresión de una o más

30 secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la

35 recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En una realización, la expresión de una o más

40 secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la

45 fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales

50 está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistónico en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control

de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes en condiciones microaerobias.

Sin desear limitarse a la teoría, las cepas que comprenden una o más PME y/o uno o más transportadores de PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR, pueden permitir la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales de estos promotores *in vitro*, en condiciones de cultivo microaerobias, e *in vivo*, en las condiciones de bajo contenido de oxígeno que se encuentran en el intestino.

En algunas realizaciones, los promotores inducibles por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales se pueden inducir en condiciones microaerobias en presencia del inductor químico y/o nutricional. En particular, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de promotores FNR y otros que están bajo el control de promotores inducidos por inductores químicos y/o nutricionales. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores FNR, y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores constitutivos descritos en esta invención. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores termorregulados descritos en esta invención.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones

microaerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones microaerobias. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es arabinosa y el promotor es inducible por arabinosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es IPTG y el promotor es inducible por IPTG. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es ramnosa y el promotor es inducible por ramnosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es tetraciclina y el promotor es inducible por tetraciclina.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistónico en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados en condiciones microaerobias. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes en condiciones microaerobias.

En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales, en condiciones microaerobias. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales. En algunos casos, las cepas comprenden una o más secuencias génicas bajo el control de un tercer promotor inducible, por ejemplo, un promotor anaerobio/de bajo contenido de oxígeno o un promotor microaerobio, por ejemplo, un promotor FNR. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo,

un promotor inducido químicamente o un promotor de bajo contenido de oxígeno o microorganismo y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor FNR y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, uno inducido químicamente y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. Además, las cepas pueden comprender una construcción que está bajo control termorregulador. En algunos casos, las cepas bacterianas comprenden además PME y/o una o más secuencias del transportador de Phe bajo el control de uno o más promotores constitutivos activos en condiciones de bajo contenido de oxígeno.

Inducción de cepas mediante faseo, pulsaciones y/o ciclos

En algunas realizaciones, se emplean técnicas de ciclos, faseo o pulsaciones durante el crecimiento, la expansión, la recuperación, la purificación, la fermentación y/o la fabricación celular para inducir y hacer crecer eficientemente las cepas antes de la administración *in vivo*. Este procedimiento se usa para "encontrar un equilibrio" entre las condiciones óptimas de crecimiento, actividad, salud celular y viabilidad y las condiciones óptimas para la inducción; en particular, si el crecimiento, la salud celular o la viabilidad se ven afectados negativamente bajo condiciones de inducción. En tales casos, las células se cultivan (por ejemplo, durante 1,5 a 3 horas) en una primera fase o ciclo hasta que alcanzan una determinada DO, por ejemplo, DO dentro del intervalo de 0,1 a 10, lo que indica una determinada densidad, por ejemplo, que varía de 1×10^8 a 1×10^{11} y, a continuación, se inducen a través de la adición del inductor o a través de otros medios, tales como el cambio a una temperatura permisiva (si un promotor está termorregulado), o un cambio en los niveles de oxígeno (por ejemplo, la reducción del nivel de oxígeno en el caso de la inducción de una construcción impulsada por un promotor FNR) durante aproximadamente 3 a 5 horas. En una segunda fase o ciclo, las condiciones vuelven a las condiciones originales que respaldan el crecimiento, la salud celular y la viabilidad óptimas. Como alternativa, si se usa un inductor químico y/o nutricional, entonces el cultivo se puede enriquecer con una segunda dosis del inductor en la segunda fase o ciclo.

En algunas realizaciones, se emplean dos ciclos de condiciones óptimas y condiciones de inducción (es decir, crecimiento, inducción, recuperación y crecimiento, inducción). En algunos casos, se emplean tres ciclos de condiciones óptimas y condiciones de inducción. En algunos casos, se emplean cuatro o más ciclos de condiciones óptimas y condiciones de inducción. En un ejemplo no limitante, se usa tal ciclo y/o faseo para la inducción en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno (por ejemplo, inducción de promotores FNR). En un caso, las células se cultivan a la densidad óptica y a continuación se inducen en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. Antes de que el crecimiento y/o la viabilidad se vean afectados negativamente debido a las estresantes

condiciones de inducción, las células se devuelven a condiciones oxigenadas para que se recuperen, después de lo cual se vuelven a inducir condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno por segunda vez. En algunos casos, estos ciclos se repiten según sea necesario.

5

En algunos casos, los cultivos en crecimiento se enriquecen una vez con el inductor químico y/o nutricional. En algunos casos, los cultivos en crecimiento se enriquecen dos veces con el inductor químico y/o nutricional. En algunos casos, los cultivos en crecimiento se enriquecen tres o más veces con el inductor químico y/o nutricional. En un ejemplo no limitante, las células se cultivan primero en condiciones óptimas de crecimiento hasta una determinada densidad, por ejemplo, durante 1,5 a 3 horas) para alcanzar una densidad de 0,1 a 10, hasta que las células tienen una densidad que varía de 1×10^8 a 1×10^{11} . A continuación, al cultivo se añade el inductor químico, por ejemplo, arabinosa o IPTG. Después de 3 a 5 horas, se añade una dosis adicional del inductor para reiniciar la inducción. El enriquecimiento se puede repetir según sea necesario.

10

15

En algunas realizaciones, el faseo o los ciclos cambian la temperatura en el cultivo. En otra realización, se puede usar el ajuste de la temperatura para mejorar la actividad de una PME. Por ejemplo, bajar la temperatura durante el cultivo puede mejorar el plegamiento adecuado de la PME. En tales casos, las células se cultivan en primer lugar a una temperatura óptima para el crecimiento (por ejemplo, 37 C). En algunos casos, a continuación, las células se inducen, por ejemplo, por un inductor químico, para expresar la PME. Simultáneamente o después de una cantidad establecida de tiempo de inducción, la temperatura en el medio se reduce, por ejemplo, entre 25 y 35 C, para permitir un plegado mejorado de la PME expresada, por ejemplo, PAL.

20

25

En algunos casos, la una o más PME y los transportadores de Phe están bajo el control de diferentes promotores inducibles, por ejemplo, dos inductores químicos diferentes. En otros casos, la PME se induce en condiciones de bajo contenido de oxígeno o condiciones microaerobias y el transportador de Phe se induce por un inductor químico. En otros casos, el transportador de Phe se induce en condiciones de bajo contenido de oxígeno o microaerobias y la PME se induce por un inductor químico, por ejemplo, arabinosa o IPTG. Para obtener resultados óptimos, es deseable inducir primero el transportador de Phe o al mismo tiempo que la PME. En algunos casos, esto puede permitir una captación más eficiente de Phe y, como resultado, se mantiene el crecimiento celular continuo. En un ejemplo no limitante, la PheP puede inducirse en condiciones microaerobias durante 1 a 2 horas antes de la inducción de la PME por otro inductor, tal como arabinosa, por ejemplo, durante 3 a 5 horas más. En un ejemplo no limitante, PheP y PME, por ejemplo, PAL y LAAD se inducen simultáneamente con arabinosa. En otro ejemplo no limitante, PheP se induce de forma microaerobia, PAL se induce con IPTG y, por último, LAAD se induce con arabinosa.

30

35

40

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular usando técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la

45

50

5 fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL está bajo el control de uno o más promotores FNR y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento.

25 En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistrónico a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores FNR y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento.

40 Sin desear limitarse a la teoría, las cepas que comprenden una o más PME y/o uno o más transportadores de PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR, pueden permitir la expresión de una o más PME y/o uno o más transportadores de PheP y/o uno o más reguladores transcripcionales de estos promotores *in vitro*, en condiciones de cultivo microaerobias, e *in vivo*, en las condiciones de bajo contenido de oxígeno que se encuentran en el intestino.

45 En algunas realizaciones, los promotores inducibles por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales se pueden inducir a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento en presencia del inductor químico y/o nutricional. En particular, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de promotores FNR y otros que están bajo el control de promotores inducidos por inductores químicos y/o nutricionales. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más

promotores FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores FNR, y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores constitutivos descritos en esta invención y se inducen a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores termorregulados descritos en esta invención, y se inducen a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento.

Cualquiera de las cepas descritas en esta invención se puede cultivar a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales, por ejemplo, FNRS24Y, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y PheP está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PAL y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones

anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En un caso, la expresión de una o más secuencias génicas de PheP y LAAD y PAL, está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se induce durante el crecimiento, la expansión, la fermentación, la recuperación, la purificación, la formulación y/o la fabricación celular en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es arabinosa y el promotor es inducible por arabinosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es IPTG y el promotor es inducible por IPTG. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es ramnosa y el promotor es inducible por ramnosa. En una realización, el inductor químico y/o nutricional es tetraciclina y el promotor es inducible por tetraciclina.

En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de un mensaje multicistónico y que se inducen a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el mismo promotor en forma de dos o más mensajes separados y se cultiva a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, la expresión de una o más PME, por ejemplo, PAL y/o LAAD, y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/o uno o más reguladores transcripcionales está bajo el control de uno o más promotores regulados por inductores químicos y/o nutricionales y se impulsa desde el uno o más promotores diferentes a los que se inducen a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento.

En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales, a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, ambos inducidos por inductores químicos y/o nutricionales a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento. En algunos casos, las cepas comprenden una o más secuencias génicas bajo el control de un tercer promotor inducible, por ejemplo, un promotor anaerobio/de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, un promotor FNR. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor inducido químicamente o un promotor de bajo contenido de oxígeno y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, un promotor FNR y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En un caso, las cepas pueden comprender una combinación de una o más secuencias génicas, algunas de las cuales se usan bajo el control de un primer promotor inducible, por ejemplo, uno inducido químicamente y otros que están bajo el control de un segundo promotor inducible, por ejemplo, un promotor sensible a la temperatura. En algunos casos, las cepas pueden comprender una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el

control de un promotor FNR y una o más secuencias génicas de PME y/o una o más secuencias génicas de Phe y/o una o más secuencias génicas de reguladores transcripcionales bajo el control de uno o más promotores que se inducen por uno o más inductores químicos y/o nutricionales, incluyendo, pero sin limitación, por arabinosa, IPTG, ramnosa, tetraciclina y/o otros inductores químicos y/o nutricionales descritos en esta invención o conocidos en la técnica. Además, las cepas pueden comprender una construcción que está bajo control termorregulador. En algunos casos, las cepas bacterianas comprenden además PME y/o una o más secuencias del transportador de Phe bajo el control de uno o más promotores constitutivos activos en condiciones de bajo contenido de oxígeno. Cualquiera de las cepas descritas en estos casos puede inducirse a través del empleo de técnicas de faseo o ciclos o pulsaciones o enriquecimiento.

Inducción aerobia del promotor FNR

FNRS24Y es una forma mutada de FNR que es más resistente a la inactivación por oxígeno y, por lo tanto, puede activar promotores FNR en condiciones aerobias (véase, por ejemplo, Jervis AJ The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion, Proc Natl Acad Sci U S A. 24 de marzo de 2009;106(12):4659-64).

En algunos casos, se usa el sistema de derivación de oxígeno mostrado y descrito en la **figura 50**. En este sistema de derivación de oxígeno, FNRS24Y se induce mediante la adición de arabinosa y, a continuación, impulsa la expresión de PAL3, pheP mediante la unión y la activación del promotor FNR en condiciones aerobias. Por lo tanto, las cepas se pueden cultivar, producir o fabricar de manera eficiente en condiciones aerobias, mientras se preinducen y se precargan de manera eficaz, ya que el sistema aprovecha el fuerte promotor FNR que da como resultado altos niveles de expresión de PAL y PheP. Este sistema no interfiere ni compromete la activación *in vivo*, ya que el FNRS24Y mutado ya no se expresa en ausencia de arabinosa, y el FNR de tipo natural se une al promotor FNR e impulsa la expresión de PAL3 y PheP.

En algunos casos, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo aerobio e induce FNR-PAL. En algunas realizaciones, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo e induce FNR-pheP. En algunas realizaciones, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo e induce FNR-LAAD. En otros casos, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo e induce FNR-PAL y FNR-PheP. En otros casos, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo e induce FNR-PAL y FNR-LAAD. En otras realizaciones, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo e induce FNR-LAAD y FNR-PheP. En otros casos, FNRS24Y se expresa durante el crecimiento en cultivo e induce FNR-PAL y FNR-PheP y FNR-LAAD

En otras realizaciones descritas en esta invención, la expresión de LAAD también se puede inducir de forma aerobia, por ejemplo, por arabinosa. En un ejemplo no limitante, LAAD y FNRS24Y también se pueden inducir en algunas realizaciones simultáneamente, por ejemplo, a partir de un promotor inducible por arabinosa. En algunas realizaciones, FNRS24Y y LAAD se transcriben como un mensaje bicistrónico cuya expresión se impulsa por un promotor de arabinosa. En algunas realizaciones, FNRS24Y se inserta en el operón de arabinosa, permitiendo que se impulse la expresión del promotor Para endógeno. En algunas realizaciones, FNRS24Y-LAAD se inserta en el operón de arabinosa, permitiendo que se impulse la expresión del promotor Para endógeno.

En algunas realizaciones, en este sistema se usan un promotor LacI e inducción por IPTG (en lugar de Para e inducción por arabinosa). En algunas realizaciones, en este sistema se

usa un promotor inducible por ramnosa. En algunas realizaciones, se usa un promotor sensible a la temperatura para impulsar la expresión de FNRS24Y.

Medición de la preinducción

5

En algunos casos, dichas condiciones de cultivo, en las que se induce la expresión de la una o más PME y/o PheP, dan como resultado la reducción de fenilalanina en el cultivo en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo tipo en las mismas condiciones, o en comparación con los niveles de referencia. En algunos casos, dichas condiciones de cultivo, en las que se induce la expresión de la una o más PME y/o PheP, dan como resultado la producción de ácido transcinámico (TCA) en el cultivo en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces o al menos aproximadamente 50 veces en comparación con bacterias no modificadas del mismo tipo en las mismas condiciones, o en comparación con los niveles de referencia.

En algunos casos, la acumulación de cinamato en los cultivos bacterianos se mide mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en esta invención. La producción de cinamato está directamente relacionada con la degradación de la fenilalanina y, en algunos casos, el cinamato puede usarse como indicador de la actividad de la cepa durante el crecimiento, la producción y la fabricación de la cepa. Por lo tanto, la medición de una reducción en fenilalanina y/o la producción de TCA pueden usarse para medir y controlar y ajustar con precisión la inducción de una cepa terapéutica antes de la administración *in vivo*.

Múltiples mecanismos de acción

En algunas realizaciones, las bacterias se modifican genéticamente para incluir múltiples mecanismos de acción (MoA), por ejemplo, circuitos que producen múltiples copias del mismo producto (por ejemplo, para aumentar el número de copias) o circuitos que realizan múltiples funciones diferentes. Los ejemplos de sitios de inserción incluyen, pero sin limitación, *malE/K*, *yicS/nepl*, *insB/I*, *araC/BAD*, *lacZ*, *agal/rsml*, *thyA*, *malP/T*, *dapA* y *cea*, y otros que se muestran en la **figura 66**. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente pueden incluir cuatro copias de PAL insertadas en cuatro sitios de inserción diferentes, por ejemplo, *malE/K*, *insB/I*, *araC/BAD* y *lacZ*. Las bacterias manipuladas genéticamente también pueden incluir cuatro copias de PAL insertadas en cuatro sitios de inserción diferentes, por ejemplo, *malE/K*, *yicS/nepl*, *agal/rsml* y *cea*, y una copia de un gen transportador de fenilalanina insertado en un sitio de inserción diferente, por ejemplo, *lacZ* (**figura 13B**). Como alternativa, las bacterias manipuladas genéticamente pueden incluir tres copias de PAL insertadas en tres sitios de inserción diferentes, por ejemplo, *MalE/K*, *insB/I* y *lacZ*, y tres copias de un gen transportador de fenilalanina insertado en tres sitios de inserción diferentes, por ejemplo, *DapA*, *cea* y *araC/BAD*.

En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más secuencias génicas que codifican uno o más de (1) PAL, PAH y/o LAAD para la degradación de fenilalanina, en forma natural o mutada (para una mayor estabilidad o actividad metabólica) (2) transportador de PheP y/o AroP para captación de fenilalanina, en tipo salvaje o en forma mutada (para una mayor estabilidad o actividad metabólica) (3) PAL, PAH, LAAD y/o PheP para la secreción y degradación extracelular de fenilalanina, (4) componentes de la maquinaria de secreción, como se describe en esta invención (5) Auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA y/o deltadapA (6) resistencia a antibióticos, que incluye, pero sin limitación, resistencia a kanamicina o cloranfenicol (7) mutaciones/deleciones en genes involucrados en el metabolismo del oxígeno, como se describe en esta invención y (8) mutaciones/deleciones en genes de la vía de síntesis endógena de fenilalanina de Nissle (por ejemplo, delta PheA para la auxotrofia de Phe) (9) una o más construcciones de sistemas de bioseguridad y/o interruptores de destrucción.

En algunos casos, en condiciones en las que se expresen la una o más secuencias génicas para producir la una o más cargas útiles, por ejemplo, la una o más PME, uno o más transportadores de Phe y/o uno o más reguladores transcripcionales, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación degradan fenilalanina y generan TCA a niveles al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 300 veces, al menos aproximadamente 400 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 600 veces, al menos aproximadamente 700 veces, al menos aproximadamente 800 veces, al menos aproximadamente 900 veces, al menos aproximadamente 1.000 veces o al menos aproximadamente 1.500 veces mayores en comparación con bacterias no modificadas del mismo tipo en las mismas condiciones.

En algunos casos, en condiciones en las que se expresen la una o más secuencias génicas para producir la una o más cargas útiles, por ejemplo, la una o más PME, uno o más transportadores de Phe y/o uno o más reguladores transcripcionales, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación degradan fenilalanina y generan hipurato a niveles al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 300 veces, al menos aproximadamente 400 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 600 veces, al menos aproximadamente 700 veces, al menos aproximadamente 800 veces, al menos aproximadamente 900 veces, al menos aproximadamente 1.000 veces o al menos aproximadamente 1.500 veces mayores en comparación con bacterias no modificadas del mismo tipo en las mismas condiciones.

En algunos casos, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se expresan bajo el control de un promotor constitutivo. En otro caso, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se expresan bajo el control de un promotor inducible. En algunos casos, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se expresan bajo el control de un

promotor que se induce directa o indirectamente por condiciones ambientales exógenas. En un caso, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se expresan bajo el control de un promotor que se induce directa o indirectamente por condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias, donde la expresión de la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o uno o más transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se activan en entornos de bajo contenido de oxígeno o anaerobios, tales como el entorno del intestino de mamífero. Los promotores inducibles de ejemplo descritos en esta invención incluyen promotores dependientes del nivel de oxígeno (por ejemplo, un promotor inducible por FNR) y promotores inducidos por un metabolito que puede estar o no presente de forma natural (por ejemplo, se puede añadir de forma exógena) en el intestino, por ejemplo, arabinosa, tetraciclina, IPTG, ramnosa y otros inductores químicos y/o nutricionales. En algunos casos, dichos promotores inducibles descritos en esta invención, se inducen en condiciones de cultivo *in vitro*, ya que las cepas se preparan antes de la administración *in vivo*, como se describe en esta invención. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, un promotor sensible a FNR, un promotor P_{araBAD} y un promotor P_{TetR}, promotor Plac, el promotor rhaP BAD (ramnosa), cada uno de los cuales se describe en más detalle en esta invención. Los promotores inducibles se describen en más detalle a continuación.

El al menos un gen que codifica la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, puede estar presente en un plásmido o cromosoma en la célula bacteriana. En un caso, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se sitúan en un plásmido en la célula bacteriana. En otro caso, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se sitúan en el cromosoma de la célula bacteriana. En otro caso más, una copia nativa de la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se sitúan en el cromosoma de la célula bacteriana, y uno o más genes que codifican una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se sitúan en un plásmido en la célula bacteriana. En otro caso más, una copia nativa de la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se sitúan en un plásmido en la célula bacteriana, y al menos un gen que codifica la al menos una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, de una especie diferente de bacteria se sitúan en un plásmido en la célula bacteriana. En otro caso más, una copia nativa de la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se sitúan en el cromosoma de la célula bacteriana, y el uno o más genes que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, de una especie diferente de bacteria se sitúan en el cromosoma de la célula bacteriana. En algunos casos, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se expresan en un plásmido de bajo número de copias. En algunos casos, la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y, se expresan en un plásmido de alto número de copias. En algunos casos, el plásmido de alto número de copias puede ser útil para aumentar la expresión de la al menos una o más PME y/o transportadores de Phe, por ejemplo, PheP, y/u otras

proteínas reguladoras, por ejemplo, FNRS24Y.

En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente descritas anteriormente comprenden además una o más de las modificaciones, mutaciones y/o deleciones en los genes endógenos descritos en esta invención.

En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 impulsada por FNR (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*), por ejemplo, SEQ ID NO: 38) y dos copias de *pheP* impulsada por FNR (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*), por ejemplo, SEQ ID NO: 62). La cepa comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::FNRS24Y, por ejemplo, SEQ ID NO: 64). En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente es SYN-PKU707 (por ejemplo, como se representa en la **figura 47A**).

En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 impulsada por FNR (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*), por ejemplo, SEQ ID NO: 38) y dos copias de *pheP* impulsada por FNR (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*), por ejemplo, SEQ ID NO: 62). La cepa comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::FNRS24Y por ejemplo, SEQ ID NO: 64). El genoma se manipula adicionalmente para incluir una auxotrofia *dapA*, en la que se elimina el gen *dapA*. En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente es SYN-PKU712 (por ejemplo, como se representa en la **figura 47E**).

En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente comprende un cromosoma bacteriano con tres inserciones cromosómicas de PAL3 impulsada por FNR (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*), por ejemplo, SEQ ID NO: 38) y dos copias de *pheP* impulsada por FNR (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*), por ejemplo, SEQ ID NO: 62). La cepa comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo y una copia de la LAAD insertada en el mismo sitio de inserción (Para::FNRS24Y-LAAD, por ejemplo, SEQ ID NO: 73), que se transcribe como un mensaje bicistrónico desde el promotor de arabinosa endógeno. El genoma se manipula adicionalmente para incluir una auxotrofia *dapA*, en la que se elimina el gen *dapA*. En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente es SYN-PKU708 (por ejemplo, como se representa en la **figura 47B**).

En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente comprende un cromosoma bacteriano con tres inserciones cromosómicas de PAL3 impulsada por FNR (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*), por ejemplo, SEQ ID NO: 38) y dos copias de *pheP* impulsada por FNR (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*), por ejemplo, SEQ ID NO: 62). La cepa comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo y una copia de la LAAD insertada en el mismo sitio de inserción (Para::FNRS24Y-LAAD, por ejemplo, SEQ ID NO: 73), que se transcribe como un mensaje bicistrónico desde el promotor de arabinosa endógeno. En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente es SYN-PKU711 (por ejemplo, como se representa en la **figura 47F**).

En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente comprende un cromosoma bacteriano que comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 impulsada por FNR (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*), por ejemplo, SEQ ID NO: 38) y dos copias de *pheP* impulsada por FNR (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*), por ejemplo, SEQ ID NO: 62). La cepa comprende además una copia de LAAD insertada en el operón de arabinosa con la

expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::LAAD, por ejemplo, SEQ ID NO: 40). El genoma se manipula adicionalmente para incluir una auxotrofia dapA, en la que se elimina el gen dapA. En un caso, la cepa bacteriana manipulada genéticamente es SYN-PKU709 (por ejemplo, como se representa en la **figura 47C**).

5

En una realización, la cepa bacteriana manipulada genéticamente comprende un cromosoma bacteriano que comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 impulsada por FNR (3X fnrS-PAL (malP/T, yicS/nepl, malE/K), por ejemplo, SEQ ID NO: 38) y dos copias de pheP impulsada por FNR (2XfnrS-pheP (lacZ, agal/rsml), por ejemplo, SEQ ID NO: 62). La cepa comprende además una copia de la LAAD insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::LAAD, por ejemplo, SEQ ID NO: 40). SYN-PKU710 comprende además dos copias de PAL3 inducible por IPTG (2XLacIPAL, exo/cea y rhtC/rhtB, por ejemplo, SEQ ID NO: 74), una auxotrofia dapA y se cura de todas las resistencias a los antibióticos. En una realización, la cepa bacteriana manipulada genéticamente es SYN-PKU710 (por ejemplo, como se representa en la **figura 47D**).

15

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En una realización, la cepa es SYN-PKU1001.

25

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (LacI -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO:98). En una realización, la cepa es SYN-PKU1002.

30

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En una realización, la cepa es SYN-PKU1003.

35

40

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (LacI -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En una realización, la cepa es SYN-PKU1004.

45

50

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción

mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *thyA*: : *prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En una realización, la cepa es SYN-PKU1005.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de *pheP* (*lacZ*::PfnrS-*pheP*, *agal/rsml*::PfnrS-*pheP*) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *thyA*: : *prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (LacI -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En una realización, la cepa es SYN-PKU1006.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de *pheP* (*lacZ*::PfnrS-*pheP*, *agal/rsml*::PfnrS-*pheP*) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *thyA*::*prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En una realización, la cepa es SYN-PKU1007.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de *pheP* (*lacZ*::PfnrS-*pheP*, *agal/rsml*::PfnrS-*pheP*) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *thyA*::*prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (LacI -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En una realización, la cepa es SYN-PKU1008.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *dapA*::*prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En un caso, la cepa es SYN-PKU1009.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *dapA*::*prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (LacI -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En un caso, la cepa es SYN-PKU1010.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *dapA*::*prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina *Kis*). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En un caso, la cepa es SYN-PKU1011.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (*lacI* -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En un caso, la cepa es SYN-PKU1012

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (*LacI* Fnrs-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En un caso, la cepa es SYN-PKU1013

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (*lacI* -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En un caso, la cepa es SYN-PKU1014.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (*LacI* Fnrs-Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 97). En un caso, la cepa es SYN-PKU1015.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (*lacI* -Ptac-PAL-PAL, por ejemplo, SEQ ID NO: 98). En un caso, la cepa es SYN-PKU1016.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de *pheP* (*lacZ::PfnrS-pheP*, *agal/rsml::PfnrS-pheP*) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (*LacI* Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En una realización, la cepa es SYN-PKU1017.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de *pheP* (*lacZ::PfnrS-pheP*, *agal/rsml::PfnrS-pheP*) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (*LacI* Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En una realización, la cepa es SYN-PKU1018.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En una realización, la cepa es SYN-PKU1019.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En una realización, la cepa es SYN-PKU1020.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En una realización, la cepa es SYN-PKU1021.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En una realización, la cepa es SYN-PKU1022.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En una realización, la cepa es SYN-PKU1023.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI FnrS-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En una realización, la cepa es SYN-PKU1024.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En un caso, la cepa es SYN-PKU1025.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En un caso, la cepa es SYN-PKU1026.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En un caso, la cepa es SYN-PKU1027.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *dapA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En un caso, la cepa es SYN-PKU1028.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En un caso, la cepa es SYN-PKU1029.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En un caso, la cepa es SYN-PKU1030.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *dapA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen *bla* se reemplaza por la construcción de la **figura 65A** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 95). En un caso, la cepa es SYN-PKU1032.

En un caso, la bacteria manipulada genéticamente comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus *thyA* en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; *thyA::prom1* constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo

2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65C** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL-PheP, por ejemplo, SEQ ID NO: 96). En un caso, la cepa es SYN-PKU1032.

- 5 En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr); y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD); y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAH. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAH; y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL1, (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL1, (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD); y además comprende una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAH. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAH; y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAH y una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAH y una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD); y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). Las PME y los transportadores pueden integrarse en cualquiera de los sitios de inserción descritos en esta invención.
- 45 En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD) y una o más copias de PAH. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD) y una o más copias de PAH; y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las

bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD) y una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD) y una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr); y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), y una o más copias de PAH. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una o más copias de PAH; y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD), una o más copias de PAH y una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD), una o más copias de PAH y una o más copias de PAL1 (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr); y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). Las PME y/o transportadores pueden integrarse en cualquiera de los sitios de inserción descritos en esta invención. Como alternativa, las PME y/o los transportadores pueden estar comprendidos en plásmidos de bajo o alto número de copias. Las PME y/o transportadores pueden integrarse en cualquiera de los sitios de inserción descritos en esta invención en combinación con PME y/o transportadores que están comprendidos en plásmidos de bajo o alto número de copias.

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de PAL1, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD) y una o más copias de PAH. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de PAL3, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de PAL1, por ejemplo (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una o más copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD) y una o más copias de PAH; y además comprenden una o más copias de un transportador de fenilalanina (por ejemplo, PheP y/o AroP, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr). Las PME y los transportadores pueden integrarse en cualquiera de los sitios de inserción descritos en esta invención. Como alternativa, las PME y/o transportadores pueden estar comprendidos en plásmidos de bajo o alto número de copias.

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una copia de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una copia de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una

copia de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una copia de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, Bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). Las PME y los transportadores pueden integrarse en cualquiera de los sitios de inserción descritos en esta invención. Como alternativa, las PME y/o los transportadores localizados pueden estar comprendidos en plásmidos de bajo o alto número de copias.

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dos copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dos copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dos copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD).

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), tres copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), tres copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD).

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cuatro copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cuatro copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cuatro

copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cuatro copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD).

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cinco copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cinco copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y una copia de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cinco copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) una copia de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden cinco copias de PAL (por ejemplo, PAL1 o PAL3, por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr), dos copias de PheP (por ejemplo, bajo el control de un promotor Pfnr) y dos copias de LAAD (por ejemplo, bajo el control del promotor ParaBAD).

En un caso, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más PME para metabolizar la fenilalanina en combinación con una o más PME para la secreción. En un caso, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más PME para metabolizar fenilalanina y un transportador de fenilalanina en combinación con una o más PME para secreción. En un caso, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más PME para metabolizar fenilalanina y un transportador de fenilalanina en combinación con una o más PME para secreción, y también incluyen una auxotrofia y/o resistencia a antibióticos. Los sistemas de secreción descritos en esta invención se utilizan para secretar las PME en las bacterias manipuladas genéticamente con múltiples mecanismos de acción.

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dos copias adicionales de PheP (además del gen de tipo natural). Esto proporciona redundancia, en caso de que uno de los genes de PheP adquiera una mutación. En una realización, los genes de PheP se insertan en lacZ y agal/rsml. En una realización, las dos copias de PheP están bajo el control del promotor PfnrS. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL3. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL3, insertadas en maleK, malPT, yicS/nepl. En una realización, la expresión de las tres copias de PAL3 está bajo el control del promotor PfnrS. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una o más copias de LAAD. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una copia de LAAD, insertada en el operón arabinosa. En una realización, LAAD está bajo el control del promotor ParaBAD endógeno. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una resistencia a los antibióticos. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una resistencia a antibióticos y una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente no comprenden una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente no

comprenden una resistencia a los antibióticos. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente no comprenden ni una resistencia a los antibióticos ni una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA.

5 En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL, por ejemplo PAL3, 2 copias de PheP (además de PheP endógena), y una copia de LAAD. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL, por ejemplo, PAL3, 2 copias de PheP (además de la PheP endógena) y una copia de LAAD, y una auxotrofia, por ejemplo, delta ThyA. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL, 2 copias de PheP (además de la PheP endógena) y una copia de LAAD, y un gen de resistencia a antibióticos. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL, 2 copias de PheP (además de la PheP endógena) y una copia de LAAD, y un gen de resistencia a antibióticos y una auxotrofia, por ejemplo, delta ThyA.

15 En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS) y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS) y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno) y una resistencia a los antibióticos. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS) y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno) y una auxotrofia, por ejemplo, delta ThyA. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS) y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno) y una resistencia a antibióticos y una auxotrofia, por ejemplo, delta ThyA.

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios malEK, malPT y yicS/nepl), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios LacZ y agal/rsml), y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno e insertada en el operón arabinosa endógeno). En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios malEK, malPT y yicS/nepl), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios LacZ y agal/rsml), y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno e insertada en el operón arabinosa endógeno), y además comprenden una resistencia a los antibióticos. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios malEK, malPT y yicS/nepl), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios LacZ y agal/rsml), y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno e insertada en el operón arabinosa endógeno) y además comprenden una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden tres copias de PAL (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios malEK, malPT y yicS/nepl), 2 copias de PheP (cada una bajo el control de un promotor PfnrS e insertada en los sitios LacZ y agal/rsml), y una copia de LAAD (bajo el control del promotor ParaBAD endógeno e insertada en el operón arabinosa endógeno), y además comprenden una resistencia a los antibióticos y una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA.

En un caso, las bacterias manipuladas genéticamente son SYN-PKU705. En un caso, SYNPKU705 comprende además una resistencia a antibióticos. En un caso, SYN-PKU705 comprende además una auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En un caso, SYN-PKU705 comprende además una resistencia a antibióticos y auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA.

La **Tabla 14** contiene ejemplos no limitantes de las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación. En determinados caso, las bacterias manipuladas genéticamente de la Tabla 14 contienen además una PME para la secreción.

Tabla 14. Ejemplos no limitantes de casos y realizaciones de la divulgación

Nombre de la cepa	Genotipo
<u>Cebas basadas en plásmidos</u>	
SYN-PKU101	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina
SYN-PKU102	Alto número de copias de pColE1-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina,
SYN-PKU201	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina
SYN-PKU202	Alto número de copias de pColE1-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina,
SYN-PKU203	<i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i>
SYN-PKU401	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina, <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico
SYN-PKU402	Alto número de copias de pColE1-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina, <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico
SYN-PKU302	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina; <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico
SYN-PKU303	Alto número de copias de pColE1-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina, <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico
SYN-PKU304	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS::PAL3, resistente a ampicilina; <i>lacZ::PfmrS-pheP::cam</i> cromosómico
SYN-PKU305	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS::PAL3, resistente a kanamicina; <i>lacZ::PfmrS-pheP::cam</i> cromosómico
SYN-PKU306	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS::PAL3, resistente a kanamicina; <i>thyA</i>
SYN-PKU307	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS::PAL3, resistente a ampicilina;
SYN-PKU308	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS::PAL3, resistente a kanamicina;
SYN-PKU401	Alto número de copias de pUC57-Ptet::LAAD; resistente a kanamicina
<u>Cepas integradas</u>	
SYN-PKU501	<i>malPT::PfmrS::PAL3::kan</i>
SYN-PKU502	<i>malPT::PfmrS::PAL3::kan; lacZ:: bicistrónico PfmrS::PAL3-pheP::cam</i>
SYN-	<i>malEK::PfmrS::PAL3::cam</i>

PKU503	
SYN- PKU504	<i>agallrsml::PfnrS::PAL3</i>
SYN- PKU505	<i>cea::PfnrS::PAL3</i>
SYN- PKU506	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3</i>
SYN- PKU507	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP::cam</i>
SYN- PKU508	<i>malEK::PfnrS::PAL3; pheA</i> auxótrofo
SYN- PKU509	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP::cam</i>
SYN- PKU601	<i>malPT::PfnrS-INT5::kan, rrnBUP -[PAL3]; lacZ::Pfnr-pheP::cam</i> (cepa a base de recombinasa)
SYN- PKU510	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3;</i>
SYN- PKU511	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; yicS/nepl.-:PfnrS-PAL3::kan; malPT::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP; ΔthyA</i>
SYN- PKU204	<i>lacZ::Pfnr-pheP::cam</i>
SYN- PKU512	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; malPT::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP::cam; ΔthyA</i>
SYN- PKU513	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP; ΔthyA</i>
SYN- PKU514	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; malPT::PfnrS::PAL3; ΔthyA</i>
SYN- PKU515	<i>malEK::PfnrS::PAL3; agallrsml::PfnrS::PAL3; cea::PfnrS::PAL3; ΔthyA</i>
SYN- PKU516	<i>agallrsml::PfnrS::PAL3::kan</i>
SYN- PKU517	<i>malEK::PfnrS::PAL3::cam; malPT::PfnrS::PAL3::kan; lacZ::PfnrS-pheP; ΔthyA</i>
SYN- PKU518	<i>malEK-PfnrS::PAL3::cam; PfnrS::pheP::kan</i>
SYN- PKU519	<i>ParaBC-PAL3::cam; PfnrS-pheP::kan</i>
SYN- PKU520	<i>agallrsml::PfnrS::PAL3::kan; PfnrS-PheP::cam</i>
SYN- PKU801	<i>ΔargR; thyA::cam</i>
SYN- PKU701	<i>ParaBC-LAAD::cam; malEK-PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3::kan; PfnrS-pheP</i>
SYN- PKU521	<i>yicS/nepl::PfnrS-PAL3::kan; lacZ::Pfnr-pheP::cam</i>
SYN- PKU522	<i>cea::PfnrS-PAL3::kan; lacZ::Pfnr-pheP::cam</i>
SYN- PKU523	<i>malPT::PfnrS-PAL3::kan; lacZ::Pfnr-pheP::cam</i>
SYN- PKU524	<i>malEK::PfnrS::PAL3; malPT::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP</i>

SYN- PKU702	<i>malEK::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP; Para::LAAD</i>
SYN- PKU703	<i>malEK:: PfnrS::PAL3; malPT::PfnrS::PAL3; lacZ::Pfnr-pheP; agallrsml::PfnrS::pheP; Para::LAAD</i>
SYN- PKU704	<i>malEK:: PfnrS::PAL3; malPT::PfnrS::PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::Pfnr-pheP; Para::LAAD</i>
SYN- PKU705	<i>malEK::PfnrS::PAL3; malPT::PfnrS::PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3::kan; lacZ::Pfnr-pheP; agallrsml::PfnrS::pheP Para::LAAD</i>
SYN- PKU602	<i>malEK::PT7::PAL3; Para::INT5::cam (recombinasa); lacZ::Pfnr-pheP; malPT::Pconstitutivo::T7 polimerasa (al revés);</i>
SYN- PKU901	<i>Nissle con resistencia a estreptomicina</i>
SYN- PKU713	<i>Lacz::PfnrS-PAL3::pheP</i>
SYN- PKU706	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para::LAAD, ΔdapA::cm</i>
SYN- PKU707	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para::FNRS24Y::cm</i>
SYN- PKU708	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para::FNRS24Y-LAAD; ΔdapA</i>
SYN- PKU- 709	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para-LAAD; ΔdapA</i>
SYN- PKU- 710	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para::LAAD; exolcea:: LacIPAL3; rhtC/rhtB::LacIPAL3; ΔdapA</i>
SYN- PKU711	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para::FNRS24Y-LAAD;</i>
SYN- PKU- 712	<i>malEK::PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP; Para::FNRS24Y; ΔDapA</i>
SYN- PKU- 714	<i>lacZ::PfnrS-pheP, agallrsml::PfnrS-pheP</i>

Secreción

- 5 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además un mecanismo de secreción nativa o mecanismo de secreción no nativo que es capaz de secretar una molécula del citoplasma bacteriano en el entorno extracelular. Muchas bacterias han desarrollado sofisticados sistemas de secreción para transportar sustratos a través de la envoltura celular bacteriana. Los sustratos, tales como moléculas pequeñas, proteínas y ADN, pueden liberarse al espacio extracelular o al periplasma (tal como el lumen
- 10 intestinal u otro espacio), inyectarse en una célula diana o asociarse con la membrana bacteriana.

- En las bacterias gramnegativas, los mecanismos de secreción pueden atravesar una o ambas membranas internas y externas. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas
- 15 genéticamente comprenden además un sistema de secreción no nativo que atraviesa la membrana. Los sistemas de secreción que atraviesan la doble membrana incluyen, pero sin limitación, el sistema de secreción de tipo I (T1SS), el sistema de secreción de tipo II (T2SS), el sistema de secreción de tipo III (T3SS), el sistema de secreción de tipo IV

(T4SS), el sistema de secreción de tipo VI (T6SS) y la familia de bombas de eflujo de múltiples fármacos por división de nodulación por resistencia (RND) (Pugsley 1993; Gerlach et al., 2007; Collinson et al., 2015; Costa et al., 2015; Reeves et al., 2015; WO2014138324A1). En las **figuras 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100** se muestran ejemplos de tales sistemas de secreción. Las micobacterias, que tienen una envoltura celular similar a las gramnegativas, también pueden codificar un sistema de secreción de tipo VII (T7SS) (Stanley et al., 2003). Con la excepción de T2SS, las secreciones que atraviesan la doble membrana generalmente transportan sustratos desde el citoplasma bacteriano directamente al espacio extracelular o al interior de la célula diana. Por el contrario, el T2SS y los sistemas de secreción que atraviesan solo la membrana externa pueden utilizar un mecanismo de dos pasos, en el que los sustratos se trasladan primero al periplasma mediante transportadores que atraviesan la membrana interna y a continuación se transfieren a la membrana externa o se secretan al espacio extracelular. Los sistemas de secreción que atraviesan la membrana externa incluyen, pero sin limitación, el sistema de secreción de tipo V o autotransportador o sistema autosecretor (T5SS), el sistema de secreción de curli y la vía chaperona-usher para el ensamblaje de pili (Saier, 2006; Costa et al., 2015).

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden además un sistema de secreción de tipo III o similar a tipo III (T3SS) de *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Bivrio*, *Burkholderia*, *Yersinia*, *Chlamydia* o *Pseudomonas*. El T3SS es capaz de transportar una proteína desde el citoplasma bacteriano al citoplasma del huésped a través de un complejo de agujas. El T3SS puede modificarse para secretar la molécula del citoplasma bacteriano, pero no inyectar la molécula en el citoplasma del huésped. Por tanto, la molécula se secreta en el lumen intestinal u otro espacio extracelular. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden dicho T3SS modificado y son capaces de secretar la molécula de interés del citoplasma bacteriano. En algunas realizaciones, la molécula secretada, tal como una proteína o péptido heterólogo, comprende una secuencia de secreción de tipo III que permite que la molécula de interés se secrete de las bacterias.

En algunas realizaciones, se usa una vía de secreción de tipo III flagelar para secretar la molécula de interés. En algunas realizaciones, se usa un flagelo incompleto para secretar un péptido terapéutico de interés, fusionándolo de forma recombinante con el péptido con una señal de secreción flagelar del extremo N de un componente flagelar nativo. De esta manera, el péptido quimérico expresado intracelularmente puede movilizarse a través de las membranas interna y externa hacia el entorno del huésped circundante. Por ejemplo, un aparato de secreción flagelar de tipo III modificado en el que el fragmento de ADN no traducido cadena arriba del gen *fliC* (que codifica la flagelina), por ejemplo, una región de 173 pb, se fusiona con el gen que codifica el polipéptido de interés puede usarse para secretar polipéptidos heterólogos (véase, por ejemplo, Majander et al., Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *NatBiotechnol.* Abril de 2005;23(4):475-81). En algunos casos, la región no traducida de los locus *fliC* puede no ser suficiente para mediar en la translocación del péptido pasajero a través de los flagelos. Aquí puede ser necesario extender la señal del extremo N a la secuencia de codificación de aminoácidos de *FliC*, por ejemplo, usando los 173 pb de la región no traducida junto con los primeros 20 aminoácidos de *FliC* (véase, por ejemplo, Duan et al., Secretion of Insulinotropic Proteins by Commensal Bacteria: Rewiring the Gut To Treat Diabetes, *Appl. Environ. Microbiol.* Diciembre de 2008 vol. 74 N.º 23 7437-7438).

En algunas realizaciones, se usa un sistema de secreción de autotransportador de tipo V para secretar la molécula de interés, por ejemplo, un péptido terapéutico. Debido a la simplicidad de la maquinaria y la capacidad para manipular flujos de proteínas relativamente

grandes, el sistema de secreción de Tipo V es atractivo para la producción extracelular de proteínas recombinantes. Como se muestra en la **figura 94**, un péptido terapéutico (estrella) puede fusionarse con una señal de secreción del extremo N, un enlazador y el dominio beta de un autotransportador. La secuencia señal dependiente de Sec del extremo N dirige la proteína a la maquinaria SecA-YEG que mueve la proteína a través de la membrana interna hacia el periplasma, seguida de la posterior escisión de la secuencia señal. El dominio Beta se recluta para el complejo Bam ('Maquinaria de ensamblaje de barriles Beta') donde el dominio beta se pliega y se inserta en la membrana externa como una estructura de barril beta. El péptido terapéutico se enhebra a través del poro hueco de la estructura de barril beta por delante de la secuencia enlazadora. Una vez expuesto al entorno extracelular, el péptido terapéutico puede liberarse del sistema enlazador mediante una escisión autocatalítica (lado izquierdo del complejo Bam) o dirigiendo una peptidasa asociada a la membrana (tijeras negras; lado derecho del complejo de Bam) a un sitio de corte de proteasa complementario en el enlazador. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la molécula secretada, tal como una proteína o péptido heterólogo, comprende una señal de secreción del extremo N, un enlazador, y un dominio beta de un autotransportador para permitir que la molécula se secrete desde las bacterias.

En algunas realizaciones, se usa un sistema de secreción basado en hemolisina para secretar la molécula de interés, por ejemplo, péptido terapéutico. Los sistemas de secreción tipo I ofrecen la ventaja de trasladar su péptido pasajero directamente desde el citoplasma al espacio extracelular, obviando el proceso de dos pasos de otros tipos de secreción. La **figura 96** muestra la alfa-hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* uropatógena. Esta vía utiliza HlyB, un transportador de casete de unión a ATP; HlyD, una proteína de fusión de membranas; y TolC, una proteína de la membrana externa. El ensamblaje de estas tres proteínas forma un canal a través de las membranas interna y externa. De forma nativa, este canal se usa para secretar HlyA, sin embargo, para secretar el péptido terapéutico de la presente divulgación, la parte del extremo C que contiene la señal de secreción de HlyA se fusiona a la parte del extremo C de un péptido terapéutico (estrella) para mediar en la secreción de este péptido.

En realizaciones alternativas, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además un sistema de secreción no nativo que atraviesa una sola membrana. Los transportadores que atraviesan una sola membrana pueden actuar como un componente de un sistema de secreción o pueden exportar sustratos de forma independiente. Dichos transportadores incluyen, pero sin limitación, translocasas de casetes de unión a ATP, translocasas relacionadas con flagelo/virulencia, translocasas relacionadas con la conjugación, el sistema secretor general (por ejemplo, el complejo SecYEG en *E. coli*), el sistema secretor accesorio en micobacterias y varios tipos de bacterias grampositivas (por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Streptococcus gordonii*, *Staphylococcus aureus*), y el sistema de translocación de arginina gemela (TAT) (Saier, 2006; Rigel y Braunstein, 2008; Al. al., 2013). Se sabe que los sistemas secretor general y TAT pueden exportar sustratos con péptidos señal del extremo N escindibles al periplasma, y se han explorado en el contexto de la producción biofarmacéutica. Sin embargo, el sistema TAT puede ofrecer ventajas particulares, ya que es capaz de transportar sustratos plegados, eliminando así la posibilidad de un plegado prematuro o incorrecto. En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un sistema TAT o similar a TAT y son capaces de secretar la molécula de interés del citoplasma bacteriano. Un experto en la técnica entendería que los sistemas de secreción descritos en esta invención pueden modificarse para actuar en diferentes especies, cepas y subtipos de bacterias, y/o adaptarse para suministrar diferentes cargas útiles.

Con el fin de trasladar una proteína, por ejemplo, polipéptido terapéutico, al espacio extracelular, el polipéptido debe primero ser traducido intracelularmente, movilizarse a través de la membrana interna y finalmente movilizarse a través de la membrana externa. Muchas proteínas efectoras (por ejemplo, polipéptidos terapéuticos), en particular las de

5 origen eucariota, contienen enlaces disulfuro para estabilizar las estructuras terciarias y cuaternarias. Si bien estos enlaces pueden formarse correctamente en el compartimento periplásmico oxidante con la ayuda de chaperones periplásmicos, para trasladar el polipéptido a través de la membrana externa, los enlaces disulfuro deben reducirse y la proteína debe desplegarse de nuevo.

10 Una forma de secretar proteínas correctamente plegadas en bacterias gramnegativas, particularmente aquellas que requieren enlaces disulfuro, es dirigir al periplasma del entorno reductor junto con una membrana externa desestabilizadora. De esta manera, la proteína se moviliza al entorno oxidante y se deja plegar adecuadamente. A diferencia de los sistemas

15 de secreción extracelular orquestados, la proteína es capaz de escapar del espacio periplásmico en una forma correctamente plegada por permeabilidad de la membrana. Por tanto, estos mutantes gramnegativos "permeables" son capaces de secretar polipéptidos bioactivos, debidamente unidos por enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen una membrana externa "permeable" o

20 desestabilizada. La desestabilización de la membrana externa bacteriana para inducir permeabilidad se puede lograr eliminando o mutagenizando genes responsables de unir la membrana externa al esqueleto rígido de peptidoglicano, incluidos, por ejemplo, *lpp*, *ompC*, *ompA*, *ompF*, *tolA*, *tolB*, *pal*, *degS*, *degP* y *nlpl*. *Lpp* es el polipéptido más abundante en la célula bacteriana que existe en aproximadamente 500.000 copias por célula y funciona

25 como la "grapa" principal de la pared celular bacteriana al peptidoglicano. 1.

Silhavy, TJ, Kahne, D. y Walker, S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a000414 (2010). Los complejos TolA-PAL y OmpA funcionan de manera similar a *Lpp* y son otras dianas de delección para generar un fenotipo permeable. Además, se han

30 observado fenotipos permeables cuando se inactivan las proteasas periplásmicas. El periplasma está muy densamente empaquetado con proteínas y, por lo tanto, codifica varias proteínas periplásmicas para facilitar el recambio de proteínas. La eliminación de proteasas periplásmicas, tales como *degS*, *degP* o *nlpl* puede inducir fenotipos permeables al promover una acumulación excesiva de proteína periplásmica. La mutación de las proteasas

35 también puede preservar el polipéptido efector evitando la degradación dirigida por estas proteasas. Además, una combinación de estas mutaciones puede potenciar sinérgicamente el fenotipo permeable de la célula sin sacrificios importantes en la viabilidad celular. Por tanto, en algunas realizaciones, las bacterias manipuladas tienen uno o más genes de membrana mutados o delecionados. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas

40 genéticamente tienen un gen *lpp* eliminado o mutado. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen uno o más genes eliminados o mutados, seleccionados entre *ompA*, *ompA*, y genes *ompF*. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen uno o más genes delecionados o mutados, seleccionados entre los genes *tolA*, *tolB* y *pal*. En algunas realizaciones, las bacterias

45 manipuladas genéticamente tienen uno o más genes de proteasa periplásmica mutados o delecionados. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas tienen uno o más genes de proteasa periplásmicos mutados o delecionados seleccionados entre *degS*, *degP* y *nlpl*. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas tienen uno o más genes delecionados o mutados, seleccionados entre los genes *lpp*, *ompA*, *ompF*, *tolA*, *tolB*, *pal*, *degS*, *degP* y

50 *nlpl*.

Para minimizar las alteraciones de la viabilidad celular, el fenotipo permeable se puede hacer inducible colocando uno o más genes de proteasa de membrana o periplásmico, por

ejemplo, seleccionados de *lpp*, *ompA*, *ompF*, *tolA*, *tolB*, *pal*, *degS*, *degP* y *nlpl*, bajo el control de un promotor inducible. Por ejemplo, la expresión de *lpp* u otra proteína de estabilidad de la pared celular o proteasa periplásmica puede reprimirse en condiciones en las que el polipéptido terapéutico necesita ser liberado (secretado). Por ejemplo, en condiciones de inducción se puede expresar una proteína represora de la transcripción o un ARN no codificante diseñado que reduce la transcripción o traducción de una membrana diana o un gen de proteasa periplásmica. Por el contrario, la sobreexpresión de ciertos péptidos puede resultar en un fenotipo desestabilizado, por ejemplo, sobreexpresión de colicinas o el tercer dominio topológico de *TolA*, cuya sobreexpresión de péptidos puede inducirse en condiciones en las que el polipéptido terapéutico necesita ser liberado (secretado). Este tipo de estrategias desacoplarían los fenotipos frágiles y permeables de la producción de biomasa. Por tanto, en algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen uno o más genes de proteasa de membrana y/o periplásmica bajo el control de un promotor inducible.

La **Tabla 15A** y la **Tabla 15B** enumeran los sistemas de secreción para bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas. Estas pueden usarse para secretar polipéptidos, proteínas de interés o proteína o proteínas terapéuticas de las bacterias manipuladas, que se revisan en Milton H. Saier, Jr. *Microbe/Volumen 1*, Número 9, 2006 "Protein Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria Gram-negative bacteria possess many protein secretion-membrane insertion systems that apparently evolved independently".

Tabla 15A. Sistemas de secreción para bacterias grampositivas

Cepa bacteriana	Sistema de secreción relevante
<i>C. novyi-NT (Gram+)</i>	Vía sec.
	Vía argininas gemelas (TAT)
<i>C. butryicum (Gram+)</i>	Vía sec.
	Vía argininas gemelas (TAT)
<i>Listeria monocytogenes (Gram+)</i>	Vía sec.
	Vía argininas gemelas (TAT)

Tabla 15B. Sistemas de secreción para bacterias gramnegativas

Vías secretoras de proteínas (SP) en bacterias gramnegativas y sus descendientes							
Tipo (abreviatura)	Nombre	TC# ²	Bacteria	Arquea	Eukaria	N.º de proteína/sistema	Fuente de energía
Translocasas que forman canales de la membrana interna de bacterias gramnegativas-IMPS							
ABC (SIP)	Translocasa de casete de unión a ATP	3.A.1	+	+	+	3-4	ATP
SEC (IISP)	Translocasa secretora general	3.A.5	+	+	+	~12	GTP OR ATP + PMF
Fla/Path (IIISP)	Translocasa relacionada con el flagelo/virulencia	3.A.6	+	-	-	>10	ATP
Conj. (IVSP)	Translocasa relacionada con conjugación	3.A.7	+	-	-	>10	ATP

Tat (IISP)	Translocasa dirigida a argininas gemelas	2.A.6 4	+	+	+	(cloroplastos)	2-4	PMF
Oxa1 (YidC)	Familia de biogénesis de citocromo oxidasa	2.A.9	+	+	+	(mitocondrias, cloroplastos)	1	Ninguna o PMF
MscL	Familia de canales mecanosensibles de amplia conductancia	1.A.2 2	+	+	+		1	Ninguna
Holinas	Superfamilia funcional de holinas	1.E.1 •21	+	-	-		1	Ninguna

Orgánulos eucariotas

MPT	Translocasa de proteína mitocondrial 1	3.A. B	-	-	+	(mitocondrial)	>20	ATP
CEPT	Translocasa de proteína de envoltura de cloroplasto	3.A.9	(+)	-	+	(cloroplastos)	≥3	GTP
Bcl-2	Familia de Bcl-2 eucariota (muerte celular programada)	1.A.2 1	-	-	+		¿1?	Ninguna

Translocasas que forman canales de la membrana externa de bacterias gramnegativas

MTB (IISP)	Ramificación terminal principal de la translocasa secretora general	3.A.1 5	+ ^b	-	-		~14	ATP; PMF
FUP AT-1	Autotransportador 1 de proteína usher fimbrial	1.B.1 1 1.B.1 2	+ ^b + ^b	-	-	-	1 1	Ninguna Ninguna
AT-2 OMF (ISP)	Autotransportador 2	1.B.4 0 1.B.1 7	+ ^b + ^b	-	-	+(?)	1 1	Ninguna Ninguna
TPS		1.B.2	+	-	+		1	Ninguna
Secretina (IISP e IISP)		0 1.B.2 2	+ ^b		-		1	Ninguna
OmpIP	Porina de inserción de membrana externa	1.B.3 3	+	-	+	(mitocondria; cloroplastos)	≥4	¿Ninguna?

Las tablas anteriores para bacterias grampositivas y gramnegativas enumeran los sistemas de secreción que se pueden usar para secretar polipéptidos y otras moléculas de las bacterias manipuladas, que se revisan en Milton H. Saier, Jr. Microbe/Volumen 1, Número 9,

2006 "Protein Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria Gram-negative bacteria possess many protein secretion-membrane insertion systems that apparently evolved independently".

- 5 Cualquiera de los sistemas de secreción descritos en esta invención puede emplearse según la divulgación para secretar las proteínas de interés. Los ejemplos no limitantes de proteínas de interés incluyen PME, por ejemplo, PAH, PAL y/o LAAD como se describe en esta invención. Estos polipéptidos pueden mutarse para aumentar la estabilidad, la resistencia a la digestión con proteasas y/o la actividad.

10

Tabla 16. Comparación de sistemas de secreción para la secreción de polipéptidos de bacterias manipuladas

Sistema de secreción	Etiqueta	Escisión	Ventajas	Otras características
Tipo III modificado (flagelar)	ARNm (o extremo N)	No es necesaria escisión	- Sin etiqueta peptídica - Endógeno	Puede no ser tan adecuado para proteínas más grandes. Deleción de genes flagelares
Autotransporte tipo V	Extremo N y C	Sí	Proteínas grandes Endógeno Escindible	Secreción de 2 pasos
Tipo I	Extremo C	No		Etiqueta; Maquinaria exógena
Membrana externa difusible (DOM)	Extremo N	Sí	Formación de enlaces disulfuro	Puede afectar a la fragilidad/supervivencia/crecimiento/rendimiento celular

- 15 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un sistema de secreción nativo o no nativo descrito en esta invención para la secreción de una PME, por ejemplo, PAH, PAL y/o LAAD. En algunas realizaciones, el sistema de secreción se selecciona entre los sistemas de secreción flagelar tipo III modificado, tipo I (por ejemplo, sistema de secreción de hemolisina), tipo II, tipo IV, tipo V, tipo VI y tipo VII, bombas de eflujo de múltiples fármacos por división de nodulación por resistencia (RND), un sistema de
- 20 secreción de membrana única, sistemas de secreción Sec y TAT.

- En algunas realizaciones, las PME secretadas por las bacterias manipuladas genéticamente se modifican para aumentar la resistencia a las proteasas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una o más PME administradas se modifican como se describe en Sarkissian et al., 2011, Mol Genet Metab. 2011 Nov; 104 (3): 249-254.
- 25

En algunas realizaciones, la PAL secretada es Av-p.C503S/p.C565S/p.F18A PAL. En algunas realizaciones, la PAL secretada es PEG-Av-p.C503S/p.C565S/p.F18A PAL.

- 30 En algunos casos, la una o más PME para la secreción están bajo el control de un promotor inducible, como se describe en esta invención. En un ejemplo, una o más PME están bajo el

control del promotor FNR y se producen y secretan en condiciones anaerobias y/o de bajo contenido de oxígeno. En algunos casos, las PME para la secreción están bajo el control del promotor ParaBAD. En algunos casos, las PME para la secreción están bajo el control de un promotor constitutivo.

5

En algunas realizaciones en las que la una o más PME son secretadas o exportados a partir del microorganismo, el microorganismo modificado comprende la secuencia o secuencias de genes que incluye una etiqueta de secreción. En algunas realizaciones, las PME incluyen una "etiqueta de secreción" de ARN o de origen peptídico para dirigir las PME a sistemas de secreción específicos. Por ejemplo, una etiqueta de secreción para el sistema de secreción de hemolisina de tipo I está codificada en los 53 aminoácidos de los extremos C de la proteína alfa hemolisina (HlyA). Señal de secreción de HlyA.

10

HlyB se inserta en membrana interna para formar un poro, HlyD alinea HlyB con TolC (poro de la membrana externa) formando de este modo un canal a través de la membrana interna y externa. La etiqueta de secreción del extremo C puede eliminarse mediante una escisión autocatalítica o catalizada por proteasa, por ejemplo, OmpT, liberando así la una o más PME en el medio extracelular.

15

El sistema de autosecreción de tipo V utiliza una etiqueta peptídica dependiente de Sec del extremo N (membrana interna) y una etiqueta del extremo C (membrana externa). Esto usa el sistema Sec para pasar del citoplasma al periplasma. A continuación, la etiqueta del extremo C se inserta en la membrana externa formando un poro a través del cual pasa la "proteína pasajera". Una vez que atraviesa la membrana externa, el pasajero (molécula anticancerosa) se libera de la etiqueta del extremo C incluida en la membrana mediante un mecanismo autocatalítico similar a la inteína o mediante una proteasa unida a la membrana (es decir, OmpT). El sistema Sec elimina la etiqueta del extremo N. Por tanto, en algunas realizaciones, el sistema de secreción es capaz de eliminar esta etiqueta antes de segregar la o las PME, por ejemplo, PAL, PAH y/o LAAD de las bacterias manipuladas genéticamente. En la secreción mediada por autosecreción de Tipo V, la etiqueta de secreción de péptido del extremo N se elimina tras la translocación del péptido "pasajero" del citoplasma al compartimento periplásmico por el sistema Sec nativo. Además, una vez que el auto-secretor se transloca a través de la membrana externa, la etiqueta de secreción del extremo C puede eliminarse mediante una escisión autocatalítica o catalizada por proteasa, por ejemplo, OmpT, liberando así la molécula o moléculas anticancerígenas en el medio extracelular.

20

25

30

35

En la secreción de tipo III manipulada por flagelos, la etiqueta está codificada en la región 5' no traducida del ARNm y, por lo tanto, no hay etiqueta peptídica para escindir/eliminar. Este sistema modificado no contiene la parte de "jeringa" y en su lugar utiliza el cuerpo basal de la estructura de los flagelos como el poro para translocarse a través de ambas membranas y hacia afuera a través de los flagelos en formación. Si los genes fliC/fliD (que codifican la "cola"/látigo de los flagelos) se alteran, los flagelos no pueden formarse completamente y esto promueve la secreción general. En algunas realizaciones, la parte de la cola se puede eliminar por completo. En el sistema de secreción tradicional de Tipo III, el cuerpo basal se parece mucho a los flagelos, sin embargo, en lugar de una "cola"/látigo, el T3SS tradicional tiene una jeringa para inyectar las proteínas pasajeras en las células huésped. La etiqueta de secreción está codificada por un péptido del extremo N (las longitudes varían y hay varias etiquetas diferentes, ver PCT/US 14/020972). La etiqueta del extremo N no se elimina de los polipéptidos en este sistema de secreción.

40

45

50

En algunas realizaciones, los polipéptidos terapéuticos de interés se secretan usando componentes del sistema de secreción flagelar de tipo III. En un ejemplo no limitante, tal

polipéptido terapéutico de interés, tal como, la PME, por ejemplo, LAAD, PAH y/o PAL, se ensambla detrás de una *fliC*-5'UTR (por ejemplo, una región no traducida de 173 pb del locus *fliC*), y se impulsa por el promotor nativo. En otros casos, la expresión del péptido terapéutico de interés secretado usando componentes del sistema de secreción flagelar de tipo III se impulsa por un promotor inducible por Tet. En casos alternativos, se usa un promotor inducible, tal como promotores dependientes del nivel de oxígeno (por ejemplo, un promotor inducible por FNR), y promotores inducidos por un metabolito que puede estar o no presente de forma natural (por ejemplo, puede añadirse de forma exógena) en el intestino, por ejemplo, arabinosa. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico de interés se expresa a partir de un plásmido (por ejemplo, un plásmido de número medio de copias). En algunos casos, el polipéptido terapéutico de interés se expresa a partir de una construcción que se integra en el locus *fliC* (eliminando así *fliC*), donde se impulsa por el promotor *FliC* nativo. En algunos casos, se incluye en la construcción una parte del extremo N de *FliC* (por ejemplo, los primeros 20 aminoácidos de *FliC*) para aumentar aún más la eficacia de la secreción.

En algunos casos, los polipéptidos terapéuticos de interés tales como, la PME, por ejemplo, LAAD, PAH y/o PAL, se secretan a través de un sistema de membrana externa difusible (DOM). En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico de interés se fusiona con una señal de secreción dependiente de Sec del extremo N. Los ejemplos no limitantes de dichas señales de secreción dependientes de Sec del extremo N incluyen *PhoA*, *OmpF*, *OmpA* y *cvaC*. En realizaciones alternativas, el polipéptido terapéutico de interés se fusiona con una señal de secreción dependiente de Tat. Las etiquetas dependientes de Tat de ejemplo incluyen *TorA*, *FdnG* y *DmsA*. En algunos casos, la expresión de la proteína terapéutica etiquetada con secreción se impulsa por un promotor tet o un promotor inducible, tal como promotores dependientes del nivel de oxígeno (por ejemplo, un promotor inducible por FNR), o por promotores inducidos por un metabolito que puede estar o no presente de forma natural (por ejemplo, se puede añadir de forma exógena) en el intestino, por ejemplo, arabinosa. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico etiquetado por secreción de interés se expresa a partir de un plásmido (por ejemplo, un plásmido de número medio de copias). En otras realizaciones, el polipéptido terapéutico de interés se expresa a partir de una construcción que se integra en el cromosoma bacteriano, por ejemplo, en uno o más de los sitios de integración descritos en esta invención. En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden deleciones o mutaciones en una o más de las proteínas periplásmicas y/o de la membrana externa. Los ejemplos no limitantes de dichas proteínas, una o más de las cuales pueden eliminarse o mutarse, incluyen *lpp*, *pal*, *tolA* y/o *nlpl*. En algunas realizaciones, *lpp* se elimina o muta. En algunas realizaciones, *pal* se elimina o muta. En algunas realizaciones, *tolA* se elimina o muta. En otras realizaciones, *nlpl* se elimina o muta. Aún en otras realizaciones, determinadas proteasas periplásmicas se eliminan o mutan, por ejemplo, para aumentar la estabilidad del polipéptido en el periplasma. Los ejemplos no limitantes de dichas proteasas incluyen *degP* y *ompT*. En algunas realizaciones, *degP* se elimina o muta. En algunas realizaciones, *ompT* se elimina o muta. En algunas realizaciones, *degP* y *ompT* se eliminan o mutan.

En algunos casos, los polipéptidos terapéuticos de interés, por ejemplo, la PME, por ejemplo, LAAD, PAH y/o PAL, se secretan a través de una secreción de autosecretor de tipo V (proteína *pic*). En algunas realizaciones, la proteína terapéutica de interés se expresa como una proteína de fusión con el autosecretor nativo de Nissle *E. coli*_01635 (donde la proteína pasajera original se reemplaza por los polipéptidos terapéuticos de interés).

En algunos casos, los polipéptidos terapéuticos de interés, por ejemplo, la PME, por ejemplo, LAAD, PAH y/o PAL, se secretan a través de la secreción de hemolisina de tipo I. En una realización, el polipéptido terapéutico de interés se expresa como una proteína de

fusión con los 53 aminoácidos del extremo C de alfa-hemolisina (hlyA) de *E. coli* CFT073.

Enzimas consumidoras de oxígeno

- 5 La actividad catalítica de LAAD depende del oxígeno y, por lo tanto, puede no ser activa en entornos anaerobios y/o de bajo contenido de oxígeno en el intestino, por ejemplo, el colon. El oxígeno está presente en los compartimentos más proximales del tracto gastrointestinal.

10 La tensión de oxígeno medida en ratones sanos se muestra en la Tabla 17. He et al, Proc Natl Acad Sci USA. 13 abr 1999; 96 (8): 4586-91; "Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging".

15 Un gradiente de oxígeno marcado desde el tracto GI proximal a distal. Como señalaron He et al., el gradiente de oxígeno observado a lo largo del tracto gastrointestinal puede explicarse por una combinación de procesos. Sin desear ceñirse a la teoría, los alimentos, cuando se ingieren, se equilibran inicialmente con la tensión de oxígeno del aire ambiental. Al pasar al estómago y a continuación al intestino delgado, los niveles de oxígeno pueden descender a medida que el oxígeno se difunde a través de la membrana de la mucosa.

20 Puede ocurrir un proceso gradual de equilibrio con los niveles capilares de oxígeno (es decir, 5-10 torr; ref. 9). Al pasar al colon, con su intensa colonización bacteriana, se producen nuevas disminuciones de la oxigenación. Finalmente, el lumen del colon distal muestra una marcada hipoxia, como se esperaba, en base a la abundancia de bacterias anaerobias en este sitio.

25

Tabla 17. Tensión de oxígeno en compartimentos del tracto gastrointestinal

Compartimento	Tensión de oxígeno
Aire ambiente	159 Torr
Estómago	~60 torr
duodeno y primera parte del yeyuno	(~30 torr); ~ 20 % de oxígeno en el aire ambiente
íleon	(~10 torr); ~ 6 % de oxígeno en el aire ambiente
colon	(<2 torr)

Como se muestra en la **figura 25B**, la actividad de LAAD se retiene en condiciones microaerobias, aunque a niveles más bajos que en condiciones aerobias (**figura 25A y figura 25B**). Por lo tanto, la LAAD puede estar activa en las áreas más proximales del intestino, tales como el estómago, el duodeno, el yeyuno y el íleon. Se contempla como parte de esta descripción que la LAAD expresada por las bacterias manipuladas genéticamente puede ser ventajosamente activa en un compartimento diferente que PAL, que puede expresarse en el colon si está bajo el control de un promotor FNR. En un caso,

35 las bacterias manipuladas genéticamente expresan dos enzimas, que tienen diferentes requisitos de oxígeno y/o se inducen en diferentes condiciones de oxígeno, de modo que una PME dependiente de la presencia de oxígeno, se expresa en uno o más de estómago, duodeno e íleon bajo el control de un promotor constitutivo o inducible (tal como ParaBAD), y la segunda enzima, por ejemplo, PAL, se expresa en el colon bajo el control de un promotor FNR. En algunos casos, PAL se expresa en las condiciones que se encuentran en

40 el intestino delgado, por ejemplo, bajo el control de un promotor FNR, un promotor constitutivo o un promotor inducible diferente descrito en esta invención. En algunos casos, PAL y/o LAAD se preinducen antes de la administración *in vivo* y se expresan y se activan en la parte proximal del intestino. En algunos casos, PAL y/o LAAD se preinducen (de forma

aerobia o anaerobia, o con o sin un inductor químico y/o nutricional, como se describe en esta invención) antes de la administración *in vivo*, y se expresan y se activan en la parte distal del intestino.

- 5 Se pueden emplear varias estrategias para aumentar aún más la actividad de LAAD en condiciones de limitación de oxígeno. Por ejemplo, la actividad de otras enzimas que consumen grandes cantidades de oxígeno se puede reducir o extinguir. Una de esas enzimas es la NADH deshidrogenasa. *E. coli* tiene dos NADH deshidrogenasas; *nuo* y *ndh2*, y se ha demostrado que la eliminación de ambas enzimas reduce el consumo de oxígeno en
- 10 un 80 %. En algunas realizaciones, se toman medidas adicionales para conservar el oxígeno limitante, es decir, para permitir que LAAD funcione en condiciones de oxígeno exógeno más bajas en las bacterias manipuladas genéticamente que expresan LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además una mutación en uno o más genes implicados en el consumo de oxígeno. En algunas
- 15 realizaciones, se eliminan una o ambas NADH deshidrogenasas de *E. coli*. En algunas realizaciones, la NADH deshidrogenasa inactivada es *nuo*. En algunas realizaciones, la NADH deshidrogenasa inactivada es *ndh2*. En algunas formas de realización, *nuo* y *ndh2* se eliminan. Otras enzimas involucradas en el metabolismo del oxígeno de *E. coli* también pueden estar inactivas, incluidas las enzimas de la cadena respiratoria, tal como *cydB* (una
- 20 subunidad de oxidasa terminal de alta afinidad), *cydD* (una enzima necesaria para producir el citocromo D) y *cyoABC* (subunidades de citocromo oxidasa de baja afinidad). En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente albergan una mutación/delección de inactivación en uno más de los genes seleccionados entre *cydB*, *cydD* y *cyoABC*.
- 25 En un caso, la una o más PME codificadas por las bacterias manipuladas genéticamente se expresan y muestran actividad en el estómago. En un caso, la una o más PME codificadas por las bacterias manipuladas genéticamente se expresan y muestran actividad en el duodeno. En un caso, la una o más PME codificadas por las bacterias manipuladas genéticamente se expresan y muestran actividad en el yeyuno. En un caso, la una o más
- 30 PME codificadas por las bacterias manipuladas genéticamente se expresan y muestran actividad en el íleon. En un caso, la una o más PME codificadas por las bacterias manipuladas genéticamente se expresan y muestran actividad en el colon.

Genes esenciales y auxótrofos

- 35 Como se usa en esta invención, el término "gen esencial" se refiere a un gen que es necesario para el crecimiento celular y/o supervivencia. Los genes esenciales bacterianos son bien conocidos por los expertos en la técnica, y pueden identificarse mediante la eliminación dirigida de genes y/o mutagénesis aleatoria y cribado (véanse, por ejemplo,
- 40 Zhang y Lin, "DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes", Nucl Acids Res, 2009; 37: D455-D458 y Gerdes et al., "Essential Genes on metabolic maps", Curr Opin Biotechnol, 2006; 17 (5): 448-456).

- Un "gen esencial" puede depender de las circunstancias y el entorno en el que vive un
- 45 organismo. Por ejemplo, una mutación, modificación o escisión de un gen esencial puede dar como resultado que las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación se conviertan en auxótrofas. Una modificación auxotrófica está destinada a hacer que las bacterias mueran en ausencia de un nutriente agregado exógenamente esencial para la supervivencia o el crecimiento porque carecen del gen o genes necesarios para producir
- 50 ese nutriente esencial. En algunas realizaciones, cualquiera de las bacterias manipuladas genéticamente descritas en esta invención también comprende una delección o mutación en un gen requerido para la supervivencia y/o el crecimiento celular. En una realización, el gen esencial es un gen de síntesis de ADN, por ejemplo, *thyA*. En otra realización, el gen

esencial es un gen de síntesis de la pared celular, por ejemplo, *dapA*. En otra realización más, el gen esencial es un gen de aminoácido, por ejemplo, *serA* o *MetA*. Cualquier gen requerido para la supervivencia y/o el crecimiento celular puede ser dirigido, incluidos, entre otros, *cysE*, *glnA*, *ilvD*, *leuB*, *lysA*, *serA*, *metA*, *glyA*, *hisB*, *ilvA*, *pheA*, *proA*, *thrC*, *trpC*, *tyrA*, *thyA*, *uraA*, *dapA*, *dapB*, *dapD*, *dapE*, *dapF*, *flhD*, *metB*, *metC*, *proAB* y *thi1*, siempre que el producto génico de tipo natural correspondiente no se produzca en la bacteria. La **Tabla 18** enumera genes bacterianos de ejemplo que se pueden alterar o eliminar para producir una cepa auxotrófica. Estos incluyen, pero sin limitación, genes necesarios para la síntesis de oligonucleótidos, síntesis de aminoácidos y síntesis de la pared celular.

Tabla 18. Ejemplos no limitantes de genes bacterianos útiles para la generación de un auxótrofo

Aminoácido	Oligonucleótido	Pared celular
<i>cysE</i>	<i>thyA</i>	<i>dapA</i>
<i>glnA</i>	<i>uraA</i>	<i>dapB</i>
<i>ilvD</i>		<i>dapD</i>
<i>leuB</i>		<i>dapE</i>
<i>lysA</i>		<i>dapF</i>
<i>serA</i>		
<i>metA</i>		
<i>glyA</i>		
<i>hisB</i>		
<i>ilvA</i>		
<i>pheA</i>		
<i>proA</i>		
<i>thrC</i>		
<i>trpC</i>		
<i>tyrA</i>		

La Tabla 19 muestra la supervivencia de varios auxótrofos de aminoácidos en el intestino del ratón, detectados 24 horas y 48 horas después de la administración por sonda. Estos auxótrofos se generaron usando BW25113, una cepa de *E. coli* que no es Nissle.

Tabla 19. Supervivencia de auxótrofos de aminoácidos en el intestino de ratón

Gen	Auxótrofo de AA	Preadministración por sonda	24 horas	48 horas
<i>argA</i>	Arginina	Presente	Presente	Ausente
<i>cysE</i>	Cisteína	Presente	Presente	Ausente
<i>glnA</i>	Glutamina	Presente	Presente	Ausente
<i>glyA</i>	Glicina	Presente	Presente	Ausente
<i>hisB</i>	Histidina	Presente	Presente	Presente
<i>ilvA</i>	Isoleucina	Presente	Presente	Ausente
<i>leuB</i>	Leucina	Presente	Presente	Ausente
<i>lysA</i>	Lisina	Presente	Presente	Ausente
<i>metA</i>	Metionina	Presente	Presente	Presente
<i>pheA</i>	Fenilalanina	Presente	Presente	Presente
<i>proA</i>	Prolina	Presente	Presente	Ausente
<i>serA</i>	Serina	Presente	Presente	Presente
<i>thrC</i>	Treonina	Presente	Presente	Presente
<i>trpC</i>	Triptófano	Presente	Presente	Presente
<i>tyrA</i>	Tirosina	Presente	Presente	Presente

ilvD	Valina/Isoleucina/Leucina	Presente	Presente	Ausente
thyA	Tiamina	Presente	Presente	Ausente
uraA	Uracilo	Presente	Ausente	Ausente
flhD	FlhD	Presente	Presente	Presente

Por ejemplo, la timina es un ácido nucleico necesario para el crecimiento de células bacterianas; en su ausencia, las bacterias sufren la muerte celular. El gen *thyA* codifica la timidilato sintetasa, una enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de timina al convertir dUMP en dTMP (Sat et al., 2003). En algunas realizaciones, la célula bacteriana de la divulgación es un auxótrofo de *thyA* en el que el gen *thyA* está eliminado y/o reemplazado por un gen no relacionado. Un auxótrofo de *thyA* puede crecer sólo cuando están presentes cantidades suficientes de timina, por ejemplo, añadiendo timina al medio de crecimiento *in vitro*, o en presencia de niveles elevados de timina que se encuentran de forma natural en el intestino humano *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula bacteriana de la divulgación es auxotrófica en un gen que se complementa cuando la bacteria está presente en el intestino de los mamíferos. Sin cantidades suficientes de timina, el auxótrofo de *thyA* muere. En algunas realizaciones, la modificación auxotrófica se usa para asegurar que la célula bacteriana no sobreviva en ausencia del producto génico auxotrófico (por ejemplo, fuera del intestino).

El ácido diaminopimélico (DAP) es un aminoácido sintetizado dentro de la vía de biosíntesis de la lisina y es necesario para el crecimiento de la pared celular bacteriana (Meadow et al, 1959; Clarkson et al, 1971). En algunas realizaciones, cualquiera de las bacterias manipuladas genéticamente descritas en esta invención es un auxótrofo *dapD* en el que *dapD* se elimina y/o se reemplaza con un gen no relacionado. Un auxótrofo de *dapD* puede crecer sólo cuando están presentes cantidades suficientes de DAP, por ejemplo, añadiendo DAP al medio de crecimiento *in vitro*, o en presencia de niveles elevados de DAP que se encuentran de forma natural en el intestino humano *in vivo*. Sin cantidades suficientes de DAP, el auxótrofo de *dapD* muere. En algunas realizaciones, la modificación auxotrófica se usa para asegurar que la célula bacteriana no sobreviva en ausencia del producto génico auxotrófico (por ejemplo, fuera del intestino).

En otras realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente de la presente descripción es un auxótrofo de *uraA* en el que *uraA* se elimina y/o se reemplaza con un gen no relacionado. El gen *uraA* codifica UraA, un transportador unido a la membrana que facilita la captación y el posterior metabolismo de la pirimidin uracilo (Andersen et al., 1995). Un auxótrofo de *uraA* sólo puede crecer cuando están presentes cantidades suficientes de uracilo, por ejemplo, añadiendo uracilo al medio de crecimiento *in vitro*, o en presencia de niveles elevados de uracilo que se encuentran de forma natural en el intestino humano *in vivo*. Sin cantidades suficientes de uracilo, el auxótrofo de *uraA* muere. En algunas realizaciones, se utilizan modificaciones auxotróficas para asegurar que las bacterias no sobrevivan en ausencia del producto génico auxotrófico (por ejemplo, fuera del intestino).

En las comunidades complejas, es posible que las bacterias compartan ADN. En circunstancias muy raras, una cepa bacteriana auxotrófica puede recibir ADN de una cepa no auxotrófica, que repara la delección genómica y rescata permanentemente al auxótrofo. Por lo tanto, diseñar una cepa bacteriana con más de un auxótrofo puede disminuir en gran medida la probabilidad de que la transferencia de ADN ocurra suficientes veces para rescatar la auxotrofia. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden una delección o mutación en dos o más genes necesarios para la supervivencia y/o el crecimiento celular.

Otros ejemplos de genes esenciales incluyen, pero no se limitan a: *yhbV*, *yagG*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *fold*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *pgsA*, *yefM*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *tadA*, *acpS*, *era*, *rnc*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *chpR*, *lgt*, *fbaA*, *pgk*, *yqgD*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *ygiT*, *pare*, *ribB*, *cca*, *ygiD*, *tdcF*, *yraL*, *yihA*, *ftsN*, *murl*, *murB*, *birA*, *secE*, *nusG*, *rplJ*, *rplL*, *rpoB*, *rpoC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *alsK*, *groS*, *psd*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *chpS*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC*, *ribF*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *yabQ*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *infB*, *nusA*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *yrbB*, *yrbK*, *yhbN*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *yrnC*, *def*, *fmt*, *rplQ*, *rpoA*, *rpsD*, *rpsK*, *rpsM*, *entD*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *hleB*, *rpoE*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *csrA*, *ispF*, *ispD*, *rplW*, *rplD*, *rplC*, *rpsJ*, *fusA*, *rpsG*, *rpsL*, *trpS*, *yrfF*, *asd*, *rpoH*, *ftsX*, *ftsE*, *ftsY*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *rfaK*, *kdtA*, *coaD*, *rpmB*, *dfp*, *dut*, *gmk*, *spot*, *gyrB*, *dnaN*, *dnaA*, *rpmH*, *mnpA*, *yidC*, *tnaB*, *glmS*, *glmU*, *wzyE*, *hemD*, *hemC*, *yigP*, *ubiB*, *ubiD*, *hemG*, *secY*, *rplO*, *rpmD*, *rpsE*, *rplR*, *rplF*, *rpsH*, *rpsN*, *rplE*, *rplX*, *rplN*, *rpsQ*, *rpmC*, *rplP*, *rpsC*, *rplV*, *rpsS*, *rplB*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *yafF*, *tsf*, *pyrH*, *ola*, *rlpB*, *leuS*, *Int*, *glnS*, *jldA*, *cydA*, *infA*, *cydC*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *purB*, *ymfK*, *minE*, *mind*, *pth*, *rsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *racR*, *dica*, *ydfB*, *tyrS*, *ribC*, *ydiL*, *pheT*, *pheS*, *yhhQ*, *bcsB*, *glyQ*, *yibJ* y *gpsA*. Los expertos en la técnica conocen otros genes esenciales.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente de la presente descripción es una célula bacteriana sintética con gen esencial dependiente de ligando gen esencial (SLiDE). Las células bacterianas SLiDE son auxótrofos sintéticos con una mutación en uno o más genes esenciales que solo crecen en presencia de un ligando en particular (véase Lopez y Anderson, "Synthetic Auxotrophs with Ligand-Dependent Essential Genes for a BL21 (DE3) Biosafety Strain" ACS Synth Biol 2015; 4 (12): 1279-1286).

En algunas realizaciones, la célula bacteriana SLiDE comprende una mutación en un gen esencial. En algunas realizaciones, el gen esencial se selecciona del grupo que consiste en *pheS*, *dnaN*, *tyrS*, *metG* y *adk*. En algunas realizaciones, el gen esencial es *dnaN* que comprende una o más de las siguientes mutaciones: H191N, R240C, I317S, F319V, L340T, V347I y S345C. En algunas realizaciones, el gen esencial es *dnaN* que comprende las mutaciones H191N, R240C, I317S, F319V, L340T, V347I y S345C. En algunas realizaciones, el gen esencial es *pheS* que comprende una o más de las siguientes mutaciones: F125G, P183T, P184A, R186A e I188L. En algunas realizaciones, el gen esencial es *pheS* que comprende las mutaciones F125G, P183T, P184A, R186A e I188L. En algunas realizaciones, el gen esencial es *tyrS* que comprende una o más de las siguientes mutaciones: L36V, C38A y F40G. En algunas realizaciones, el gen esencial es *tyrS* que comprende las mutaciones L36V, C38A y F40G. En algunas realizaciones, el gen esencial es *metG* que comprende una o más de las siguientes mutaciones: E45Q, N47R, I49G y A51C. En algunas realizaciones, el gen esencial es *metG* que comprende las mutaciones E45Q, N47R, I49G y A51C. En algunas realizaciones, el gen esencial es *adk* que comprende una o más de las siguientes mutaciones: I4L, L5I y L6G. En algunas realizaciones, el gen esencial es *adk* que comprende las mutaciones I4L, L5I y L6G.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente se complementa con un ligando. En algunas realizaciones, el ligando se selecciona del grupo que consiste en benzotiazol, indol, 2-aminobenzotiazol, ácido indol-3-butírico, ácido indol-3-acético y éster metílico de L-histidina. Por ejemplo, las células bacterianas que comprenden mutaciones en *metG* (E45Q, N47R, I49G y A51C) se complementan con benzotiazol, indol, 2-aminobenzotiazol, ácido indol-3-butírico, ácido indol-3-acético o éster metílico de L-histidina.

Las células bacterianas que comprenden mutaciones en *dnaN* (H191N, R240C, I317S, F319V, L340T, V347I y S345C) se complementan con benzotiazol, indol o 2-aminobenzotiazol. Las células bacterianas que comprenden mutaciones en *pheS* (F125G, P183T, P184A, R186A e I188L) se complementan con benzotiazol o 2-aminobenzotiazol.

5 Las células bacterianas que comprenden mutaciones en *tyrS* (L36V, C38A y F40G) se complementan con benzotiazol o 2-aminobenzotiazol. Las células bacterianas que comprenden mutaciones en *adk* (I4L, L5I y L6G) se complementan con benzotiazol o indol.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente comprende más de un gen esencial mutante que hace que sea auxotrófico a un ligando. En algunas realizaciones, la

10 célula bacteriana comprende mutaciones en dos genes esenciales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula bacteriana comprende mutaciones en *tyrS* (L36V, C38A y F40G) y *metG* (E45Q, N47R, I49G y A51C). En otras realizaciones, la célula bacteriana comprende mutaciones en tres genes esenciales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula

15 bacteriana comprende mutaciones en *tyrS* (L36V, C38A y F40G), *metG* (E45Q, N47R, I49G y A51C) y *pheS* (F125G, P183T, P184A, R186A e I188L).

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente es un auxótrofo condicional cuyo gen o genes esenciales se sustituyen utilizando el sistema de arabinosa que se

20 muestra en las **figuras 85-86**.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente de la divulgación es un auxótrofo y también comprende circuitos de interruptores de destrucción, tales como cualquiera de los componentes y sistemas de interruptores de destrucción descritos en esta

25 invención. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente pueden comprender una delección o mutación en un gen esencial necesario para la supervivencia y/o el crecimiento celular, por ejemplo, en un gen de síntesis de ADN, por ejemplo, *thyA*, el gen de síntesis de la pared celular, por ejemplo, *dapA* y/o un gen de aminoácidos, por ejemplo, *serA* o *MetA* y también puede comprender un gen de toxina que está regulado por uno o más activadores

30 transcripcionales que se expresan en respuesta a una condición o condiciones y/o señal o señales ambientales (tales como el sistema de arabinosa descrito) o regulado por una o más recombinasas que se expresan al detectar una condición o condiciones y/o señal o señales ambientales exógenas (tales como los sistemas de recombinasas descritos en esta invención). Otras realizaciones se describen en Wright et al., "GeneGuard: A Modular

35 Plasmid System Designed for Biosafety", ACS Synth Biol, 2015; 4 (3): 307-316).

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente de la descripción es un auxótrofo y comprende también un circuito interruptor de destrucción, tal como cualquiera de los componentes interruptores y sistemas de destrucción descritos en esta invención, así

40 como otro sistema de bioseguridad, tal como un origen condicional de la replicación (Wright et al., 2015). En una realización, una bacteria manipulada genéticamente, comprende una o más construcciones de bioseguridad integradas en el cromosoma bacteriano en combinación con uno o más plásmidos de bioseguridad. En algunas realizaciones, el plásmido comprende un origen de replicación condicional (COR, por sus siglas en inglés), para el cual la proteína iniciadora de la replicación del plásmido se proporciona en trans, es decir, está codificada por la construcción de bioseguridad integrada cromosómicamente. En

45 algunas realizaciones, la construcción integrada cromosómicamente se introduce adicionalmente en el huésped de manera que se produce una auxotrofia (por ejemplo, auxotrofia *dapA* o *thyA*), que a su vez se complementa con un producto génico expresado a partir de la construcción del plásmido de bioseguridad. En algunas realizaciones, el

50 plásmido de bioseguridad codifica además una toxina de amplio espectro (por ejemplo, Kis), mientras que la construcción de bioseguridad integrada codifica una antitoxina (por ejemplo, anti Kis), lo que permite la propagación del plásmido en la célula bacteriana que contiene

ambas construcciones. Sin desear limitarse a la teoría, este mecanismo funciona para seleccionar contra la propagación plasmídica haciendo que el propio ADN del plásmido sea desventajoso para mantener por una bacteria de tipo natural. Se muestra un ejemplo no limitante de tal sistema de bioseguridad se muestra en la **figura 61A**, la **figura 61B**, la **figura 61C** y la **figura 61D**.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de construcción de bioseguridad insertada cromosómicamente (a combinar con una construcción de bioseguridad basada en plásmidos) que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homóloga a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, o un fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de construcción de bioseguridad insertada cromosómicamente (a combinar con una construcción de bioseguridad basada en plásmidos) que codifica una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homóloga a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 86, 87, 88, o un fragmento funcional de las mismas.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de construcción de bioseguridad basada en cromosomas (a combinar con una construcción de bioseguridad basada en plásmidos) que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homóloga a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93, 94 o un fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de construcción de bioseguridad basada en cromosomas (a combinar con una construcción de bioseguridad basada en plásmidos) que codifica una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homóloga a la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93, 94 o un fragmento funcional de las mismas.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de construcción de bioseguridad basada en plásmidos (a combinar con una construcción de bioseguridad basada en cromosomas) que comprende una construcción de carga útil para el catabolismo de fenilalanina. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de PAL. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de PheP. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de LAAD. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de PAL y una o más copias de PheP. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de PAL y una o más copias de LAAD. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de LAAD y una o más copias de PheP. En algunas realizaciones, la construcción basada en plásmido comprende una o más copias de PAL y una o más copias de PheP y una o más copias de LAAD. En algunas realizaciones, la una o más cargas útiles plasmídicas que catabolizan fenilalanina (es decir, PAL, PheP y/o LAAD) están bajo el control de uno o más promotores constitutivos o inducibles como se describe en esta invención (por ejemplo, bajo

contenido de oxígeno, arabinosa, inducible por IPTG o una combinación de los mismos). En algunas realizaciones, el promotor es útil para la preinducción. En algunas realizaciones, el promotor es útil para la activación *in vivo*. En algunas realizaciones, el promotor es útil para la preinducción y la actividad *in vivo*. En algunas realizaciones, la construcción comprende dos o más promotores, algunos de los cuales son útiles para la preinducción y algunos de los cuales son útiles para la actividad *in vivo*.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de carga útil de construcción de bioseguridad basada en plásmidos al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homóloga a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 36, 37, 74, 95, 96, 98, 99, 100, 113 o un fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico de carga útil de construcción de bioseguridad basada en plásmidos que codifica un polipéptido que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % homóloga al polipéptido codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 36, 37, 74, 95, 96, 98, 99, 100, 113 o un fragmento funcional de las mismas.

La adición de un Phe-auxótrofo, también, puede tener utilidad para aumentar la velocidad de degradación de fenilalanina. Por ejemplo, la delección del gen *pheA* concede auxótrofo para fenilalanina. La desactivación de la producción de fenilalanina bacteriana endógena puede llevar al aumento de absorción del ambiente y, también, dar lugar a degradación aumentada de fenilalanina absorbida del ambiente.

Circuitos de Regulación Genética

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente comprende circuitos multicapa de regulación genética para expresar las construcciones descritas en esta invención (véanse, por ejemplo, Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/184.811).

Los circuitos de regulación genética son útiles para cribar las bacterias mutantes, que producen enzima metabolizadora de fenilalanina, o rescata un auxótrofo. En determinados casos, la divulgación proporciona procedimientos para seleccionar las bacterias manipuladas genéticamente, que producen uno o más genes de interés.

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por T7 polimerasa. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un primer gen, que codifica una T7 polimerasa, donde el primer gen se une de manera operativa con un promotor sensible a FNR; un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina, donde el segundo gen o el casete génico se une de manera operativa con un promotor T7, que se induce mediante la T7 polimerasa; y un tercer gen, que codifica un factor de inhibición, *lysY*, que es capaz de inhibir la T7 polimerasa. En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor sensible a FNR, y la enzima metabolizadora de fenilalanina, no se expresa. *LysY* se expresa de manera constitutiva (P-lac constitutivo) y, además, inhibe la T7 polimerasa. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, se expresa la polimerasa T7 en un nivel suficiente para superar la inhibición *lysY* y se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina. En algunos casos, el gen *lysY* se une de manera operativa con un sitio de unión FNR adicional. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza para activar la expresión de

polimerasa T7 como se ha descrito anteriormente y, también, inhibe la expresión *lysY*.

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por proteasa. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un primer gen, que codifica una mf-lon proteasa, donde el primer gen se une de manera operativa con un promotor sensible a FNR; un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina, que se une de manera operativa con una región reguladora Tet (TetO); y un tercer gen, que codifica una señal de degradación mf-lon, que se une a un represor Tet (TetR), donde el TetR es capaz de unirse con la región reguladora Tet y reprimir la expresión del segundo gen o el casete génico. La proteasa mf-lon es capaz de reconocer la señal de degradación mf-lon y de degradar el TetR. En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor sensible a FNR, el represor no se degrada y la enzima metabolizadora de fenilalanina, no se expresa. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, induciendo, de este modo, la expresión de la proteasa mf-lon. La proteasa mf-lon reconoce la señal de degradación mf-lon y degrada el TetR y se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina.

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por represor. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un primer gen, que codifica un primer represor, donde el primer gen se une de manera operativa con un promotor sensible a FNR; un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina, que se une de manera operativa con una primera región reguladora, que comprende un promotor constitutivo; y un tercer gen, que codifica un segundo represor, donde el segundo represor es capaz de unirse con la primera región reguladora y reprimir la expresión del segundo gen o el casete génico. El tercer gen se une de manera operativa con una segunda región reguladora, que comprende un promotor constitutivo, donde el primer represor es capaz de unirse con la segunda región reguladora e inhibir la expresión del segundo represor. En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor sensible a FNR, el primer represor no se expresa, el segundo represor se expresa y la enzima metabolizadora de fenilalanina, no se expresa. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, se expresa el primer represor, el segundo represor no se expresa y se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina.

Los ejemplos de represores útiles en estos casos incluyen, pero sin limitación, ArgR, TetR, ArsR, AscG, LacI, CscR, DeoR, DgoR, FruR, GalR, GatR, Cl, LexA, RafR, QacR y PtxS (documento US20030166191).

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por ARN regulador. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un primer gen, que codifica un ARN regulador, donde el primer gen se une de manera operativa con un promotor sensible a FNR y un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina. El segundo gen o el casete génico se une de manera operativa con un promotor constitutivo y, además, se une con una secuencia de nucleótidos capaz de producir una horquilla de ARNm, que inhibe la traducción de la enzima metabolizadora de fenilalanina. El ARN regulador es capaz de eliminar la horquilla de ARNm e inducir la traducción vía el sitio de unión al ribosoma. En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor sensible a FNR, el ARN regulador no se expresa y la horquilla de

ARNm impide que se traduzca la enzima metabolizadora de fenilalanina. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, se expresa el ARN regulador, se elimina la horquilla de ARNm y se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina.

5

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por CRISPR. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una proteína

10 Cas9; un primer gen, que codifica un ARN guía de CRISPR, donde el primer gen se une de manera operativa con un promotor sensible a FNR; un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina, donde el segundo gen o el casete génico se une de manera operativa con una región reguladora, que comprende un promotor constitutivo; y un tercer gen, que codifica un represor, que se une de manera operativa con

15 un promotor constitutivo, donde el represor es capaz de unirse con la región reguladora y reprimir la expresión del segundo gen o el casete génico. El tercer gen se une, además, con una secuencia diana CRISPR, que es capaz de unirse con el ARN guía de CRISPR, donde dicha unión con el ARN guía de CRISPR incluye la escisión mediante la proteína Cas9 e inhibe la expresión del represor. En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor

20 sensible a FNR, el ARN guía no se expresa, el represor se expresa y la enzima metabolizadora de fenilalanina, no se expresa. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, se expresa el ARN guía, el represor no se expresa y se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina.

25 En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por recombinasa. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un primer gen, que codifica una recombinasa, donde el primer gen se une de manera operativa con un

30 promotor sensible a FNR y un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina, que se une de manera operativa con un promotor constitutivo. El segundo gen o el casete génico se invierte en orientación (3' hacia 5') y se flanquea por los sitios de unión de recombinasa, y la recombinasa es capaz de unirse con sitios de unión de recombinasa para inducir la expresión del segundo gen o el casete génico

35 revertiendo su orientación (5' hacia 3'). En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor sensible a FNR, la recombinasa no se expresa, el gen o casete génico permanece en la orientación 3' hacia 5' y se produce la enzima metabolizadora de fenilalanina. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, la recombinasa se expresa, el gen o el casete génico revierte a la orientación 5' hacia 3' y se produce una enzima funcional, que metaboliza fenilalanina (véase, por ejemplo, la **figura 82**).

40

En algunos casos, la divulgación proporciona bacterias manipuladas genéticamente, que comprenden un gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de

45 fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH), y un circuito de regulación genética regulado por polimerasa y recombinasa. Por ejemplo, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un primer gen, que codifica una recombinasa, donde el primer gen se une de manera operativa con un promotor sensible a FNR; un segundo gen o un casete génico para producir una enzima metabolizadora de fenilalanina, que se une de manera operativa con un

50 promotor T7; y un tercer gen, que codifica una T7 polimerasa, donde la polimerasa T7 es capaz de unirse con el promotor T7 e inducir la expresión de la enzima metabolizadora de fenilalanina. El tercer gen, que codifica la polimerasa T7 se invierte en orientación (3' hacia 5') y se flanquea por los sitios de unión de recombinasa, y la recombinasa es capaz de

unirse con sitios de unión de recombinasa para inducir la expresión del gen polimerasa T7 revertiendo su orientación (5' hacia 3'). En presencia de oxígeno, FNR no se une con el promotor sensible a FNR, la recombinasa no se expresa, el gen polimerasa T7 permanece en la orientación 3' hacia 5' y no se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina. En ausencia de oxígeno, FNR se dimeriza y se une con el promotor sensible a FNR, la recombinasa se expresa, el gen polimerasa T7 revierte la orientación 5' hacia 3' y se expresa la enzima metabolizadora de fenilalanina (véase, por ejemplo, la **figura 83**).

Los circuitos génicos sintéticos, que se expresan sobre plásmidos, pueden funcionar bien a corto plazo, pero pierden su habilidad y/o función a largo plazo (Danino et al., 2015). En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden circuitos estables para expresar genes de interés durante periodos prolongados. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente son capaces de producir una enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH) y comprenden, además, un sistema de toxina antitoxina, que produce simultáneamente una toxina (hok) y una antitoxina efímera (sok), donde la pérdida del plásmido causa la muerte celular por la toxina longeva (Danino et al., 2015). En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden, además, *alp 7* de plásmido pL20 de *B. subtilis* y producen filamentos, que son capaces de empujar los plásmidos a los polos de las células para asegurar la secreción igual durante la división celular (Danino et al., 2015).

Dependencia mutua de huésped-plásmido

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención comprenden, además, un plásmido, que se ha modificado para crear una dependencia mutua de huésped-plásmido. En determinadas realizaciones, la plataforma de huésped-plásmido dependientes mutuamente es GeneGuard (Wright et al., 2015). En algunas realizaciones, el plásmido GeneGuard comprende (i) una fuente condicional de replicación, donde el requisito de proteína iniciadora de replicación se proporciona en *trans*; (ii) una modificación auxótrofa, que se rescata por el huésped utilizando translocación genómica y, también, es compatible para su uso en un medio rico; y/o (iii) una secuencia de ácido nucleico, que codifica una toxina de espectro amplio. Se puede utilizar el gen de toxina para la selección contra el plásmido extendido por la producción desfavorable de ADN de plásmido en sí para cepas, que no expresan la antitoxina (por ejemplo, una bacteria de tipo natural). En algunas realizaciones, el plásmido GeneGuard es estable durante al menos 100 generaciones sin selección antibiótica. En algunas realizaciones, el plásmido GeneGuard no altera el crecimiento del huésped. El plásmido GeneGuard se usa para reducir enormemente la propagación involuntaria de plásmido en las bacterias manipuladas genéticamente de la invención.

La plataforma de huésped-plásmido dependientes mutuamente se puede utilizar sola o en combinación con otros mecanismos de bioseguridad, tales como descritos en esta invención (por ejemplo, interruptores de destrucción, auxótrofos). En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un plásmido GeneGuard. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un plásmido GeneGuard y/o uno o más interruptores de destrucción. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un plásmido GeneGuard y/o uno o más auxótrofos. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden un plásmido GeneGuard, uno o más interruptores de destrucción y/o uno o más auxótrofos.

Interruptor de destrucción

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención

comprenden, también, un interruptor de destrucción (véanse, por ejemplo, Solicitudes Provisionales de EE.UU. Números 62/183.935 y 62/263.329). El interruptor de destrucción sirve para matar activamente bacterias manipuladas genéticamente en respuesta a un estímulo externo. Al contrario que una mutación auxótrofa, donde bacteria muere debido a falta de un nutriente esencial para la supervivencia, el interruptor de destrucción se activa mediante un factor particular en el ambiente, que induce la producción de moléculas tóxicas dentro del microbio, que causa muerte celular.

Las bacterias, que comprenden interruptores de destrucción, se han manipulada con fines de investigación *in vitro*, por ejemplo, para limitar la propagación de un microorganismo, que produce biocombustible, fuera de un ambiente de laboratorio. Las bacterias manipuladas para la administración *in vivo* para tratar una enfermedad se pueden programar, también, para morir en un tiempo específico después de la expresión y la administración de uno o más genes heterólogos, por ejemplo, una enzima metabolizadora de fenilalanina, o después de que el sujeto haya experimentado el efecto terapéutico. Por ejemplo, en algunos casos, el interruptor de destrucción se activa para matar a la bacteria después de un periodo de tiempo después de la expresión dependiente de nivel de oxígeno de la enzima metabolizadora de fenilalanina (por ejemplo, PAL o PAH) y/o el gen transportador de fenilalanina. En algunos casos, el interruptor de destrucción se activa en un modo retrasado después de la expresión dependiente de nivel de oxígeno de la enzima metabolizadora de fenilalanina, y/o el gen transportador de fenilalanina. Como alternativa, las bacterias pueden modificarse para morir después de que las bacterias se han propagado fuera de un sitio de enfermedad. Específicamente, puede ser útil para prevenir la colonización a largo plazo de sujetos por el microorganismo, la propagación del microorganismo fuera del área de interés (por ejemplo, fuera de los intestinos) dentro del sujeto, o la propagación del microorganismo fuera del sujeto en el ambiente (por ejemplo, la propagación al ambiente a través de la deposición del sujeto). Los ejemplos de tales toxinas, que se pueden utilizar en interruptores de destrucción, incluyen, pero sin limitación, bacteriocinas, lisinas y otras moléculas, que causan muerte celular mediante lisis de membranas celulares, degradación de ADN celular u otros mecanismos. Tales toxinas se pueden utilizar individualmente o en combinación. Los interruptores, que controlan su producción pueden tener base en, por ejemplo, activación transcripcional (interruptores de conmutación; véanse, por ejemplo, Gardner et al., 2000), traducción (riborreguladores), o recombinación de ADN (interruptores basados en recombinasa) y pueden detectar el estímulo ambiental, tal como anaerobiosis o especies reactivas de oxígeno. Estos interruptores se pueden activar mediante un factor ambiental único o pueden necesitar varios activadores en configuraciones lógicas AND, OR, NAND y NOR para inducir la muerte celular. Por ejemplo, un interruptor de riborregulador AND se activa mediante tetraciclina, isopropil β -D-1- tiogalactopiranosido (IPTG) y arabinosa para la expresión de lisinas, que permeabiliza la membrana celular y mata la célula. IPTG induce la expresión de los ARNm de endolisina y holina, que se desreprimieron a continuación mediante la adición de arabinosa y tetraciclina. Todos los tres inductores tienen que estar presentes para causar la muerte celular. Los ejemplos de interruptores de destrucción se conocen en la técnica (Callura et al., 2010).

Los interruptores de destrucción se pueden modificar de tal modo que se produce una toxina en respuesta a una condición ambiental o una señal externa (por ejemplo, bacteria se mata en respuesta a una señal externa) o, como alternativa, diseñados de tal modo, que se produce una toxina, cuando ya no existe más una condición ambiental o se detiene una señal externa.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación se programan más para morir después de detectar una señal ambiental exógena, por ejemplo, en un entorno de bajo contenido de oxígeno. En algunas

realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la presente divulgación comprenden uno o más genes, que codifican una o más recombinasas, cuya expresión se induce en respuesta a una condición o señal ambiental y causa uno o más sucesos de recombinación, que básicamente lleva a la expresión de una toxina, que mata la célula. En algunas realizaciones, al menos un suceso de recombinación es la vuelta de un gen heterólogo invertido, que codifica una toxina bacteriana, que, a continuación, se expresa de manera constitutiva después del giro utilizando la primera recombinasa. En una realización, la expresión constitutiva de la toxina bacteriana mata las bacterias manipuladas genéticamente. En estos tipos de sistemas de interruptores de destrucción, cuando la célula bacteriana manipulada detecta la condición ambiental exógena y expresa el gen heterólogo de interés, la célula bacteriana recombinante ya no es viable.

En otra realización, donde la bacterias manipuladas genéticamente de la presente divulgación expresan una o más recombinasas en respuesta a una condición o una señal ambiental, que causa al menos un suceso de recombinación, la bacteria manipulada genéticamente expresa, además, un gen heterólogo, que codifica una antitoxina, en respuesta a una condición o una señal ambiental exógena. En algunas realizaciones, al menos un suceso de recombinación es la vuelta de un gen heterólogo invertido, que codifica una toxina bacteriana, utilizando una primera recombinasa. En una realización, el gen heterólogo invertido, que codifica la toxina bacteriana, está ubicado entre una secuencia de reconocimiento de primera recombinasa directa y una secuencia de reconocimiento de primera recombinasa reversa. En una realización, el gen heterólogo, que codifica la toxina bacteriana, se expresa de manera constitutiva después de su giro mediante la primera recombinasa. En una realización, la antitoxina inhibe la actividad de la toxina, retrasando, de este modo, la muerte de la bacteria manipulada genéticamente. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente se mata utilizando la toxina bacteriana, cuando el gen heterólogo, que codifica la antitoxina ya no se expresa, cuando la condición ambiental exógena ya no está presente.

En otra realización, al menos un suceso de recombinación es un giro de un gen heterólogo invertido, que codifica una segunda recombinasa, mediante una primera recombinasa, seguido del giro de un gen heterólogo invertido, que codifica una toxina bacteriana, mediante la segunda recombinasa. En una realización, el gen heterólogo invertido, que codifica la segunda recombinasa, está ubicado entre una secuencia de reconocimiento de primera recombinasa directa y una secuencia de reconocimiento de primera recombinasa reversa. En una realización, el gen heterólogo invertido, que codifica la toxina bacteriana, está ubicado entre una secuencia de reconocimiento de segunda recombinasa directa y una secuencia de reconocimiento de segunda recombinasa reversa. En una realización, el gen heterólogo, que codifica la segunda recombinasa, se expresa de manera constitutiva después de su giro mediante la primera recombinasa. En una realización, el gen heterólogo, que codifica la toxina bacteriana, se expresa de manera constitutiva después de su giro mediante la segunda recombinasa. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente se mata utilizando la toxina bacteriana. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente se expresa aun más un gen heterólogo, que codifica una antitoxina, en respuesta a una condición ambiental exógena. En una realización, la antitoxina inhibe la actividad de la toxina, cuando está presente la condición ambiental exógena, retrasando, de este modo, la muerte de la bacteria manipulada genéticamente. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente se mata utilizando la toxina bacteriana, cuando el gen heterólogo, que codifica la antitoxina ya no se expresa, cuando la condición ambiental exógena ya no está presente.

En una realización, al menos un suceso de recombinación es un giro de un gen heterólogo invertido, que codifica una segunda recombinasa, mediante una primera recombinasa,

seguido del giro de un gen heterólogo invertido, que codifica una tercera recombinasa, seguido del giro de un gen heterólogo invertido, que codifica una toxina bacteriana, utilizando la tercera recombinasa.

- 5 En una realización, al menos un suceso de recombinación es el giro de un gen heterólogo invertido, que codifica una primera enzima de escisión, utilizando una primera recombinasa. En una realización, el gen heterólogo invertido, que codifica la primera enzima de escisión, está ubicado entre una secuencia de reconocimiento de primera recombinasa directa y una secuencia de reconocimiento de primera recombinasa reversa. En una realización, el gen
- 10 heterólogo, que codifica la primera enzima de escisión, se expresa de manera constitutiva después de su giro mediante la primera recombinasa. En una realización, la primera enzima de escisión elimina un primer gen esencial. En una realización, la célula bacteriana recombinante programada no es viable después de que se elimina el primer gen esencial.
- 15 En una realización, la primera recombinasa, además, da un giro a un gen heterólogo invertido, que codifica una segunda enzima de escisión. En una realización, el gen heterólogo invertido, que codifica la segunda enzima de escisión, está ubicado entre una secuencia de reconocimiento de segunda recombinasa directa y una secuencia de reconocimiento de segunda recombinasa reversa. En una realización, el gen heterólogo,
- 20 que codifica la segunda enzima de escisión, se expresa de manera constitutiva después de su giro mediante la primera recombinasa. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente muere o ya no es viable, cuando se eliminan ambos el primer gen esencial y el segundo gen esencial. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente muere o ya no es viable, cuando se elimina el primer gen esencial o se elimina el segundo gen
- 25 esencial utilizando la primera recombinasa.

En una realización, la bacteria manipulada genéticamente muere después de que ocurra al menos un suceso de recombinación. En otra realización, la bacteria manipulada genéticamente ya no es viable después de que ocurra al menos un suceso de

30 recombinación.

En cualquiera de estas realizaciones, la recombinasa puede ser una recombinasa seleccionada del grupo, que consiste en: Bxb1, PhiC31, TP901, Bxb1, PhiC31, TP901, HK022, HP1, R4, Int1, Int2, Int3, Int4, Int5, Int6, Int7, Int8, Int9, Int10, Int11, Int12, Int13,

35 Int14, Int15, Int16, Int17, Int18, Int19, Int20, Int21, Int22, Int23, Int24, Int25, Int26, Int27, Int28, Int29, Int30, Int31, Int32, Int33 y Int34, o un fragmento activo biológicamente de la misma.

En los circuitos de interruptores de destrucción descritos anteriormente se produce una

40 toxina en presencia de un factor o una señal ambiental. En otro aspecto del sistema de interruptores de destrucción, se puede reprimir una toxina en presencia de un factor ambiental (*es decir*, no se produce) y, a continuación, se produce, cuando la condición ambiental o la señal externa ya no está presente. Tales interruptores de destrucción se llaman interruptores de destrucción basados en represión y representan sistemas, donde las

45 células bacterianas solamente son viables en presencia de un factor o una señal externo, tal como arabinosa u otro azúcar. Los diseños de interruptores de destrucción, donde se reprime la toxina en presencia de un factor o una señal externo (y se activa cuando se elimina la señal externa), se muestran en las **figuras 43-47**. La divulgación proporciona células bacterianas, que expresan uno o más genes heterólogos al detectar arabinosa u otro

50 azúcar en el ambiente exógeno. En este aspecto, las células bacterianas recombinantes contienen el gen *araC*, que codifica el factor de transcripción AraC, así como también, uno o más genes bajo el control del promotor *araBAD* (ParaBAD). En ausencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC adopta una conformación, que reprime la transcripción de

genes bajo el control del promotor araBAD. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC se somete a un cambio conformacional, que le permite unirse a y activar el promotor araBAD, que induce la expresión del gen deseado, por ejemplo TetR, que reprime la expresión de un gen de toxina. En esta realización, el gen de toxina se reprime en presencia de arabinosa u otro azúcar. En un ambiente, donde arabinosa no está presente, el gen TetR no se activa y se expresa la toxina, matando, de este modo a las bacterias. El sistema de arabinosa se puede utilizar, también, para expresar un gen esencial, donde el gen esencial se expresa solamente en presencia de arabinosa u otro azúcar y no se expresa, cuando arabinosa u otro azúcar está ausente en el ambiente.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, donde uno o más genes se expresan al detectar arabinosa en el ambiente exógeno, el uno o más genes heterólogos están directamente o indirectamente bajo el control del promotor araBAD. En algunas realizaciones, se selecciona el gen heterólogo expresado de uno o más de los siguientes: un gen terapéutico heterólogo, un gen heterólogo, que codifica una antitoxina, un gen heterólogo, que codifica una proteína o un polipéptido represor, por ejemplo, un represor TetR, un gen heterólogo, que codifica una proteína esencial, que no se encuentra en la célula bacteriana, y/o un heterólogo, que codifica una proteína o un polipéptido regulador.

Se conocen en la técnica los promotores inducibles por arabinosa, que incluyen P_{ara} , P_{araB} , P_{araC} y P_{araBAD} . En una realización, el promotor inducible por arabinosa es de *E. coli*. En algunas realizaciones, el promotor P_{araC} y el promotor P_{araBAD} funcionan como un promotor bidireccional, donde el promotor P_{araBAD} controla la expresión de uno o más genes heterólogos en una dirección, y el P_{araC} (en proximidad cercana a, y en la cadena opuesta al promotor P_{araBAD}), controla la expresión de uno o más genes heterólogos en la otra dirección. En presencia de arabinosa, se induce la transcripción de ambos genes heterólogos de ambos promotores. Sin embargo, en ausencia de arabinosa, no se induce la transcripción de ambos genes heterólogos de ambos promotores.

En una realización de ejemplo de la divulgación, las bacterias manipuladas genéticamente de la presente divulgación contienen un interruptor de destrucción, que tiene al menos las siguiente secuencias: un promotor P_{araBAD} unido de manera operativa con un gen heterólogo, que codifica una proteína represora de tetraciclina (TetR), un promotor P_{araC} , que se une de manera operativa con un gen heterólogo, que codifica el factor de transcripción AraC, y un gen heterólogo, que codifica una toxina bacteriana, que se une de manera operativa con un promotor, que se reprime mediante la proteína TetR. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC activa el promotor P_{araBAD} , que activa la transcripción de la proteína TetR, que, a su vez, reprime la transcripción de la toxina. Sin embargo, en ausencia de arabinosa, AraC reprime la transcripción para el promotor P_{araBAD} y no se expresa ninguna proteína TetR. En este caso, se activa la expresión del gen de toxina heteróloga, y se expresa la toxina. La toxina se acumula en la célula bacteriana recombinante y la célula bacteriana recombinante se muere. En una realización, el gen *araC*, que codifica el factor de transcripción AraC está bajo el control de un promotor constitutivo y, por lo tanto, se expresa de manera constitutiva.

En una realización de la divulgación, la bacteria manipulada genéticamente comprende, además, una antitoxina bajo el control de un promotor constitutivo. En esta situación, en presencia de arabinosa, la toxina no se expresa debido a la represión mediante proteína TetR y se acumula la proteína de antitoxina en la célula. Sin embargo, en ausencia de arabinosa, la proteína TetR no se expresa y se induce la expresión de la toxina. La toxina empieza a acumularse dentro de la célula bacteriana recombinante. La célula bacteriana recombinante ya no es viable, cuando la proteína de toxina está presente o en cantidades iguales o mayores que las de la proteína de antitoxina en la célula y la célula bacteriana

recombinante morirá debido a la toxina.

En otra realización de la divulgación, la bacteria manipulada genéticamente comprende, además, una antitoxina bajo el control de un promotor P_{araBAD} . En esta situación, en presencia de arabinosa, TetR y la antitoxina se expresan, la antitoxina se acumula en la célula y la toxina no se expresa debido a la represión mediante proteína TetR. Sin embargo, en ausencia de arabinosa, ambos la proteína TetR y la antitoxina no se expresan y se induce la expresión de la toxina. La toxina empieza a acumularse dentro de la célula bacteriana recombinante. La célula bacteriana recombinante ya no es viable, cuando la proteína de toxina se expresa y la célula bacteriana recombinante morirá debido a la toxina.

En otra realización de ejemplo de la divulgación, las bacterias manipuladas genéticamente de la presente divulgación contienen un interruptor de destrucción, que tiene al menos las siguientes secuencias: un promotor P_{araBAD} unido de manera operativa con un gen heterólogo, que codifica un polipéptido esencial, que no se encuentra en la célula bacteriana recombinante (y es necesario para supervivencia), y un promotor P_{araC} unido de manera operativa con un gen heterólogo, que codifica el factor de transcripción AraC. En presencia de arabinosa, el factor de transcripción AraC activa el promotor P_{araBAD} , que activa la transcripción del gen heterólogo, que codifica el polipéptido esencial, permitiendo la supervivencia de la célula bacteriana recombinante. Sin embargo, en ausencia de arabinosa, AraC reprime la transcripción para el promotor P_{araBAD} y la proteína esencial, necesaria para supervivencia, no se expresa. En este caso, la célula bacteriana recombinante muere en ausencia de arabinosa. En algunas realizaciones, la secuencia de promotor P_{araBAD} , que se une de manera operativa con un gen heterólogo, que codifica un polipéptido esencial, que no se encuentra en la célula bacteriana recombinante, puede estar presente en la célula bacteriana conjuntamente con el sistema de interruptores de destrucción TetR/toxina descrito directamente anteriormente. En algunas realizaciones, la secuencia de promotor P_{araBAD} , que se une de manera operativa con un gen heterólogo, que codifica un polipéptido esencial, que no se encuentra en la célula bacteriana recombinante, puede estar presente en la célula bacteriana conjuntamente con el sistema de interruptores de destrucción TetR/toxina/antitoxina descrito directamente anteriormente.

En otras realizaciones más, las bacterias pueden comprender un sistema estable de plásmido con un plásmido, que produce ambos una antitoxina efímera y una toxina longeva. En este sistema, la célula bacteriana produce cantidades iguales de toxina y antitoxina para neutralizar la toxina. Sin embargo, si/cuando la célula pierde del plásmido, la antitoxina efímera empieza a descomponerse. Cuando la antitoxina se descompone completamente, la célula muere como un resultado de que la toxina longeva la mata.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas de la presente divulgación comprenden, además, el uno o más genes que codifican los componentes de cualquiera de los circuitos de interruptores de destrucción descritos anteriormente.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la toxina bacteriana se selecciona del grupo, que consiste en una lisina, Hok, Fst, TisB, LdrD, Kid, SymE, MazF, FlmA, lbs, XCV2162, dinJ, CcdB, MazF, ParE, YafO, Zeta, hicB, relB, yhaV, yoeB, chpBK, hipA, microcina B, microcina B17, microcina C, microcina C7-C51, microcina J25 microcina ColV, microcina 24, microcina L, microcina D93, microcina L, microcina E492, microcina H47, microcina 147, microcina M, colicina A, colicina E1, colicina K, colicina N, colicina U, colicina B, colicina Ia, colicina Ib, colicina 5, colicina 10, colicina S4, colicina Y, colicina E2, colicina E7, colicina E8, colicina E9, colicina E3, colicina E4, colicina E6, colicina E5, colicina D, colicina M y cloacina DF13 o un fragmento biológicamente activo de la misma.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la antitoxina se selecciona del grupo, que consiste en una antilisina, Sok, RNAlI, IstR, Rd1D, Kis, SymR, MazE, FlmB, Sib, ptaRNA1, yafQ, CcdA, MazE, ParD, yafN, Epsilon, HicA, relE, prlF, yefM, chpBI, hipB, MccE, MccECTD, MccF, Cai, ImmE1, Cki, Cni, Cui, Cbi, lia, Imm, Cfi, Im10, Csi, Cyi, Im2, Im7, Im8, Im9, Im3, Im4, ImmE6, proteína de inmunidad contra cloacina (Cim), ImmE5, ImmD y Cmi o un fragmento biológicamente activo de la misma.

En una realización, la toxina bacteriana es bactericida para la bacteria manipulada genéticamente. En una realización, la toxina bacteriana es bacteriostática para la bacteria manipulada genéticamente.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente proporcionada en esta invención es un auxótrofo. En una realización, la bacteria manipulada genéticamente es un auxótrofo seleccionado de un auxótrofo *cysE*, *glnA*, *ilvD*, *leuB*, *lysA*, *serA*, *metA*, *glyA*, *hisB*, *ilvA*, *pheA*, *proA*, *thrC*, *trpC*, *tyrA*, *thyA*, *uraA*, *dapA*, *dapB*, *dapD*, *dapE*, *dapF*, *flhD*, *metB*, *metC*, *proAB* y *thi1*. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas tienen más de un auxótrofo, por ejemplo, pueden ser un auxótrofo $\Delta thyA$ y $\Delta dapA$.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente proporcionada en esta invención comprende, además, un circuito de interruptores de destrucción, tales como, cualquiera de los circuitos de interruptores de destrucción proporcionados en esta invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden, además, uno o más genes, que codifican una o más recombinasas bajo el control de un promotor inducible y una secuencia de toxina invertida. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden uno o más genes, que codifican una antitoxina. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden, además, uno o más genes, que codifican una o más recombinasas bajo el control de un promotor inducible y uno o más genes de escisión invertidos, donde el uno o más genes de escisión codifican una enzima, que elimina un gen esencial. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden uno o más genes, que codifican una antitoxina. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden, además, uno o más genes, que codifican una toxina bajo el control de un promotor, que tiene un sitio de unión con represor TetR y un gen, que codifica el TetR, bajo el control de un promotor inducible, que se induce por arabinosa, tal como, P_{araBAD}. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden uno o más genes, que codifican una antitoxina.

En algunas realizaciones, la bacteria manipulada genéticamente es un auxótrofo, que comprende un gen, que codifica una enzima metabolizadora de fenilalanina, y comprende, además, un circuito de interruptores de destrucción, tales como, cualquiera de los circuitos de interruptores de destrucción descritos en esta invención.

En algunas realizaciones, de las bacterias manipuladas genéticamente descritas anteriormente, el gen o el casete génico para producir la enzima metabolizadora de fenilalanina, está presente sobre un plásmido en la bacteria y está unido de manera operativa sobre el plásmido con el promotor, que se induce en condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias. En otras realizaciones, el gen o el casete génico para producir la enzima metabolizadora de fenilalanina está presente sobre el cromosoma bacteriano y está unido de manera operativa en el cromosoma con el promotor, que se induce en condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas, que comprenden las bacterias manipuladas genéticamente de la invención, se pueden utilizar para tratar, gestionar, aliviar y/o prevenir enfermedades asociadas con hiperfenilalaninemia, por ejemplo, PKU. Se proporcionan las composiciones farmacéuticas de la invención, que comprenden una o más bacterias manipuladas, solas o en combinación con agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o portadores farmacéuticamente aceptables. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una especie, cepa o subtipo de bacterias, que se modifican para comprender las modificaciones genéticas descritas en esta invención. En realizaciones alternativas, la composición farmacéutica comprende dos o más especies, cepas o subtipos de bacterias, donde se modifica cada uno para comprender las modificaciones genéticas descritas en esta invención.

Las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden preparar de una manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables, que comprenden excipientes y asistentes, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en las composiciones para el uso farmacéutico. Se conocen en la técnica los procedimientos de formulación de composiciones farmacéuticas (véanse, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se someten a conversión en pastillas, liofilización, compresión directa, mezcla convencional, disolución, granulación, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o secado por spray para formar comprimidos granulados, nanopartículas, nanocápsulas, microcápsulas, microcomprimidos, bolitas o polvos, que pueden estar totalmente recubiertos o no recubiertos. La formulación adecuada depende de la vía de administración.

Las bacterias manipuladas genéticamente descritas en esta invención se pueden preparar en composiciones farmacéuticas en cualquier forma de administración adecuada (por ejemplo, líquidos, cápsulas, sobres cápsulas duras, cápsulas blandas, comprimidos, comprimidos con recubrimiento entérico, polvos de suspensión, gránulos o formulaciones de liberación sostenida matrices para la administración oral) y para cualquier tipo adecuado de administración (por ejemplo, tópico, inyectable, liberación inmediata, liberación pulsátil, liberación retardada o liberación sostenida). Las cantidades de dosis adecuada para las bacterias manipuladas genéticamente pueden oscilar desde aproximadamente 10^5 hasta 10^{12} bacterias, por ejemplo, aproximadamente 10^5 bacterias, aproximadamente 10^6 bacterias, aproximadamente 10^7 bacterias, aproximadamente 10^8 bacterias, aproximadamente 10^9 bacterias, aproximadamente 10^{10} bacterias, aproximadamente 10^{11} bacterias o aproximadamente 10^{11} bacterias. Se puede administrar la composición una vez o más al día, semanalmente o mensualmente. Se puede administrar la composición antes, durante o después de una comida. En una realización, la composición farmacéutica se administra antes de que el sujeto coma una comida. En una realización, la composición farmacéutica se administra durante una comida. En una realización, la composición farmacéutica se administra después de que el sujeto coma una comida.

Las bacterias manipuladas genéticamente se pueden preparar en composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más portadores, espesantes, diluyentes, tampones, agentes tampón, agentes activos de superficie, lípidos neutrales o catiónicos, compuestos lipídicos, liposomas, potenciadores de penetración, compuestos portadores farmacéuticamente aceptables y otros portadores o agentes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir, pero sin limitación, la adición de bicarbonato de calcio, bicarbonato sódico, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y tensioactivos, que incluyen, por ejemplo, polisorbato 20. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se pueden preparar en una solución de

bicarbonato sódico, por ejemplo solución de 1 molar de bicarbonato sódico (para amortiguar un ambiente celular ácido, tal como, el estómago, por ejemplo). Las bacterias manipuladas genéticamente se pueden administrar y preparar como formas neutrales o saladas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones, tales como, derivados de ácidos hidroclicóricos, fosfóricos, acéticos, oxálicos, tartáricos, etc. y aquellas formadas con cationes, tales como, aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Las bacterias manipuladas genéticamente divulgadas en esta invención se pueden administrar localmente y preparar en la forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, spray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA. En una realización, para formas de administración tópicas no pulverizables, se utilizan formas viscosas a semisólidas o sólidas, que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica mayor que agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, pero sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, etc., que se pueden esterilizar o mezclar con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humidificantes, tampones o sales) para influenciar diferentes propiedades, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de administración tópicas adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables, donde el ingrediente activo en combinación con un portador sólido o líquido se envasa en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como, freón) o en una botella a presión. Se pueden añadir, también, los hidratantes o los humidificantes a composiciones farmacéuticas y formas de administración. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales se conocen bien en la técnica. En una realización, la composición farmacéutica, que comprende las bacterias recombinantes de la invención, se puede preparar como un producto de higiene. Por ejemplo, el producto de higiene puede ser una formulación antibacteriana o un producto de fermentación, tal como, un caldo de fermentación. Los productos de higiene pueden ser, por ejemplo, champús, acondicionadores, cremas, pastas, lociones y bálsamos labiales.

Las bacterias manipuladas genéticamente divulgadas en esta invención se pueden administrar por la vía oral y preparar como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, siropes, lechadas, suspensiones, etc. Las composiciones farmacológicas para el uso oral se pueden fabricar utilizando un excipiente sólido, opcionalmente, moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, rellenos, tales como, azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; composiciones de celulosa, tales como, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como, polivinilpirrolidona (PVP) o polietilenglicol (PEG). Se puede añadir agentes desintegrantes, tales como, polivinilpirrolidona, agar, ácido algínico o una sal de los mismos, tal como, alginato de sodio.

Los comprimidos o las cápsulas se pueden preparar utilizando los procedimientos convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulosa, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, sacarosa, glucosa, sorbitol, almidón, goma, caolín y tragacanto); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato hidrogenado de calcio); lubricantes (por ejemplo, calcio, aluminio, zinc, ácido esteárico, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio, almidón, benzoato de sodio, L-leucina, estearato de

magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón, almidón de patata, almidón de glicolato de sodio, azúcares, derivados de celulosa, polvos de sílice); o agentes humidificantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. Puede existir un recubrimiento de
 5 capa e incluir membranas comunes, pero no estar limitado a, polilactida, ácido poliglicólico, polianhídrido, otros polímeros biodegradables, alginato-polilisina-alginato (APA), alginato-polimetileno, co-guanidina-alginato (A-PMCG-A), hidroximetilacrilato-metilmecrilato (HEMA-MMA), HEMA-MMA-MAA multicapa, poliacrilonitrilovinilcloruro (PAN-PVC),
 10 metallsulfonato de acrilonitrilo/sodio (AN-69), polietilenglicol/polipentametildiclopentasiloxano/polidimetilsiloxano (PEG/PD5/PDMS), poli N,N-dimetilacrilamida (PDMAAm), encapsulados de síliceo, sulfato de celulosa/alginato de sodio/polimetileno-co-guanidina (CS/A/PMCG), acetato ftalato de celulosa, alginato de calcio, perlas de gel de k-carragenano-goma garrofín, perlas de gellan-xantano, poli(lactida-co-glicólidos), carragenano, polianhídridos de almidón, polimetacrilatos, poliamino-ácidos y
 15 polímeros con revestimiento entérico.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente tienen un recubrimiento entérico para liberación en los intestinos o en una región particular de los intestinos, por ejemplo, el intestino grueso. El perfil de pH típico del estómago hasta el colon es
 20 aproximadamente 1-4 (estómago), 5,5-6 (duodeno), 7,3-8,0 (ileno) y 5,5-6,5 (colon). En algunas enfermedades, se puede modificar el perfil de pH. En algunas realizaciones, el recubrimiento se degrada en ambientes de pH específico para especificar el sitio de liberación. En algunas realizaciones, se utilizan al menos dos recubrimientos. En algunas realizaciones, el recubrimiento externo y el recubrimiento interno se degradan en distintos
 25 niveles de pH.

Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tener forma de soluciones, siropes, suspensiones o un producto seco para composiciones con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar utilizando los
 30 procedimientos convencionales con agentes farmacéuticamente aceptables, tales como, agentes de suspensión (por ejemplo, sirope de sorbitol, derivados de celulosa o ácidos comestibles hidrogenados); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres grasos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener, también, sales
 35 tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes como correspondientes. Las preparaciones para la administración oral se pueden preparar para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de las bacterias manipuladas genéticamente descritas en esta invención.

En una realización, las bacterias manipuladas genéticamente de la divulgación se pueden preparar en una composición adecuada para administración a sujetos de pediatría. Como se conoce bien en la técnica, niños se diferencian de adultos en muchos aspectos, incluyendo diferentes tasas de vaciamiento gástrico, pH, permeabilidad gastrointestinal, etc. (Ivanovska
 45 et al., 2014). Además, la aceptabilidad y las preferencias de formulación pediátrica, tales como, vía de administración y características de sabor, son críticas para alcanzar conformidad pediátrica aceptable. Por consiguiente, en una realización, la composición adecuada para administración a sujetos de pediatría puede incluir formas de administración fáciles de tragar o solubles, o composiciones más sabrosas, tales como, composiciones con
 50 sabores añadidos, edulcorantes o bloqueadores de sabor. En una realización, una composición adecuada para administración a sujetos de pediatría, también, puede ser adecuada para administración a adultos.

En una realización, la composición adecuada para administración a sujetos de pediatría puede incluir una solución, sirope, suspensión, elixir, polvo para reconstrucción como suspensión o solución, comprimido dispersable/efervescente, comprimido masticable, gominola, piruleta, helado, comprimido, chicle, tira fina oral, comprimido, que se desintegra por vía oral, sobre, cápsulas blandas de gelatina, polvos orales espolvorear o gránulos. En una realización, la composición es una gominola, que se fabrica a partir de una base de gelatina, dando al caramelo elasticidad, consistencia de masticación deseada y vida útil más larga. En algunas realizaciones, las gominolas pueden comprender, también, edulcorantes o sabores.

En una realización, la composición adecuada para administración a sujetos de pediatría puede incluir un sabor. Como se usa en esta invención, "sabor" es una sustancia (líquido o sólido), que proporciona un sabor y aroma distintos a la formulación. Los sabores ayudan, también, a mejorar la palatabilidad de la formulación. Los sabores incluyen, pero sin limitación, fresa, vainilla, limón, uva, chicle y cereza.

En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se pueden administrar por la vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. También, se puede envolver el compuesto en una cápsula de gelatina de capa dura o blanda, comprimir en comprimidos o incorporar directamente a la dieta de sujeto. Para la administración terapéutica oral, se pueden incorporar los compuestos con excipientes y usarlos en forma de comprimidos ingeridos, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, siropes, obleas y los similares. Para administrar un compuesto por una vía distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con o administrar conjuntamente el compuesto con, un material para prevenir su desactivación.

En otra realización, la composición farmacéutica, que comprende las bacterias recombinantes de la invención, puede ser un producto comestible, por ejemplo, un producto de alimentación. En una realización, el producto de alimentación es leche, leche concentrada, leche fermentada (yogur, leche agria, yogur helado, bebidas fermentadas con bacterias de ácido láctico), leche en polvo, helado, quesos cremosos, quesos secos, leche de soja, leche de soja fermentada, zumos vegetales-de frutas, zumos de frutas, bebidas deportivas, dulces, caramelos, alimentos infantiles (tales como, tartas infantiles), productos de alimentación nutritiva, alimentación animal o suplementos dietéticos. En una realización, el producto de alimentación es un alimento fermentado, tal como, producto lácteo fermentado. En una realización, el producto lácteo fermentado es yogur. En otra realización, el producto lácteo fermentado es queso, leche nata, helado, batido de leche o kéfir. En otra realización, las bacterias recombinantes de la invención se combinan en un recubrimiento de preparación, que contiene otras células bacterianas vivas, que tienen como fin servir como probióticos. En otra realización, el producto de alimentación es una bebida. En una realización, la bebida es una bebida basada en zumo de frutas o una bebida, que contiene extractos de plantas o hierbas. En otra realización, el producto de alimentación es una gelatina o un pudín. Otros productos de alimentación adecuados para administración de las bacterias recombinantes de la invención se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, US 2015/0359894 y US 2015/0238545.

En otra realización adicional, la composición farmacéutica de la invención se inyecta en, se pulveriza sobre o se espolvorea sobre un producto de alimentación, tal como, pan, yogur o queso.

En algunas realizaciones, la composición se prepara para administración intrainestinal, administración intrayeyunal, administración intraduodenal, administración intraileal,

administración con shunt gástrico o administración intracólica, por medio de nanopartículas, nanocápsulas, microcápsulas o microcomprimidos, que están recubiertos completamente o no recubiertos. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, también, como composiciones rectales, tales como, supositorios o enemas de retención, utilizando, por

ejemplo, bases de supositorios convencionales, tales como, manteca de cacao u otros glicéridos. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos grasos o acuosos y pueden contener agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Se puede administrar las bacterias manipuladas genéticamente descritas en esta invención por la vía intranasal, preparadas en una forma de aerosol, spray, nebulización o en forma de gotas, y administrarlas de manera conveniente en forma de una presentación de aerosol spray de lotes comprimidos o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). Las unidades de dosificación en aerosol presurizado se pueden determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y los cartuchos (por ejemplo, de gelatina) para el uso en un inhalador o un insuflador se pueden preparar con contenido de una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuado, tal como, lactosa o almidón.

Las bacterias manipuladas genéticamente se pueden administrar y preparar como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación o mediante inyección, incluyendo inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección local, inyección directa o infusión. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

En algunas realizaciones, se dan a conocer en esta invención composiciones farmacéuticamente aceptables en formas de administración únicas. Las formas de administración únicas pueden ser líquidas o sólidas. Las formas de administración únicas se pueden administrar directamente a un paciente sin modificación o se pueden diluir o reconstruir antes de administración. En determinadas realizaciones, una forma de administración única se puede administrar en bolus, por ejemplo, inyección única, dosis oral única, incluyendo una dosis oral, que comprende múltiples comprimidos, cápsulas, pastillas, etc. En realizaciones alternativas, una forma de administración única se puede administrar durante un periodo de tiempo, por ejemplo, mediante infusión.

Las formas de administración únicas de la composición farmacéutica se pueden preparar dividiendo la composición farmacéutica en partes alícuota más pequeñas, envases de dosis únicas, formas líquidas de dosis únicas o formas sólidas de dosis únicas, tales como, comprimidos, granulados, nanopartículas, nanocápsulas, micropartículas, microcomprimidos, bolitas o polvos, que se pueden recubrir o no de manera entérica. Una dosis única en una forma sólida se puede reconstituir añadiendo líquido, típicamente agua estéril o solución salina, antes de administración a un paciente.

En otras realizaciones, la composición se puede administrar en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, se puede utilizar una bomba para conseguir liberación controlada o sostenida. En otra realización, se puede utilizar los materiales poliméricos para conseguir liberación controlada o sostenida de las terapias de la presente divulgación (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.989.463). Los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(2-hidroxietilo metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico),

- poli(etileno-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N- vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. El polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida puede ser inerte, libre de impurezas lixiviables, estable para almacenar y biodegradable. En algunas realizaciones, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede ubicar en proximidad con la diana profiláctica o terapéutica requiriendo, de este modo, únicamente una fracción de la dosis sistemática. Se puede utilizar cualquier técnica adecuada conocida por un experto.
- Los regímenes de dosificación se pueden modificar para proporcionar una respuesta terapéutica. La dosis puede depender de varios factores, que incluyen severidad y capacidad de respuesta de la enfermedad, vía de administración, curso temporal de tratamiento (días a meses a años) y tiempo de mejora de la enfermedad. Por ejemplo, un bolus único se puede administrar a la vez, varias dosis divididas se pueden administrar durante un periodo de tiempo predeterminado o la dosis se puede reducir o incrementar como se indica por la situación terapéutica. La especificación para la dosis se dicta por las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir. Los valores de dosis pueden variar debido al tipo y la severidad de la afección a paliar. Para cualquier sujeto particular, se pueden modificar los regímenes de dosis específicas durante un tiempo, según la necesidad individual y el juicio profesional del médico, que lo trata. La toxicidad y la eficacia terapéutica de compuestos proporcionados en esta invención se pueden determinar utilizando los procedimientos farmacéuticos estándares en cultivo celular o modelos de animales. Por ejemplo, se pueden determinar LD_{50} , ED_{50} , CE_{50} y CI_{50} y se puede calcular la proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos (LD_{50}/ED_{50}) como el índice terapéutico. Se pueden utilizar las composiciones, que muestran efectos secundarios, con modificaciones cuidadosas para minimizar daño potencial para reducir efectos secundarios. Se puede calcular la dosis inicialmente a partir de los ensayos de cultivos celulares y modelos de animales. Los datos obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* e *in vivo* y estudios de animales se pueden utilizar en preparación de una variedad de dosis para su uso en humanos.

Los ingredientes se suministran por separado o mezclados en una forma de unidad de toma, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un envase sellado, tal como, una ampolla o un sobre indicando la cantidad de agente activo. Si el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de tal modo, que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar en un contenedor herméticamente sellado, tal como, una ampolla o un sobre indicando la cantidad del agente. En una realización, una o más composiciones farmacéuticas se suministra(n) como un polvo liofilizado estéril o un concentrado libre de agua en un contenedor sellado herméticamente y se puede(n) reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración adecuada para la administración a un sujeto. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas se proporcionan como un polvo liofilizado estéril seco en un contenedor herméticamente sellado almacenado entre 2° C y 8° C y administrado en 1 hora, en 3 horas, en 5 horas, en 6 horas, en 12 horas, en 24 horas, en 48 horas, en 72 horas o dentro de una semana después de su reconstrucción. Se pueden incluir los crioprotectores para una forma de administración liofilizada, principalmente, 0-10 % de sacarosa (óptimamente 0,5-1,0 %). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Otros agentes volumétricos adecuados incluyen glicina y arginina, cada uno de los cuales se puede incluir con una concentración de 0-0,05 % y polisorbato-80 (óptimamente incluidos con una concentración de 0,005-0,01 %).

Los tensioactivos adicionales incluyen, pero sin limitación, polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica se puede preparar como una solución inyectable y puede comprender, además, un agente útil como un adyuvante, tal como, aquellos, que se utilizan para aumentar absorción o dispersión, por ejemplo, hialuronidasa.

5

Otro aspecto de la divulgación se refiere a procedimientos para tratar una enfermedad asociada con hiperfenilalaninemia o uno o más síntomas asociados con la hiperfenilalaninemia. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia o uno o más síntomas

10 asociados con la hiperfenilalaninemia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición que compone una bacteria manipulada divulgada en esta invención. La invención proporciona una composición de la invención para su uso en un procedimiento para reducir la hiperfenilalaninemia o para tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento

15 para tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia o uno o más síntomas asociados con la hiperfenilalaninemia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende una bacteria manipulada que comprende una secuencia génica que codifica una o más PME, por ejemplo, PAH y/o PAH, y/o LAAD. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar, una enfermedad

20 asociada con la hiperfenilalaninemia o uno o más síntomas asociados con la hiperfenilalaninemia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende una bacteria manipulada que comprende una secuencia génica que codifica una o más PME, por ejemplo, PAH y/o PAH, y/o LAAD y una secuencia génica que codifica uno o más transportadores de Phe. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia o uno o más síntomas asociados con la hiperfenilalaninemia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende una bacteria manipulada que comprende una secuencia génica que codifica una o más PME, por ejemplo, PAH y/o PAH, y/o LAAD y opcionalmente una secuencia génica que codifica

30 uno o más transportadores de Phe, donde la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME están bajo el control de un promotor inducible, tal como cualquiera de los promotores inducibles divulgados en esta invención. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia o uno o más síntomas asociados con la hiperfenilalaninemia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende una bacteria manipulada que comprende una secuencia génica que codifica una o más PME, por ejemplo, PAH y/o PAH, y/o LAAD y opcionalmente una secuencia génica que codifica uno o más transportadores de Phe, donde la una o más secuencias génicas que codifican la una o más PME están bajo el control de un promotor inducible, y la secuencia génica que codifica el uno o más transportadores de Phe están bajo el control de un promotor inducible, tal como cualquiera de los promotores inducibles divulgados en esta invención. La una o más secuencias génicas pueden estar bajo el control del mismo o diferentes promotores inducibles. En algunos casos, una o más de las secuencias génicas que codifican la una o más PME, por ejemplo, PAH y/o PAH, y/o LAAD están bajo el control de un promotor constitutivo. En algunos casos, una o más de las secuencias génicas que codifican el uno o más transportadores de Phe están bajo el control de un promotor constitutivo. En otras realizaciones, las bacterias pueden comprender uno o más de los siguientes: una o más auxotrofías, uno o más interruptores de destrucción, componentes de protección de genes y/o resistencia a antibióticos.

50

En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona del grupo, que consiste en: fenilcetonuria, fenilcetonuria clásica o típica, fenilcetonuria atípica, hiperfenilalaninemia leve permanente, hiperfenilalaninemia no fenilcetonúrica, deficiencia de fenilalanina hidroxilasa,

deficiencia de cofactor, deficiencia de dihidropteridina reductasa, deficiencia de tetrahidropterina sintasa y enfermedad de Segawa. En algunas realizaciones, hiperfenilalaninemia es secundaria con respecto a otras afecciones, por ejemplo, enfermedades de hígado. En otras realizaciones, la invención se refiere a reducción, mejora o eliminación de uno o más síntomas asociados con estas enfermedades, que incluyen, pero sin limitación, déficits neurológicos, retraso mental, encefalopatía, epilepsia, eczema, menor crecimiento, microcefalia, temblor, espasticidad de extremidades y/o hipopigmentación. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar es un paciente humano.

En determinadas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son capaces de metabolizar fenilalanina en la dieta para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con hiperfenilalaninemia, por ejemplo, PKU. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran simultáneamente con proteína dietética. En otras realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente no se administran simultáneamente con proteína dietética. Los estudios han demostrado que las secreciones pancreáticas y de otras glándulas en los intestinos contienen niveles altos de proteínas, enzimas y polipéptidos, y que los aminoácidos producidos como un resultado de su catabolismo se reabsorben de nuevo en la sangre en un proceso conocido como "recirculación entero" (Chang, 2007; Sarkissian et al., 1999). Por consiguiente, los altos niveles intestinales de fenilalanina pueden ser parcialmente independientes de ingesta de comida y están disponibles para descomposición mediante PAL. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente y la proteína dietética se administran después de un periodo de ayuno o una dieta restringida en fenilalanina. En estas realizaciones, un paciente, que sufra de hiperfenilalaninemia, puede ser capaz de continuar una dieta normal considerablemente o una dieta que es menos restrictiva que una dieta libre de fenilalanina. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente pueden ser capaces de metabolizar fenilalanina a partir de las fuentes adicionales, por ejemplo, la sangre, para tratar una enfermedad asociada con hiperfenilalaninemia, por ejemplo, PKU. En estas realizaciones, no es necesario administrar las bacterias manipuladas genéticamente simultáneamente con proteína dietética, y se genera un gradiente de fenilalanina, por ejemplo, de sangre a intestinos, y la bacteria manipulada genéticamente metaboliza fenilalanina y reduce fenilalanina.

El procedimiento puede comprender preparación de una composición farmacéutica con al menos una especie, cepa o subtipo de bacterias modificado genéticamente descrito en esta invención y administración de la composición farmacéutica a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se administran por la vía oral, por ejemplo, en una suspensión líquida. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se liofilizan en una cápsula de gelatina y se administran por la vía oral. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se administran a través de un tubo de alimentación o un shunt gástrico. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se administran por la vía rectal, por ejemplo, utilizando un enema. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se administran localmente, por la vía intraintestinal, intrayeyunal, intraduodenal, intraileal y/o intracólica.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en esta invención se administra para reducir niveles de fenilalanina en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación reducen los niveles de fenilalanina en un sujeto de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más en comparación con los niveles en un sujeto no tratado o controlado. En algunas realizaciones, la reducción se mide comparando el nivel de

fenilalanina en un sujeto antes y después de administrar la composición farmacéutica. En algunas realizaciones, el tratamiento o la mejora de hiperfenilalaninemia permite mejorar uno o más síntomas de la afección o el trastorno en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más.

5

Antes, durante y después de la administración de la composición farmacéutica, los niveles de fenilalanina en el sujeto se pueden medir en una muestra biológica, tal como, sangre, suero, plasma, orina, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal, materia fecal, raspaduras de mucosa intestinal, una muestra recogida de un tejido y/o una muestra recogida de los contenidos de uno o más de los siguientes: el estómago, duodeno, yeyuno, íleo, colon, recto y canal anal. En algunas realizaciones, los procedimientos pueden incluir administración de las composiciones de la invención para reducir fenilalanina. En algunas realizaciones, los procedimientos pueden incluir administración de las composiciones de la invención para reducir fenilalanina hasta niveles no detectables en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos pueden incluir administración de las composiciones de la invención para reducir concentraciones de fenilalanina hasta niveles no detectables o menos que aproximadamente 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 % o 80 % de los niveles de fenilalanina en el sujeto antes del tratamiento.

10

15

20

25

30

35

Los niveles de hipurato en el sujeto pueden medirse en una muestra biológica, tal como sangre, suero, plasma, orina, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, materia fecal, raspados de la mucosa intestinal, una muestra recogida de un tejido y/o una muestra recogida del contenido de uno o más de los siguientes: estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto y canal anal. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en esta invención pueden incluir la administración de las composiciones de la invención para reducir la fenilalanina y dar como resultado mayores niveles de producción de hipurato. En algunas realizaciones, los procedimientos pueden incluir la administración de las composiciones de la invención para reducir la fenilalanina a niveles indetectables en un sujeto y, al mismo tiempo y proporcionalmente, aumentar los niveles de hipurato, por ejemplo, en la orina. En algunas realizaciones, los procedimientos pueden incluir la administración de las composiciones de la invención, lo que conduce a un aumento de las concentraciones de hipurato a más de aproximadamente el 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, o hasta el 99 % o hasta el 100 % de los niveles de hipurato en orina del sujeto antes del tratamiento.

35

En algunas realizaciones, la actividad de bacterias manipuladas genéticamente que expresan PAL (por ejemplo, actividad degradante de fenilalanina) se puede detectar en la orina de un sujeto mamífero, por ejemplo, un modelo animal o un ser humano, midiendo las cantidades de hipurato producido y la tasa de su acumulación. El hipurato es un producto de descomposición específico de PAL y normalmente está presente en la orina humana en concentraciones bajas. Es el producto final del metabolismo de la fenilalanina a través de la ruta de PAL. La fenilalanina amonio liasa media la conversión de fenilalanina en cinamato. Cuando el cinamato se produce en el intestino, se absorbe y rápidamente se convierte en hipurato en el hígado y se excreta en el hígado (Hoskins JA and Gray Phenylalanine ammonia lyase in the management of phenylketonuria: the relationship between ingested cinnamate and urinary hippurate in humans. J Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1982 Feb;35(2):275-82). La fenilalanina se convierte en hipurato en una relación de 1:1, es decir, 1 mol de Phe se convierte en 1 mol de hipurato. Por lo tanto, los cambios en los niveles de hipurato en orina se pueden usar como una medida no invasiva del efecto de las terapias que utilizan este mecanismo.

40

45

50

Por lo tanto, el ácido hipúrico tiene el potencial de funcionar como un biomarcador que permite controlar la adherencia a la dieta y el efecto del tratamiento en pacientes que

reciben regímenes a base de PAL. Se puede usar como complemento de la medición de los niveles de Phe en sangre en el tratamiento de los pacientes y, dado que es un biomarcador urinario, puede tener ventajas, especialmente en los niños, para ajustar la ingesta de proteínas, lo que puede ser un desafío ya que las necesidades varían basándose en el crecimiento.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación aumentan los niveles de hipurato en la orina de un sujeto en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más en comparación con los niveles en un sujeto no tratado o de control. En algunas realizaciones, el aumento se mide comparando el nivel de hipurato en un sujeto antes y después de la administración de la composición farmacéutica de la divulgación.

En esta sección, la expresión "fármaco a base de PAL" se refiere a cualquier fármaco, polipéptido, biológico o régimen de tratamiento que tenga actividad PAL, por ejemplo, PEG-PAL, Kuvan, una composición que comprende una bacteria de la presente divulgación, por ejemplo, bacterias que codifican PAL y, opcionalmente, el transportador de PheP. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para medir la actividad de PAL *in vivo* administrando a un sujeto, por ejemplo, un sujeto mamífero, un fármaco a base de PAL y medir la cantidad de hipurato producido en el sujeto como medida de la actividad de PAL. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para controlar la actividad terapéutica de un fármaco a base de PAL administrando a un sujeto, por ejemplo, un sujeto mamífero, el fármaco a base de PAL y midiendo la cantidad de hipurato producido en el sujeto como medida de la actividad terapéutica de PAL. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para ajustar la dosis de un fármaco a base de PAL administrando a un sujeto, por ejemplo, un sujeto mamífero, el fármaco a base de PAL, medir la cantidad de hipurato producido en el sujeto para determinar la actividad de PAL, y ajustar (por ejemplo, aumentar o reducir) la dosis del fármaco para aumentar o reducir la actividad de PAL en el sujeto. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para ajustar la ingesta de proteínas y/o la dieta de un sujeto que tiene hiperfenilalaninemia que comprende administrar al sujeto un fármaco a base de PAL, medir la cantidad de hipurato producido en el sujeto, y ajustar (por ejemplo, aumentar o reducir) la ingesta de proteínas o ajustar de otro modo la dieta del sujeto para aumentar o reducir la actividad de PAL en el sujeto. En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento para confirmar la adherencia a una ingesta de proteínas y/o un régimen de dieta de un sujeto que tiene hiperfenilalaninemia que comprende administrar al sujeto un fármaco a base de PAL, medir la cantidad de hipurato producido en el sujeto, y medir la actividad de PAL en el sujeto.

En algunos casos de los procedimientos divulgados en esta invención, en un sujeto se controlan tanto los niveles de fenilalanina en sangre como los niveles de hipurato en orina. En algunos casos, la fenilalanina en sangre y el hipurato en la orina se miden en múltiples puntos temporales para determinar la velocidad de descomposición de la fenilalanina. En algunos casos, los niveles de hipurato en la orina se usan para evaluar la actividad de PAL o la actividad de la cepa en modelos animales.

En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre con respecto a cepa para probar el mecanismo de acción. En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre como herramienta para diferenciar entre la actividad de PAL y LAAD en una cepa y permiten determinar la contribución de cada enzima a la actividad global de la cepa.

- En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre para evaluar la seguridad en modelos animales y sujetos humanos. En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre
- 5 en la evaluación de la respuesta a la dosis y el régimen óptimo para el efecto farmacológico y la seguridad deseados. En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre como criterio de valoración sustituto para la eficacia y/o la toxicidad. En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de
- 10 fenilalanina en sangre para predecir la respuesta de los pacientes a un régimen que comprende una cepa terapéutica. En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre para la identificación de determinadas poblaciones de pacientes que tienen más probabilidades de responder a la terapia farmacológica. En algunos casos, se usan mediciones de ácido
- 15 hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre para evitar eventos adversos específicos. En algunos casos, las mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre son útiles para la selección de pacientes.
- 20 En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre como un procedimiento para ajustar la ingesta de proteínas/dieta de un paciente con PKU en un régimen que incluye la administración de una cepa terapéutica de PKU que expresa PAL.
- 25 En algunos casos, la medición de los niveles de ácido hipúrico en orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre, se usa para medir y/o controlar la actividad de PAL recombinante. En algunos casos, la medición de los niveles de ácido hipúrico en orina se usa para medir y/o controlar la actividad de PAL pegilada recombinante (Peg-PAL). En algunos casos, la medición de los niveles de ácido hipúrico en orina, en
- 30 solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre, se usa para medir y/o controlar la actividad de PAL recombinante administrada en combinación con una cepa terapéutica como se describe en esta invención.
- 35 En algunos casos, se usan mediciones de ácido hipúrico en la orina, en solitario o en combinación con mediciones de fenilalanina en sangre en combinación con otros biomarcadores, por ejemplo, biomarcadores de seguridad clínica. Los ejemplos no limitantes de dichos marcadores de seguridad incluyen el examen físico, los signos vitales y el electrocardiograma (ECG). Otros ejemplos no limitantes incluyen pruebas de seguridad hepática conocidas en la técnica, por ejemplo, aspartato transaminasa sérica (AST), alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), gamma-glutamyl transferasa (GGT) y bilirrubina. Dichos marcadores de bioseguridad también incluyen pruebas de seguridad renal, por ejemplo, los conocidos en la técnica, por ejemplo, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina en suero, tasa de filtración glomerular (GFR), aclaramiento de creatinina, electrolitos en suero (sodio, potasio, cloruro y bicarbonato), y análisis completo de orina
- 40 (color, pH, gravedad específica, glucosa, proteínas, cuerpos cetónicos y examen microscópico de sangre, leucocitos, precipitados), así como Cistatina-c, β 2-microglobulina, ácido úrico, clusterina, N-acetil-beta-dglucosaminidasa, lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), N-acetil- β -dglucosaminidasa (NAG) y molécula de lesión renal 1 (KIM-1). Otros ejemplos no limitantes incluyen biomarcadores de seguridad hematológicos conocidos
- 45 en la técnica, por ejemplo, hemograma completo, hemoglobina total, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, volumen medio de glóbulos rojos, hemoglobina celular media, % de ancho de distribución de glóbulos rojos, concentración media de hemoglobina celular, recuento total de glóbulos blancos, recuento diferencial de glóbulos blancos (neutrófilos, linfocitos,
- 50

basófilos, esinófilos y monocitos) y plaquetas. Otros ejemplos no limitantes incluyen marcadores de seguridad ósea conocidos en la técnica, por ejemplo, calcio en suero y fosfatos inorgánicos. Otros ejemplos no limitantes incluyen biomarcadores básicos de seguridad metabólica conocidos en la técnica, por ejemplo, glucosa en sangre, triglicéridos (TG), colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDLc) y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-c). Otros biomarcadores de seguridad específicos conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, niveles de inmunoglobulina en suero, proteína C reactiva (PCR), fibrinógeno, hormona estimulante de la tiroides (TSH), tiroxina, testosterona, insulina, lactato deshidrogenasa (LDH), creatina cinasa (CK) y sus isoenzimas, troponina cardíaca (cTn) y metahemoglobina.

En algunos casos, la actividad de bacterias manipuladas genéticamente que expresan LAAD se puede detectar específicamente en las heces y diferenciarse de otras cepas de *E. coli*. Para este propósito se puede usar una prueba de fenilalanina desaminasa "Phenylalanine Agar Slant". Se usa agar de fenilalanina para determinar si el microbio puede usar fenilalanina y convertirla en fenilpiruvato. Cuando los productos químicos de prueba se añaden al tubo que contiene la muestra en el agar de fenilalanina, el fenilpiruvato se convierte en un compuesto verde, lo que indica una prueba positiva. La *E. coli* de tipo natural no produce fenilpiruvato, ya que no codifica una enzima que pueda producir fenilpiruvato a partir de fenilalanina, lo que permite la diferenciación de otras cepas de *E. coli*. Las bacterias manipuladas genéticamente pueden diferenciarse de otras especies bacterianas que pueden producir fenilpiruvato mediante pruebas basadas en PCR conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden amplificarse secuencias específicas de especies. Por ejemplo, la PCR universal que amplifica regiones conservadas en diversas bacterias es ideal para detectar cualquier patógeno en el cribado de muestras. Para este fin, la región conservada del gen de ARNr 16S se puede usar como gen diana para la PCR universal; el gen de ARNr 16S contiene regiones específicas de especie por las que se puede diferenciar un gran número de especies bacterianas.

En algunos casos, la prueba de fenilalanina desaminasa se puede usar para detectar bacterias manipuladas genéticamente en una muestra de heces. En algunos casos, se pueden realizar pruebas basadas en PCR para diferenciar las bacterias manipuladas genéticamente de otras especies bacterianas.

En algunos casos, se usa PCR cuantitativa (qPCR) para amplificar, detectar y/o cuantificar los niveles de expresión de ARNm del gen, uno o más genes) o casetes génicos para producir las cargas útiles, por ejemplo, una o más PME y/o PheP. Los cebadores pueden diseñarse y usarse para detectar ARNm en una muestra según los procedimientos conocidos en la técnica. En algunos casos, se añade un fluoróforo a una mezcla de reacción de muestra que puede contener ARN de carga útil y se usa un termociclador para iluminar la mezcla de reacción de muestra con una longitud de onda de luz específica y detectar la emisión posterior del fluoróforo. La mezcla de reacción se calienta y se enfría a temperaturas predeterminadas durante períodos predeterminados de tiempo. En ciertos casos, el calentamiento y el enfriamiento se repiten durante un número predeterminado de ciclos. En algunos casos, la mezcla de reacción se calienta y se enfría a 90-100 °C, 60-70 °C y 30-50 °C durante un número predeterminado de ciclos. En un determinado caso, la mezcla de reacción se calienta y se enfría a 93-97 °C, 55-65 °C y 35-45 °C durante un número predeterminado de ciclos. En algunos casos, el amplicón acumulado se cuantifica después de cada ciclo de qPCR. El número de ciclos en los que la fluorescencia supera el umbral es el ciclo umbral (CT). Se genera al menos un resultado de CT para cada muestra, y el uno o más resultados de CT se pueden usar para determinar los niveles de expresión de ARNm de la una o más cargas útiles.

- En algunos casos, se usa PCR cuantitativa (qPCR) para amplificar, detectar y/o cuantificar los niveles de expresión de ARNm de la una o más cargas útiles. Los cebadores pueden diseñarse y usarse para detectar ARNm en una muestra según los procedimientos conocidos en la técnica. En algunos casos, se añade un fluoróforo a una mezcla de reacción de muestra que puede contener carga útil, cargas útiles, por ejemplo, una o más PME y/o PheP y/o FNRS24Y, ARNm, y se usa un termociclador para iluminar la mezcla de reacción de muestra con una longitud de onda específica de luz y detectar la emisión posterior del fluoróforo. La mezcla de reacción se calienta y se enfría a temperaturas predeterminadas durante períodos predeterminados de tiempo. En ciertos casos, el calentamiento y el enfriamiento se repiten durante un número predeterminado de ciclos. En algunos casos, la mezcla de reacción se calienta y se enfría a 90-100 °C, 60-70 °C y 30-50 °C durante un número predeterminado de ciclos. En un determinado caso, la mezcla de reacción se calienta y se enfría a 93-97 °C, 55-65 °C y 35-45 °C durante un número predeterminado de ciclos. En algunos casos, el amplicón acumulado se cuantifica después de cada ciclo de qPCR. El número de ciclos en los que la fluorescencia supera el umbral es el ciclo umbral (CT). Se genera al menos un resultado de CT para cada muestra, y el uno o más resultados de CT se pueden usar para determinar los niveles de expresión de ARNm de la una o más cargas útiles, una o más PME y/o PheP y/o FNRS24Y.
- En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente son Nissle de *E. coli*. Las bacterias manipuladas genéticamente se pueden destruir, por ejemplo, utilizando factores de defensa en los intestinos o el suero sanguíneo (Sonnenborn et al., 2009) o mediante activación de un interruptor de destrucción, varias horas o días después de la administración. Por consiguiente, la composición farmacéutica, que comprende las bacterias manipuladas genéticamente, se puede volver a administrar en una dosis y frecuencia terapéuticamente eficaz. La longitud de residencia Nissle *in vivo* en un ratón se muestra en la **figura 68**. En realizaciones alternativas, las bacterias manipuladas genéticamente no se destruyen en horas o días después de la administración y pueden propagarse y colonizar los intestinos.
- Los procedimientos de la divulgación pueden comprender la administración de la composición farmacéutica sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra conjuntamente con el cofactor de tetrahidrobiopterina (por ejemplo, Kuvan/sapropterina), aminoácidos neutrales largos (por ejemplo, tirosina, triptófano), glicomacropéptidos, un probiótico (por ejemplo, VSL3), una enzima (por ejemplo, PAL pegilado) y/u otros agentes utilizados en el tratamiento de fenilcetonuria (Al Hafid y Christodoulou, 2015).
- En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con una o más enzimas PME producidas de manera recombinante, por ejemplo, PAL, LAAD o PAH recombinantes. En algunas realizaciones, las enzimas recombinantes se desarrollan más para mejorar la estabilidad y/o capacidad de administración. En algunas realizaciones, una o más enzimas PME administradas en combinación con las bacterias manipuladas genéticamente se pegilan. En algunas realizaciones, una o más enzimas PME administradas en combinación con las bacterias manipuladas genéticamente se administran como una proteína de fusión. Un ejemplo no limitativo de tal proteína de fusión es una fusión entre una PME y un dominio de transducción para la absorción en células. Un ejemplo no limitativo de tal dominio de transducción o péptido, que penetra en célula, es el péptido TAT. En algunas realizaciones, una o más enzimas PME administradas en combinación con las bacterias manipuladas genéticamente se preparan como una nanopartícula. Un ejemplo no limitativo de tal nanopartícula es una nanopartícula de PME de sulfato/quitosano de dextrano. En algunas realizaciones, una o más enzimas PME administradas en combinación con las bacterias

manipuladas genéticamente se administran como una microesfera de PME. Un ejemplo no limitativo de tal microesfera es una microesfera de PME de alginato de bario. En algunas realizaciones, una o más enzimas PME administradas en combinación con las bacterias manipuladas genéticamente se administran como partículas PME de sílice amorfas.

5

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAL. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAH. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAL y PAH. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAL y LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAH y LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAL, PAH y LAAD.

10

15

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAL pegilada. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con PAH pegilada. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con LAAD pegilada. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con una proteína de fusión PAL, por ejemplo, un péptido, que penetra en célula. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con una proteína de fusión PAH, por ejemplo, un péptido, que penetra en célula. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con una proteína de fusión LAAD, por ejemplo, un péptido, que penetra en célula. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con nanopartículas de PAL. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con nanopartículas de PAH. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con nanopartículas de LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con microesferas de PAL. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con microesferas de PAH. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con microesferas de LAAD. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con partículas de sílice de PAL. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con partículas de sílice de PAH. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente se administran en combinación con partículas de sílice de LAAD.

20

25

30

35

40

En algunas realizaciones, una terapia de reemplazo o terapia de sustitución de enzima recombinante, por ejemplo, PAL, PAH y/o LAAD se administra sin bacterias manipuladas genéticamente.

45

En algunas realizaciones, una o más de PME administrada es PAL. En algunas realizaciones, PAL se modifica como se describe en Sarkissian et al., 2011, Mol Genet Metab. Noviembre de 2011; 104(3): 249-254.

50

En algunas realizaciones, la PAL es Av-p.C503S/p.C565S/p.F18A PAL. En algunas realizaciones, la PAL es PEG- Av-p.C503S/p.C565S/p.F18A PAL.

En algunas realizaciones, el PAL está PEGilado. En una realización, el PAL pegilado es de

- Anabaena variabilis*. En una realización, el PAL pegilado es de *Photorhabdus luminescens*. En algunas realizaciones, una o más de PME administrada es PAH. En una realización, PAH es PAH humana. En algunas realizaciones, una o más de PME administrada es LAAD. En una realización, la proteína LAAD administrada se deriva de *Proteus mirabilis*. En algunas realizaciones, una o más de PME se administraron en combinación con PAL y PAH. En algunas realizaciones, una o más de PME administrada es PAL y LAAD. En algunas realizaciones, una o más de PME administrada es PAH y LAAD. En algunas realizaciones, una o más de PME administrada es PAL, PAH y LAAD.
- 10 En algunas realizaciones, las enzimas recombinantes se formulan adicionalmente para mejorar la estabilidad y/o la capacidad de administración. En algunas realizaciones, la una o más de enzima PME administrada está pegilada. En algunas realizaciones, la una o más enzimas PME administradas se administran como una proteína de fusión. Un ejemplo no limitante de dicha proteína de fusión es una fusión entre una PME y un dominio de transducción para su absorción en las células. Un ejemplo no limitante de tal dominio de transducción o péptido de penetración celular es el péptido TAT. En algunas realizaciones, la enzima PME administrada se formula en una nanopartícula. Un ejemplo no limitante de una nanopartícula de este tipo es una nanopartícula de PME de sulfato de dextrano/quitosano. En algunas realizaciones, la enzima PME administrada se administra como una microesfera de PME. Un ejemplo no limitante de tal microesfera es una microesfera PME de alginato de bario. En algunas realizaciones, la enzima PME administrada se administra como partículas de PME de sílice amorfa.
- 25 En algunas realizaciones, se administra PAL pegilada. En algunas realizaciones, se administra LAAD pegilada. En algunas realizaciones, se administra LAAD pegilada de *Proteus mirabilis*. En algunas realizaciones, se administra PAH pegilada.
- En una realización, se administra una proteína de fusión de PAL, por ejemplo, con un péptido de células penetrante. En una realización, se administra una proteína de fusión de LAAD, por ejemplo, con un péptido que penetra en las células. En una realización, se administra una proteína de fusión de PAH, por ejemplo, con un péptido que penetra en las células. En algunas realizaciones, se administran nanopartículas de PAL. En algunas realizaciones, se administran nanopartículas de PAH. En algunas realizaciones, se administran nanopartículas de LAAD. En algunas realizaciones, se administran microesferas de PAL. En algunas realizaciones, se administran microesferas de PAH. En algunas realizaciones, se administran microesferas de LAAD. En algunas realizaciones, se administran partículas de PAL-sílice. En algunas realizaciones, se administran partículas de PAH-sílice. En algunas realizaciones, se administran partículas de LAAD-sílice.
- 40 En algunas realizaciones, la PME, por ejemplo, PAH, PAL, y/o LAAD se formula con aprotinina, por ejemplo, 40 mg/ml de aprotinina.
- En algunas realizaciones, las PME se suministran como terapia génica. En algunas realizaciones, se usa una tecnología CRISPR. En algunas realizaciones, se usa un vector de terapia génica para administrar una o más PME, por ejemplo, PAL, LAAD y/o PAH. Los vectores de terapia génica son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados. Como alternativa, se puede administrar ADN o ARN del gen de PME formulado o desnudo.
- 50 Una consideración importante en la selección de uno o más agentes terapéuticos adicionales es que el o los agentes deben ser compatibles con las bacterias manipuladas genéticamente de la invención, por ejemplo, el o los agentes no deben interferir con las bacterias ni matarlas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra

con alimentos. En realizaciones alternativas, la composición farmacéutica se administra antes o después de ingerir alimentos. La composición farmacéutica se puede administrar en combinación con una o más modificaciones dietéticas, por ejemplo, dieta baja en fenilalanina. La dosis de la composición farmacéutica y la frecuencia de administración se pueden seleccionar en función de la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada y/o la frecuencia de administración se pueden seleccionar por el médico a cargo.

Los procedimientos de la divulgación también incluyen kits que comprenden la composición farmacéutica descrita en esta invención. El kit puede incluir uno o más elementos que incluyen, pero sin limitación: instrucciones de uso; otros reactivos, por ejemplo, un marcador, un agente terapéutico adicional; dispositivos o materiales para medir niveles de fenilalanina, o niveles de otras moléculas o metabolitos asociados con hiperfenilalaninemia, en un sujeto; dispositivos u otros materiales para preparar la composición farmacéutica de la invención para su administración; y dispositivos u otros materiales para la administración a un sujeto. Las instrucciones de uso pueden incluir orientación para la aplicación terapéutica, tales como dosis sugeridas y/o modos de administración, por ejemplo, en un paciente con hiperfenilalaninemia. El kit puede contener además al menos un agente terapéutico adicional, y/o una o más cepas bacterianas manipuladas genéticamente adicionales de la invención, formuladas según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

En algunos casos, el kit se usa para la administración de la composición farmacéutica a un sujeto. En algunos casos, el kit se usa para la administración de la composición farmacéutica, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, a un sujeto. En algunos casos, el kit se usa para medir los niveles de fenilalanina (por ejemplo, niveles de fenilalanina en sangre) en un sujeto antes, durante o después de la administración de la composición farmacéutica al sujeto. En determinados casos, el kit se usa para la administración y/o la readministración de la composición farmacéutica, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, cuando los niveles de fenilalanina en sangre están aumentados o son anormalmente altos. En algunos casos, una señal de diagnóstico de hiperfenilalaninemia es un nivel de fenilalanina en sangre de al menos 2 mg/dl, al menos 4 mg/dl, al menos 6 mg/dl, al menos 8 mg/dl, al menos 10 mg/dl, al menos 12 mg/dl, al menos 14 mg/dl, al menos 16 mg/dl, al menos 18 mg/dl, al menos 20 mg/dl, o al menos 25 mg/dl.

La Tabla 20 muestra ejemplos no limitantes de velocidades de degradación objetivo, basados en niveles de fenilalanina en promedio en pacientes con PKU clásica.

Tabla 20. Velocidades de degradación objetivo

Edad (años)	0-6 meses	7-12 meses	1-3	4-8	9-13	14-18 (M)	14-18 (F)	>18 (M)	>18 (F)
Proteína RDA (g/d)	9,1	11	13	19	34	52	46	56	46
PHE diaria (mg)-sujeto sano (proteína Ig = 47 mg PHE)	428	517	611	893	1598	2444	2162	2632	2162
Tolerancia de PHE diaria (mg) (PKU clásica)	250	250	250	250	250	250	250	250	250

Reducción objetivo (mg)	178	267	361	643	1348	2194	1912	2382	1912
Reducción objetivo (mmol)	1,08	1,62	2,19	3,89	8,16	13,28	11,57	14,42	11,57
Velocidad de degradación objetivo ($\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$) (basada en $3,10^{11} \text{ UFC/día}$ de dosis) asumiendo todas las dosis funcionando durante 24 horas	0,15	0,22	0,3	0,54	1,13	1,84	1,61	2	1,61
Velocidad de degradación objetivo a 2 h de tiempo de tránsito ($\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$), asumiendo 2 horas de tiempo de tránsito por dosis	0,6	0,9	1,21	2,16	4,53	7,38	6,43	8,01	6,43
Velocidad de degradación objetivo a 6 h de tiempo de tránsito ($\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$), asumiendo 6 horas de tiempo de transición por dosis	0,2	0,3	0,4	0,72	1,51	2,46	2,14	2,67	2,14

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 8,01 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 2 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 8,01 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,67 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,6 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,22 a aproximadamente 0,9 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,21 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En

algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,54 a aproximadamente 2,16 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 1,13 a aproximadamente 4,53 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$.
 5 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 1,84 a aproximadamente 7,38 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 1,61 a aproximadamente 6,43 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8,01 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$.
 15 En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de aproximadamente 7 a aproximadamente 8 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de reducción de menos de 0,15 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una velocidad de degradación objetivo de más de 8,01 $\mu\text{mol}/10^9 \text{ UFC/h}$.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una reducción objetivo de entre aproximadamente 178 mg y 2382 mg. En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente logran una reducción objetivo de 1,08 mmol a 14,42 mmol. En algunas realizaciones, la reducción es menor de 1,08 mmol. En algunas realizaciones, la reducción es mayor de 14,42 mmol.

En algunas realizaciones, las velocidades de reducción objetivo y degradación objetivo se basan en niveles clásicos de fenilalanina de PKU. En algunas realizaciones, las velocidades de reducción objetivo y degradación objetivo se basan en niveles de fenilalanina observados en PKU leve. En algunas realizaciones, las velocidades de reducción objetivo y degradación objetivo se basan en niveles de fenilalanina observados en hiperfenilalaninemia leve.

Tratamiento *in vivo*

Las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se pueden calcular *in vivo*, por ejemplo, en un modelo de animal. Se puede utilizar cualquier modelo de animal adecuado de una enfermedad o una afección asociada con hiperfenilalaninemia (véase, por ejemplo, Sarkissian et al., 1999). En algunos casos, el modelo de animal es un modelo de ratón de PKU. En determinados casos, el modelo de ratón de PKU es un ratón BTBR mutante de PAH (BTBR-*Pah*^{enu2}, Jackson Laboratories). En estas ocasiones, el modelo de ratón

- contiene una mutación de sentido erróneo homocigota inducida químicamente por (ENU) (T835C) en exón 7 del gen *Pah*, que da como resultado una fenilalanina en sustitución de serina en aminoácido 263 (F263S). Este residuo se ubica en el sitio activo de la enzima PAH, como se muestra mediante estructura de cristal y da como resultado la pérdida completa de actividad PAH. En dietas normales, estos ratones mutantes demuestran un aumento de 10 a 20 veces de niveles de fenilalanina en suero en comparación con controles no afectados. Las bacterias manipuladas genéticamente de la invención se pueden administrar al animal, por ejemplo, por sonda oral, y se determina la eficacia de tratamiento, por ejemplo, midiendo fenilalanina en sangre y/o cinamato antes y después del tratamiento.
- En modelos de animales, se observa, que el tiempo de residencia de las bacterias manipuladas genéticamente dentro del tracto GI puede ser más corto que el tiempo de residencia en humanos. Se puede sacrificar al animal, se puede recoger y analizar las muestras de tejidos.
- Las bacterias se pueden administrar al animal como un bolo, una o más veces al día, una o más veces a la semana, por ejemplo, como se describe en los ejemplos. Como alternativa, puede ser deseable una administración más crónica, por ejemplo, proporcionando bacterias en el agua potable. Las bacterias se pueden proporcionar en el agua potable con gelatina al 0,125 % como portador para mantener las bacterias en suspensión, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos (Ejemplo 44 y 45), y como se describe en la técnica (por ejemplo, en Chen et al., Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity J Clin Invest. 2014;124(8):3391-3406).

- En algunos casos, los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos se pueden llevar a cabo en primates no humanos para determinar cualquier toxicidad potencial surgida de la administración de las bacterias manipuladas genéticamente. La farmacocinética y la farmacodinámica de las bacterias manipuladas genéticamente. Los ejemplos no limitativos de tales estudios se describen en los Ejemplos 30 y 31.

30 Procedimientos de cribado

- En algunos casos de la divulgación, se puede mejorar una cepa manipulada genéticamente utilizando los procedimientos de cribado y selección, por ejemplo, para aumentar la actividad enzimática de PME o para aumentar la habilidad de una cepa de absorber fenilalanina. En algunos casos, el cribado sirve para generar una cepa bacteriana con actividad PME mejorada. En algunos casos, el cribado sirve para generar una cepa bacteriana, que tiene la habilidad de absorción de fenilalanina mejorada. En algunos casos, el cribado puede identificar una cepa bacteriana tanto con la actividad PME mejorada como la importación mejorada de sustrato. Los ejemplos no limitativos de procedimientos de cribado, que se pueden utilizar, se describen en esta invención

Generación de cepas bacterianas con habilidad mejorada para transportar biomoléculas

- Debido a su facilidad de cultivo, tiempos cortos de generación, densidades de población muy altas y genomas pequeños, microbios pueden implicarse en fenotipos únicos en tiempo asignado corto. La evolución adaptativa en laboratorio (ALE) es el proceso de pasar microbios por presión selectiva para implicar una cepa con un fenotipo preferido. Más comúnmente, esto se emplea para aumentar la utilización de fuentes de carbono/energía o la adaptación de una cepa a estreses ambientales (por ejemplo, temperatura, pH), con lo cual las cepas mutantes capaces de crecer sobre el sustrato de carbono o bajo estrés desplazará las cepas menos adaptadas en la población y llegará finalmente a dominar la población.

Este mismo proceso se puede ampliar a cualquier metabolito esencial creando un auxótrofo. Un auxótrofo es una cepa incapaz de sintetizar un metabolito esencial y, por lo tanto, debe tener el metabolito proporcionado en el medio para crecer. En este escenario, creando un auxótrofo y pasándolo sobre cantidades reducidas del metabolito, las cepas resultantes dominantes deberían ser más capaces de obtener e incorporar este metabolito esencial.

Por ejemplo, si la secuencia biosintética para producir un aminoácido se altera, se puede involucrar una cepa capaz de capturar gran afinidad de dicho aminoácido mediante ALE. Primero, la cepa crece en concentraciones diferentes del aminoácido auxótrofo hasta que se establece una concentración mínima para mantener el crecimiento. A continuación, la cepa se pasa a aquella concentración y se diluye en concentraciones disminuidas del aminoácido a intervalos regulares. Conforme avanza el tiempo, las células, que son las más competitivas para el aminoácido - en concentraciones, que limitan el crecimiento - llegarán a dominar la población. Estas cepas tendrán probablemente mutaciones en sus transportadores de aminoácido, que da como resultado la habilidad aumentada para importar el aminoácido esencial y limitativo.

De manera similar, empleando un auxótrofo, que no puede utilizar un metabolito cadena arriba para formar un aminoácido, se puede involucrar una cepa, que no solamente puede importar de manera eficiente el metabolito cadena arriba, pero, también, convertir el metabolito en el metabolito esencial cadena abajo. Estas cepas involucrarán, también, mutaciones para aumentar la importación del metabolito cadena arriba, pero pueden contener, también, mutaciones, que aumentan la expresión o la cinética de reacción de enzimas cadena abajo, o que reducen secuencias de utilización de sustrato competitivo.

En los ejemplos anteriores, un metabolito innato para el microbio se convirtió en esencial utilizando un auxótrofo mutacional y se aplicó una selección con suplementación, que limita el crecimiento, del metabolito endógeno. Sin embargo, los fenotipos capaces de consumir compuestos no nativos se pueden involucrar uniendo su consumo con la producción de un compuesto esencial. Por ejemplo, si se aísla un gen de un organismo diferente, que puede producir un compuesto esencial o un precursor para un compuesto esencial, se puede introducir y expresar este gen de manera recombinante en el huésped heterólogo. La nueva cepa huésped tendrá ahora la habilidad para sintetizar un nutriente esencial de un sustrato no metabolizado previamente. Por el presente, se puede emplear un proceso ALE similar creando un auxótrofo incapaz de convertir un metabolito cadena abajo inmediato y seleccionando la enzima recombinante en cantidades que limitan el crecimiento del compuesto no nativo con expresión concurrente. Esto dará como resultado el transporte del sustrato no nativo, la expresión y la actividad de la enzima heteróloga y la expresión y la actividad de enzimas nativas cadena abajo. Se debería hacer hincapié en que el requisito clave en este proceso es la habilidad de unir el consumo del metabolito no nativo con la producción de un metabolito esencial para el crecimiento.

Cuando se establece la base del mecanismo de selección y se establecen los niveles mínimos de suplementación, se puede procesar la experimentación actual de ALE. A lo largo de este proceso se debe monitorizar vigilantemente varios parámetros. Es importante que los cultivos se mantengan en una fase de crecimiento exponencial y no se permita alcanzar la fase de saturación/estacionaria. Esto significa que las tasas de crecimiento se deben verificar durante cada paso y las diluciones posteriores deben ajustarse según corresponda. Si la velocidad de crecimiento mejora hasta tal punto, que las diluciones se convierten en largas, a continuación, se debería disminuir la concentración de suplementación auxótrofa, de tal modo, que la velocidad de crecimiento se ralentiza, se aumenta la presión de selección y las diluciones no son tan severas en comparación con las subpoblaciones de fuerte inclinación durante el paso. Adicionalmente, a niveles regulares

las células se deberían diluir, crecer sobre un medio sólido y los clones individuales testarse para confirmar las tasas de crecimiento de fenotipos observados en los cultivos ALE.

Pronosticando, cuando detenerse, el experimento ALE, también, necesita vigilancia. Como el éxito de dirigir la evolución está unido directamente con el número de mutaciones "cribados" a lo largo del experimento y, generalmente, las mutaciones son una función de errores durante la replicación de ADN, las divisiones celulares acumulativas (CCD) actúan como un representante para mutantes totales, que se han cribado. Los estudios anteriores han demostrado que los fenotipos beneficiosos para el crecimiento sobre diferentes fuentes de carbono se pueden aislar en aproximadamente $10^{11,2}$ CCD¹. Se puede acelerar esta velocidad utilizando la adición de mutágenos químicos para los cultivos - tales como, *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) - que causa el aumento de errores de replicación de ADN. Sin embargo, cuando el paso continuo se lleva a mínimo o a ninguna mejora en la velocidad de crecimiento, la población se junta con alguna adaptación máxima y se puede detener el experimento ALE.

Al finalizar el experimento ALE, las células deberían diluirse, aislarse sobre un medio sólido y valorarse para fenotipos de crecimiento, que corresponden con el matraz de cultivo. Los mejores de aquellos seleccionados se preparan, a continuación, para ADN genómico y se envían para secuenciación genómica completa. La secuenciación con mutaciones relevantes, que ocurre alrededor del genoma capaz de producir fenotipos mejorados, contendrá, también, mutaciones silenciosas (aquellas, que no proporcionan beneficio, pero no restan valor a fenotipo deseado). En cultivos involucrados con presencia de NTG u otros mutágenos químicos, existirán mutaciones significativamente más silenciosas ambientales. Si está conforme con la cepa mejor representada en su estado actual, el usuario puede proceder a la puesta en práctica de aquella cepa. De otra manera, se puede desenrollar las mutaciones contribuyentes de la cepa involucrada mediante la reintroducción de las mutaciones en la cepa precursora utilizando las técnicas de modificación genómica. Ver Lee, D.-H., Feist, A. M., Barrett, C. L. & Palsson, B. Ø. Cumulative Number of Cell Divisions as a Meaningful Timescale for Adaptive Laboratory Evolution of *Escherichia coli*. PLoS ONE 6, e26172 (2011).

En algunas ocasiones, se puede utilizar el procedimiento ALE para identificar las bacterias manipuladas genéticamente con absorción mejorada de fenilalanina.

Cribado específico para mejorar la actividad de PME

Se llevan a cabo cribados que utilizan selección genética para mejorar el consumo de fenilalanina en las bacterias manipuladas genéticamente. Los análogos de fenilalanina tóxicos ejercen su mecanismo de acción (MOA) al ser incorporados a la proteína celular, provocando la muerte celular. Estos compuestos, tales como parálogo pfluoro- DL-fenilalanina y ortólogo o-fluoro-DL-fenilalanina, tienen utilidad en un enfoque no dirigido para seleccionar enzimas PAL con mayor actividad. Suponiendo que PAL puede metabolizar estos compuestos tóxicos en un metabolito no tóxico, en lugar de incorporarse a la proteína celular, las bacterias manipuladas genéticamente que tienen una actividad de degradación de fenilalanina mejorada pueden tolerar niveles más altos de estos compuestos, y se pueden cribar y seleccionar en esta base.

Referencias

Al Hafid N, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. Transl Pediatr. Octubre de 2015;4(4):304-317. PMID: 26835392;

- Altenhoefer et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 9 de abril de 2004;40(3):223-229. PMID: 15039098;
- 5 Andersen et al. Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J Bacteriol.* Abril de 1995;177(8):2008-2013. PMID: 7721693;
- Arai et al. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett.* 28 de agosto de 1995;371(1):73-76. PMID: 7664887;
- 10 Arthur et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 5 de octubre de 2012;338(6103):120-123. PMID: 22903521;
- 15 Callura et al. Tracking, Tuning and terminating microbial physiology using synthetic riboregulators. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;27(36):15898-15903. PMID: 20713708;
- Castiglione et al. The transcription factor DNR from *Pseudomonas aeruginosa* specifically requires nitric oxide and haem for the activation of a target promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology.* Septiembre de 2009;155(Pt 9):2838-2844. PMID: 19477902;
- 20 Chang, ed. (2007) "Use of Enzyme Artificial Cells for Genetic Enzyme Defects". In *Artificial Cells: Biotechnology, Nanomedicine, Regenerative Medicine, Blood Substitutes, Bioencapsulation, and Cell/Stem Cell Therapy.* World Scientific Publishing, págs. 147-159;
- 25 Clarkson et al. Diaminopimelic acid and lysine auxotrophs of *Pseudomonas aeruginosa* 8602. *J Gen Microbiol.* Mayo de 1971;66(2):161-169. PMID: 4999073;
- Cuevas-Ramos et al. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 22 de junio de 2010;107(25):11537-11542. PMID: 20534522;
- 30 Danino et al. Programmable probiotics for detection of cancer in urine. *Sci Transl Med.* 27 de mayo de 2015;7(289):289ra84. PMID: 26019220;
- 35 Deutscher. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* Abril de 2008;11(2):87-93. PMID: 18359269;
- Dinleyici et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM 1-745 in different clinical conditions. *Expert Opin Biol Ther.* Noviembre de 2014;14(11):1593-1609. PMID: 24995675;
- 40 Dobbelaere et al. Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2003;26(1):1-11. PMID: 12872834;
- 45 Eiglmeier et al. Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. *Mol Microbiol.* Julio de 1989;3(7):869-878. PMID: 2677602;
- Estrem et al. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 18 de agosto de 1998;95(17):9761-9766. PMID: 9707549;
- 50 Galimand et al. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* Marzo de 1991;173(5):1598-1606. PMID: 1900277;

Gardner et al. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 2000;403:339-342. PMID: 10659857;

- 5 Gerdes et al. Essential genes on metabolic maps. *Curr Opin Biotechnol*. Octubre de 2006;17(5):448-456. PMID: 16978855;

Gilbert et al. Molecular cloning of the phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. Enero de 1985;161(1):314-320. PMID: 2981805;

Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*. Agosto de 2008;6(8):613-624. PMID: 18628769;

- 15 Hasegawa et al. Activation of a consensus FNR-dependent promoter by DNR of *Pseudomonas aeruginosa* in response to nitrite. *FEMS Microbiol Lett*. 15 de septiembre de 1998;166(2):213-217. PMID: 9770276;

Hoeks et al. Adult issues in phenylketonuria. *Neth J Med*. Enero de 2009;67(1):2-7. PMID: 19155540;

Hoeren et al. Sequence and expression of the gene encoding the respiratory nitrous-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem*. 15 de noviembre de 1993;218(1):49-57. PMID: 8243476;

Hosseini et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev*. Mayo de 2011;69(5):245-258. PMID: 21521227;

Isabella et al. Deep sequencing-based analysis of the anaerobic stimulon in *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Genomics*. 20 de enero de 2011;12:51. PMID: 21251255;

Ivanovska et al. Pediatric drug formulations: a review of challenges and progress. *Pediatrics*. Agosto de 2014;134(2):361-372. PMID: 25022739; Kobe et al. Regulation and crystallization of phosphorylated and dephosphorylated forms of truncated dimeric phenylalanine hydroxylase. *Protein Sci*. Junio de 1997; 6(6):1352-1357. PMID: 9194198;

Kwok et al. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*. 29 de enero de 1985; 24(3):556-561. PMID: 2986678;

Leonard JV (2006). Disorders of the urea cycle and related enzymes. *Inborn Metabolic Diseases*, 4^a ed (págs. 263-272). Springer Medizin Verlag Heidelberg;

Longo et al. Phase 1 Trial of Subcutaneous rAvPAL-PEG in Subjects with Phenylketonuria. *Lancet*. 5 de julio de 2014; 384(9937):37-44;

Lopez G, Anderson JC. Synthetic Auxotrophs with Ligand-Dependent Essential Genes for a BL21(DE3) Biosafety Strain. *ACS Synth Biol*. 18 de diciembre de 2015;4(12):1279-1286. PMID: 26072987;

Macleod et al. Nutritional Management of Phenylketonuria. *Ann Nestle Eng*. Junio de 2010;68(2):58-69. PMID: 22475869;

Meadow et al. Biosynthesis of diaminopimelic acid and lysine in *Escherichia coli*. *Biochem J*. Julio de 1959;72(3):396-400. PMID: 16748796;

Miller (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY;

Moffitt et al. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization. *Biochemistry*. 30 de enero de 2007;46(4):1004-1012. PMID: 17240984;

Moore et al. Regulation of FNR dimerization by subunit charge repulsion. *J Biol Chem*. 3 de noviembre de 2006;281(44):33268-33275. PMID: 16959764;

Nougayrede et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 11 de agosto de 2006;313(5788):848-51. PMID: 16902142;

Olier et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes*. Noviembre-diciembre de 2012;3(6):501-509. PMID: 22895085;

Pi et al. Cloning and sequencing of the pheP gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. Junio de 1991;173(12):3622-3629. PMID: 1711024;

Pi et al. Topology of the phenylalanine-specific permease of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. Mayo de 1996;178(9):2650-2655. PMID: 8626334;

Pi et al. Functional consequences of changing proline residues in the phenylalanine-specific permease of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. Noviembre de 1998;180(21):5515-5519. PMID: 9791098;

Purcell et al. Towards a whole-cell modeling approach for synthetic biology. *Chaos*. Junio de 2013;23(2):025112. PMID: 23822510;

Ray et al. The effects of mutation of the anr gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 15 de noviembre de 1997;156(2):227-232. PMID: 9513270;

Reister et al. Complete genome sequence of the Gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *JBiotecnol*. 10 de octubre de 2014;187:106-107. PMID: 25093936;

Rembacken et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 21 de agosto de 1999;354(9179):635-639. PMID: 10466665;

Remington's *Pharmaceutical Sciences* (2012), 22^a ed. Mack Publishing Co, Easton, PA.

Salmon et al. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem*. 8 de agosto de 2003;278(32):29837-29855. PMID: 12754220;

Sarkissian et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2 de

marzo de 1999;96(5):2339-2344. PMID: 10051643;

Sat et al. The *Escherichia coli* mazEF suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol.* Marzo de 2003;185(6):1803-1807. PMID: 12618443;

5

Sawers. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* Junio de 1991;5(6):1469-1481. PMID: 1787797;

10 Schultz. Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* Julio de 2008;14(7):1012-1018. PMID: 18240278;

Sonnenborn et al. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 - features of a versatile probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2009;21:122-158;

15

Trunk et al. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol.* Junio de 2010;12(6):1719-1733. PMID: 20553552;

20 Ukena et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 12 de diciembre de 2007;2(12):e1308. PMID: 18074031;

Uden et al. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta.* 4 de julio de 1997;1320(3):217-234. PMID: 9230919;

25

Vockley et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med.* Febrero de 2014;16(2):188-200. PMID: 24385074;

30 Wanner et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* Enero de 1995;27(2):327-338. PMID: 7888622;

Williams et al. The gene *stIA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01. *Microbiology.* Agosto de 2005;151(Pt 8):2543-2550. PMID: 16079333.

35

Winteler et al. The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiology.* Marzo de 1996;142 (Pt 3):685-693. PMID: 8868444;

40 Wright et al. GeneGuard: A Modular Plasmid System Designed for Biosafety. *ACS Synth Biol.* 20 de marzo de 2015;4(3):307-316. PMID: 24847673;

45 Wu et al. Direct regulation of the natural competence regulator gene *tfoX* by cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in *Vibrios*. *Sci Rep.* 7 de octubre de 2015;5:14921. PMID: 26442598;

Xiang L, Moore BS. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. *J Bacteriol.* Junio de 2005;187(12):4286-4289. PMID: 15937191;

50 Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* Enero de 2009;37(Database issue):D455-D458. PMID: 18974178;

Zimmermann et al. Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*

depend on anr, a regulatory gene homologous with fnr of *Escherichia coli*. Mol Microbiol. Junio de 1991;5(6): 1483-1490. PMID: 1787798.

Ejemplos

5

Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la divulgación.

Los ejemplos no limitan en ningún caso la divulgación.

10 Ejemplo 1. Construcción de plásmidos PAL

Para facilitar la producción inducible de PAL en Nissle de *Escherichia coli*, el gen *PAL* de *Anabaena variabilis* ("PAL1") o *Photorhabdus luminescens* ("PAL3"), así como elementos de transcripción y traducción, se sintetizó (Gen9, Cambridge, MA) y se clonó en el vector pBR322. El gen *PAL* se colocó bajo el control de un promotor inducible. Se generaron plásmidos de alto y bajo número de copias para cada uno de *PAL1* y *PAL3* bajo el control de un promotor FNR inducible o un promotor Tet. Los promotores FNR de ejemplo se muestran en la **Tabla 3**. La organización y las secuencias de nucleótidos de estas construcciones se muestran en las **figuras 6-9**. Sin embargo, como se indicó anteriormente, se pueden usar otros promotores para impulsar la expresión del gen *PAL*, se pueden usar otros genes *PAL* y se pueden usar otros genes reguladores del metabolismo de la fenilalanina.

Ejemplo 2. Transformación de *E. coli*

Cada uno de los plásmidos descritos en esta invención se transformó en Nissle de *E. coli* para los estudios descritos en esta invención según las siguientes etapas. Todos los tubos, soluciones y cubetas se enfriaron previamente a 4 °C. Un cultivo nocturno de Nissle de *E. coli* se diluyó 1:100 en 5 ml de caldo de lisogenia (LB) que contenía ampicilina y se cultivó hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4-0,6. A continuación, las células de *E. coli* se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de agua a 4 °C. El *E. coli* se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0,5 ml de agua a 4 °C. El *E. coli* se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y finalmente se resuspendieron las células en 0,1 ml de agua a 4 °C. El electroporador se ajustó a 2,5 kV. Se añadió plásmido (0,5 µg) a las células, se mezcló mediante pipeteo y se añadió por pipeteo en una cubeta fría estéril. La cubeta seca se colocó en la cámara de muestra y se aplicó el pulso eléctrico. Se añadió inmediatamente un ml de medio SOC a temperatura ambiente y la mezcla se transfirió a un tubo de cultivo y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

40

Ejemplo 3. Comparación del metabolismo de la fenilalanina entre plásmidos de número de copias alto y bajo que expresan PAL1 y PAL2

Las bacterias manipuladas genéticamente que comprenden el mismo gen *PAL*, ya sea *PAL3* en un plásmido con bajo número de copias o plásmido con alto número de copias (SYN-pKU101 y SYN-PKU102) o *PAL3* en un plásmido con bajo número de copias o plásmido con alto número de copias (SYN-PKU201 y SYN-PKU202), se analizaron para determinar el metabolismo de la fenilalanina *in vitro*.

Las bacterias manipuladas se indujeron con tetraciclina anhidra (ATC), y a continuación se cultivaron en medio de cultivo complementado con 4 mM (660.000 ng/ml) de fenilalanina durante 2 horas. Las muestras se retiraron a las 0 horas, 4 horas y 23 horas, y las concentraciones de fenilalanina (**figura 15A**) y ácido transcinámico (TCA) (**figura 15B**) se

determinaron mediante espectrometría de masas, como se describe en los Ejemplos 24-26.

Se encontraron cepas de plásmidos de alto número de copias y bajo número de copias para metabolizar y reducir la fenilalanina a niveles similares (**figura 15**). Se observó una mayor reducción de los niveles de fenilalanina y un aumento de los niveles de TCA en las cepas que expresan PAL3.

Ejemplo 4. Transportador de fenilalanina: integración de PheP en el cromosoma bacteriano

En algunas realizaciones, puede ser ventajoso aumentar el transporte de fenilalanina en la célula, mejorando de este modo el metabolismo de la fenilalanina. Por lo tanto, se insertó una segunda copia del transportador de fenilalanina de alta afinidad nativo, PheP, impulsado por un promotor inducible, en el genoma de Nissle mediante recombinación homóloga. La organización de la construcción se muestra en la **figura 11**. El gen *pheP* se colocó cadena abajo del promotor P_{tet} y el represor de tetraciclina, TetR, se transcribió de forma divergente (véase, por ejemplo, la **figura 11**). Esta secuencia fue sintetizada por Genewiz (Cambridge, MA). Para crear un vector capaz de integrar la construcción TetR-PheP sintetizada en el cromosoma, se utilizó primero el ensamblaje de Gibson para añadir secuencias de ADN de 1000 pb homólogas al locus *lacZ* de Nissle en el plásmido pKD3 de origen R6K. Éste reconoce al ADN clonado entre estos brazos de homología para que se integre en el locus *lacZ* en el genoma de Nissle (**figura 10**). Se usó el ensamblaje de Gibson para clonar el fragmento TetR-PheP entre estos brazos. Se utilizó PCR para amplificar la región de este plásmido que contiene la secuencia completa de los brazos de homología, así como la secuencia de *pheP* entre ellos. Este fragmento de PCR se utilizó para transformar Nissle-pKD46 electrocompetente, una cepa que contiene un plásmido sensible a la temperatura que codifica los genes de recombinasa roja lambda. Después de la transformación, las células se cultivaron durante 2 horas antes de sembrarlas en placas sobre cloranfenicol a 20 µg/ml a 37 °C. El crecimiento a 37 °C cura el plásmido pKD46. Los transformantes que contenían *pheP* inducible por tetraciclina anhidra (ATC) eran lac-menos (lac-) y resistentes al cloranfenicol.

Ejemplo 5. Efecto del transportador de fenilalanina sobre la degradación de fenilalanina

Para determinar el efecto del transportador de fenilalanina sobre la degradación de fenilalanina, se evaluó la degradación de fenilalanina y acumulación de trans-cinamato lograda por bacterias manipuladas genéticamente que expresan PAL1 o PAL3 en plásmidos con un número bajo (LC) o alto (HC) de copias en presencia o ausencia de una copia de *pheP* impulsada por el promotor Tet integrado en el cromosoma.

Para los estudios *in vitro*, todas las incubaciones se realizaron a 37 °C. Los cultivos de Nissle de *E. coli* transformado con un plásmido que comprende el gen *PAL* impulsado por el promotor Tet se cultivaron durante una noche y a continuación se diluyeron 1:100 en LB. Las células se cultivaron con agitación (200 rpm) hasta la fase logarítmica temprana. Se añadió tetraciclina anhidra (ATC) a los cultivos a una concentración de 100 ng/ml para inducir la expresión de *PAL*, y las bacterias se cultivaron durante otras 2 horas. A continuación, se sedimentaron las bacterias, se lavaron y se resuspendieron en medio mínimo y se suplementaron con fenilalanina 4 mM. Se retiraron alícuotas a las 0 horas, 2 horas y 4 horas para la cuantificación de fenilalanina (**figura 16A**), y a las 2 horas y 4 horas para la cuantificación de cinamato (**figura 16B**), mediante espectrometría de masas, como se describe en los Ejemplos 24-26. Como se muestra en la **figura 16**, la expresión de *pheP* junto con *PAL* mejora significativamente la degradación de fenilalanina en comparación con *PAL* solo o *pheP* solo. En particular, la copia adicional de *pheP* permitió la degradación completa de fenilalanina (4 mM) en 4 horas (**figura 16A**). La **figura 16B**

representa los niveles de cinamato en muestras a las 2 horas y 4 horas después de la inducción. Dado que la producción de cinamato está directamente relacionada con la degradación de la fenilalanina, estos datos sugieren que la desaparición de la fenilalanina se debe al catabolismo de la fenilalanina y que el cinamato puede usarse como un biomarcador alternativo para la actividad de la cepa. La sobreexpresión de PheP mejora el metabolismo de la fenilalanina en bacterias manipuladas genéticamente.

En conclusión, en conjunción con *pheP*, incluso los plásmidos que expresan *PAL* con bajo número de copias son capaces de eliminar casi por completo la fenilalanina de una muestra de ensayo (**figuras 16A y 16B**). Además, sin desear estar ligado a la teoría, en algunas realizaciones que incorporan *pheP*, puede haber ventajas adicionales al usar un plásmido que expresa *PAL* con bajo número de copias conjuntamente con *pheP* con el fin de mejorar la estabilidad de la expresión de *PAL* mientras se mantiene un alto metabolismo de la fenilalanina y para reducir la presión de selección negativa sobre la bacteria transformada. En realizaciones alternativas, el transportador de fenilalanina se usa junto con un plásmido que expresa *PAL* de alto número de copias.

Ejemplo 6. Actividad del promotor FNR

Con el fin de medir la actividad promotora de diferentes promotores FNR, el gen *lacZ*, así como elementos de transcripción y traducción, se sintetizaron (Gen9, Cambridge, MA) y se clonaron en el vector pBR322. El gen *lacZ* se colocó bajo el control de cualquiera de las secuencias promotoras de FNR de ejemplo descritas en la **Tabla 3**. Las secuencias de nucleótidos de estas construcciones se muestran en las **Tablas 21-28** (SEQ ID NO 31-38). Sin embargo, como se indicó anteriormente, el gen *lacZ* puede ser impulsado por otros promotores inducibles con el fin de analizar las actividades de esos promotores, y pueden usarse otros genes en lugar del gen *lacZ* como lectura de la actividad del promotor. Como alternativa, se puede usar beta-galactosidasa como indicador, los resultados de ejemplo se muestran en la **figura 18**.

La **Tabla 21** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *lacZ* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fmr1} (SEQ ID NO: 3). La construcción comprende una fusión traduccional del gen *nirB1* de Nissle y el gen *lacZ*, en la que las fusiones de traducción están fusionadas en el marco al 8º codón de la región codificante de *lacZ*. La secuencia de P_{fmr1} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *lacZ* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.

La **Tabla 22** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *lacZ* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fmr2} (SEQ ID NO: 6). La construcción comprende una fusión traduccional del gen *ydfZ* de Nissle y el gen *lacZ*, en la que las fusiones de traducción están fusionadas en el marco al 8º codón de la región codificante de *lacZ*. La secuencia de P_{fmr2} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *lacZ* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.

La **Tabla 23** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *lacZ* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fmr3} (SEQ ID NO: 7). La construcción comprende una fusión traduccional del gen *nirB* de Nissle y el gen *lacZ*, en la que las fusiones de traducción usan solo la región promotora fusionada a un sitio de unión a ribosoma fuerte. La secuencia de P_{fmr3} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al

ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *lacZ* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.

- 5 La **Tabla 24** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *lacZ* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fnr4} (SEQ ID NO: 8). La construcción comprende una fusión traduccional del gen *ydfZ* de Nissle y el gen *lacZ*. La secuencia de P_{fnr4} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *lacZ* está subrayada en mayúsculas.
- 10 El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.

- La **Tabla 25** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *lacZ* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fnrS} (SEQ ID NO: 9). La construcción comprende una fusión traduccional del gen de ARN pequeño inducido de forma anaerobia, *fnrS1*, fusionado a *lacZ*. La secuencia de P_{fnrS} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *lacZ* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.
- 15
- 20

- La **Tabla 26** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fnr3} (SEQ ID NO: 7). La construcción comprende una fusión traduccional del gen *nirB* de Nissle y el gen *PAL3*, en la que las fusiones de traducción usan solo la región promotora fusionada a un sitio de unión a ribosoma fuerte. La secuencia de P_{fnr3} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *PAL3* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.
- 25
- 30

- La **Tabla 27** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fnr4} (SEQ ID NO: 8). La construcción comprende una fusión traduccional del gen *ydfZ* de Nissle y el gen *PAL3*. La secuencia de P_{fnr4} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *PAL3* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.
- 35

- La **Tabla 28** muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *PAL3* y un promotor FNR de ejemplo, P_{fnrS} (SEQ ID NO: 9). La construcción comprende una fusión traduccional del gen de ARN pequeño inducido de forma anaerobia, *fnrS1*, fusionado a *PAL3*. La secuencia de P_{fnrS} está en **negrita** en minúsculas y el sitio de unión al ribosoma predicho dentro del promotor está subrayado. La secuencia de *PAL3* está subrayada en mayúsculas. El sitio ATG está en **negrita** en mayúsculas y los sitios de clonación usados para sintetizar la construcción se muestran en mayúsculas normales.
- 40
- 45

Tabla 21

Secuencias de nucleótidos de construcción $P_{fnr1-lacZ}$, bajo número de copias (SEQ ID NO: 31)

GGTACCgtcagcataacacctgacctctcattaattgttcatgccgggeggcactatcgctcgccggcctttctc
 tcttactctgctacgtacatctatttctataaatccgttcaatttctgtgttttgcacaaacatgaaatatcagacaattcc
 gtgacttaagaaaatttatacaaatcagcaatataacccttaaggagtataaaaggtaatttgatttacatcaataag
 cgggggtgctgaatcgtaaggtaggcggtaatagaaaagaaatcgaggcaaaaATGagcaaatcagactcgc
 aattatGGATCCTCTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGG
 CGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCGGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGT
 AATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTG
 AATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
 AGCTGGCTGGAGTGCATCTTCCTGACGCCGATACTGTCTGTCGTCCCCTCAA
 ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCTATCTACACCAACGTGACCTATCC
 CATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCGCCGCGGAGAATCCGACAGGTTGTTAC
 TCGCTCACATTTAATATTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGA
 ATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCT
 GGGTCCGTTACGCCAGGACAGCCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGC
 ATTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAG
 TGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTT
 CCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACCACGCAAATCAGCGATTTCCAA
 GTTACCACTCTCTTAATGATGATTTACAGCCGCGCGGTACTGGAGGCAGAAG
 TTCAGATGTACGGCGAGCTGCGCGATGAACTGCGGGTGACGGTTTCTTTGTG
 GCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAAT
 TATCGATGAGCGTGCGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGCCTGAACGTT
 GAAAATCCGGAATGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCAGTG
 GTTGAATGACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGAC
 GTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGC
 AAGCCGTTGCTGATTGCGGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATG
 GTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGC
 AGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTG
 GTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATT
 GAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGG
 CTACCCGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGGATGGTGCAGCGCGATCGTAAT
 CACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCT
 AATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTCTGATCCTTCCCGCCCGG
 TACAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCC

CGATGTACGCGCGGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCGGTGCCGAAAT
GGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTGCCTGGAGAAATGCGCCCGCTGATCCT
TTGCGAATATGCCCACGCGATGGGTAAACAGTCTTGGCGGCTTCGCTAAATAC
TGGCAGGCGTTTCGTCAGTACCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACT
GGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGG
CTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAA
CGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCGGCGCTGACGGAAGCAAA
ACACCAACAGCAGTATTTCCAGTTCGTTTATCCGGGCGAACCATCGAAGTG
ACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGTTCCTGCACTGGATGG
TGGCACTGGATGGCAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTTG
GCCCCGAAGGTAAGCAGTTGATTGAACTGCCTGAACTGCCGCAGCCGGAGA
GCGCCGGACAACCTCTGGCTAACGGTACGCGTAGTGCAACCAAACGCGACCG
CATGGTCAGAAGCCGGACACATCAGCGCCTGGCAGCAATGGCGTCTGGCGG
AAAACCTCAGCGTGACACTCCCCTCCGCGTCCCACGCCATCCCTCAACTGAC
CACCAGCGGAACGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATT
AACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATGAAAAACAA
CTGCTGACCCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCGCCGCTGGATAACGACA
TTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCT
GGAAGGCGGCGGGGCCATTACCAGGCCGAAGCGGCGTTGTTGCAGTGCACGG
CAGATACACTTGCCGACGCGGTGCTGATTACAACCGCCCACGCGTGGCAGC
ATCAGGGGAAAAACCTTATTTATCAGCCGGAACCTACCGGATTGATGGGC
ACGGTGAGATGGTCATCAATGTGGATGTTGCGGTGGCAAGCGATACACCGC
ATCCGGCGCGGATTGGCCTGACCTGCCAGCTGGCGCAGGTCTCAGAGCGGG
TAAACTGGCTCGGCCTGGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACTG
CAGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTA
CGTCTTCCCGAGCGAAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTA
TGGCCACACCAAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAG
CCAACAACAACCTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGA
AGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGA
CTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTAC
CATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA

Tabla 22

Secuencias de nucleótidos de construcción Pfnr2-lacZ, bajo número de copias (SEQ ID NO: 32)

GGTACCcatttctctcatcccatccgggtgagagtcttttccccgacttatggtcatgcatgcatcaaaaag
 atgtgagcttgatcaaaaacaaaaatatttactcgacaggagtatttatattgcgccgttacgtgggttcgactgt
 aaatcagaaggagaaaaacacctATGacgacctacgategGATCCTCTGGCCGTCGTATTAC
 AACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCGGC
 ACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCG
 CCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTT
 CCGGCACCAAGAGCGGTGCCGGAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAC
 GCCGATACTGTGTCGTCTCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGC
 CTATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCC

CGCGGAGAATCCGACAGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATATTGATGAAAGC
TGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGT
TTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGACAGCCGTTT
GCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTC
GCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGAT
ATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGA
CCACGCAAATCAGCGATTTCCAAGTTACCACTCTCTTTAATGATGATTTTACG
CCGCGCGGTACTGGAGGCAGAAGTTCAGATGTACGGCGAGCTGCGCGATGA
ACTGCGGGTGACGGTTTCTTTGTGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGG
CACCGCGCCTTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGCGGTTATGCCGAT
CGCGTCACACTACGCCTGAACGTTGAAAATCCGGAACGTGGAGCGCCGAA
ATCCCGAATCTCTATCGTGCAGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGC
TGATTGAAGCAGAAGCCTGCGACGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAA
ATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGCGGCGTTAACCG
TCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGT
GCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTT
GCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTG
TATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAAT
CGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCCGCGATGAGCGAACGCGTAACG
CGGATGGTGACGCGCATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTG
GGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATC
AAATCTGTGCATCCTTCCCGCCCGGTACAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGAC
ACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGAC
CAGCCCTTCCCGGCGGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTGC
CTGGAGAAATGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATATGCCACGCGATGGGTA
ACAGTCTTGGCGGCTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTACCCCCG
TTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATAT
GATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACG
CCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGC
CGCATCCGGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAACAGCAGTATTTCCAGTTCC
GTTTATCCGGGCGAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAG
CGATAACGAGTTCTTGCATGGATGGTGGCACTGGATGGCAAGCCGCTGGC
AAGCGGTGAAGTGCCCTCTGGATGTTGGCCCGCAAGGTAAGCAGTTGATTGA
ACTGCCTGAACTGCCGCAGCCGGAGAGCGCCGGACAACCTCTGGCTAACGGT
ACGCGTAGTGCAACCAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGACACATCAG
CGCTGGCAGCAATGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGCGTGACACTCCCCTC
CGCGTCCCACGCCATCCCTCAACTGACCACCAGCGGAACGGATTTTTCATC
GAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCAC
AGATGTGGATTGGCGATGAAAAACAACCTGCTGACCCCGCTGCGCGATCAGT
TCACCCGTGCGCCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCA
TTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGG
CCGAAGCGGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCCGACGCGGTGC
TGATTACAACCGCCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCA
GCCGGAACCTACCGGATTGATGGGCACGGTGAGATGGTCATCAATGTGG
ATGTTGCGGTGGCAAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGACCT
GCCAGCTGGCGCAGGTCTCAGAGCGGGTAACTGGCTCGGCCTGGGGCCGC
AAGAAAATATCCCGACCGCCTTACTGCAGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCT

GCCATTGTCAGACATGTATAACCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAAACGGTCTG
CGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCACACCAAGTGGCGCGGCGAC
TTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGCCAACAACAACCTGATGGAACACAGC
CATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGT
TTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCG
GAATTCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAA
AATAA

Tabla 23

Secuencias de nucleótidos de construcción Pfnr3-lacZ, bajo número de copias (SEQ ID NO: 33)

GGTACCgtcagcataacaccctgacctctcattaattgttcatgcccggcgccactatcgctcgccgcttttctc
 tcttactctgctacgtacatctatttctataaatccgttcaattgtctgtttttgcacaaacatgaaatcagacaattcc
 gtgacttaagaaaatttatacaaatcagcaatataacccttaaggagtatataaaggtaatttgatttacatcaataag
 cggggttgctgaatcgtaaGGATCCctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatATGAC
 TATGATTACGGATTCTCTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
 CCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCGGCACATCCCCCTTTCGCCAGCT
 GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA
 GCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGC
 CGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCTGACGCCGATACTGTCGTCGTCCC
 CTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCTATCTACACCAACGTGAC
 CTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCGCCGCGAGAATCCGACAGGT
 TGTACTCGCTCACATTTAATATTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGA
 CGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG
 GCGCTGGGTGCGTTACGGCCAGGACAGCCGTTTGGCGTCTGAATTTGACCTG
 AGCGCATTTTTACGCGCCGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGC
 TGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGC
 ATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACCACGCAAATCAGCGATT
 TCCAAGTTACCACTCTCTTTAATGATGATTTACGCCGCGCGGTACTGGAGGC
 AGAAGTTCAGATGTACGGCGAGCTGCGCGATGAACTGCGGGTGACGGTTTC
 TTTGTGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGG
 TGAAATTATCGATGAGCGTGCGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGCCTG
 AACGTTGAAAATCCGGAACGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGT
 GCAGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCC
 TGCAGCTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGA
 ACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGCGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCT
 GCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGAT
 GAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCATCCG
 CTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCC
 AATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCG
 CGCTGGCTACCCGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGGATGGTGCAGCGCGAT
 CGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCAC
 GGCGTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCC
 GCCCGGTACAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTA
 TTTGCCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCGGTGCC

GAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTGCCTGGAGAAATGCGCCCGCT
GATCCTTTGCGAATATGCCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGCTTCGCT
AAATACTGGCAGGCGTTTCGTGAGTACCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGCT
GGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGT
GGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTG
TATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCGGCGCTGACGGA
AGCAAAACACCAACAGCAGTATTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCGAACCATC
GAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGTTCCTGCACT
GGATGGTGGCACTGGATGGCAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGG
ATGTTGGCCCGCAAGGTAAGCAGTTGATTGAACTGCCTGAACTGCCGCAGC
CGGAGAGCGCCGACAACCTCTGGCTAACGGTACGCGTAGTGCAACCAAACG
CGACCGCATGGTCAGAAGCCGGACACATCAGCGCCTGGCAGCAATGGCGTC
TGGCGGAAAACCTCAGCGTGACACTCCCCTCCGCGTCCCACGCCATCCCTCA
ACTGACCACCAGCGGAACGGATTTTGCATCGAGCTGGGTAAATAAGCGTTG
GCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATGAA
AAACAACCTGCTGACCCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCGCCGCTGGAT
AACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGATTGACCCTAACGCCTGGGTC
GAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCGGCGTTGTTGCA
TGCACGGCAGATACACTTGCCGACGCGGTGCTGATTACAACCGCCACGCG
TGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAACCTACCGGATT
GATGGGCACGGTGAGATGGTCATCAATGTGGATGTTGCGGTGGCAAGCGAT
ACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGACCTGCCAGCTGGCGCAGGTCTCA
GAGCGGGTAAACTGGCTCGGCCTGGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGC
CTTACTGCAGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATA
CCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAAT
TGAATTATGGCCACACCAAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCC
GCTACAGCCAACAACAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACG
CGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTG
GCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCG
GTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA

Tabla 24

Secuencias de nucleótidos de construcción Pfnr4-lacZ, bajo número de copias (SEQ ID NO: 34)

GGTACCcatttctctcatcccatccgggtgagagtctttcccccgaacttatggctcatgcatgcatcaaaaag
atgtgagcttgatcaaaaacaaaaatatttcactgacaggagtatttatattgcgccGGATCCctctagaat
aattttgtttaactttaagaaggagatacatATGACTATGATTACGGATTCTCTGGCCGTCG
TATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCT
TGCGGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAC
CGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCC
TGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTT
CCTGACGCCGATACTGTCTGTCGTCCTTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACG
ATGCGCCTATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTT
TGTTCCCGCGGAGAATCCGACAGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATATTGAT
GAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTGTATGGCGTTAAC

TCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGAC
AGCCGTTTGCCGCTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAA
ACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAG
ATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCA
TAAACCGACCACGCAAAATCAGCGATTTCCAAGTTACCACTCTCTTTAATGAT
GATTTTCAGCCGCGCGGTACTGGAGGCAGAAGTTCAGATGTACGGCGAGCTG
CGCGATGAACTGCGGGTGACGGTTTCTTTGTGGCAGGGTGAAACGCAGGTC
GCCAGCGGCACCGCGCCTTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGCGGT
TATGCCGATCGCGTCACACTACGCCTGAACGTTGAAAATCCGGAACGTGTGG
AGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCAGTGGTTGAACTGCACACCGCC
GACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGACGTGGTTTCCGCGAGGTG
CGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGCG
GCGTTAACCCTACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCA
GACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGT
GCGCTGTTTCGATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGC
TACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTG
CCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCCGCGATGAGCGAA
CGCGTAACGCGGATGGTGCAGCGCGATCGTAATACCCGAGTGTGATCATC
TGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTAT
CGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCCGGTACAGTATGAAGGCGGCG
GAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCGATGTACGCGCGCGTGG
ATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCGGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGC
TTTCGCTGCCTGGAGAAATGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATATGCCACGC
GATGGGTAACAGTCTTGGCGGCTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTGAG
TACCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGA
TTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTTCGGCTTACGGCGGTGATTTTG
GCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGA
CCGCACGCCGCATCCGGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAACAGCAGTATTT
CCAGTTCCGTTTATCCGGGCGAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTT
CGTCATAGCGATAACGAGTTCCTGCACTGGATGGTGGCACTGGATGGCAAG
CCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCCTCTGGATGTTGGCCCGCAAGGTAAGCAG
TTGATTGAACTGCCTGAACTGCCGCAGCCGGAGAGCGCCGGACAACCTCTGG
CTAACGGTACGCGTAGTGCAACCAAACGCGACCGCATGGTTCAGAAGCCGGA
CACATCAGCGCCTGGCAGCAATGGCGTCTGGCGGAAAAACCTCAGCGTGACA
CTCCCCCTCCGCGTCCACGCCATCCCTCAACTGACCACCAGCGGAACGGATT
TTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTT
TCTTTACAGATGTGGATTGGCGATGAAAAACAACCTGCTGACCCCGCTGCGC
GATCAGTTCACCCGTGCGCCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCG
ACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCAT
TACCAGGCCGAAGCGGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCCGAC
GCGGTGCTGATTACAACCGCCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAAACCTTA
TTATCAGCCGAAAAACCTACCGGATTGATGGGCACGGTGAGATGGTCATC
AATGTGGATGTTGCGGTGGCAAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGC
CTGACCTGCCAGCTGGCGCAGGTCTCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGCCTG
GGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACTGCAGCCTGTTTTGACCGCT
GGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAA
CGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCACACCAAGTGGCG

CGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGCCAACAACAACCTGATGGA
AACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATAT
CGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGT
ATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGCTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGG
TGTCAAAAATAA

Tabla 25

Secuencias de nucleótidos de construcción Pfnrs-lacZ, bajo número de copias (SEQ ID NO: 35)

GGTACCagttgttcttattggtggtgttctttaggtgcatcgtagtaaagttgtaacaaaagcaattttccgg
 ctgtctgtatacaaaaacgccgtaaagtttgagcgaagtcaataaaactctctacccattcagggaatatctctcttGG
 ATCCctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatatATGCTATGATTACGGATTCTC
 TGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCT
 TAATCGCCTTGCGGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
 GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGG
 CGCTTTGCCTGGTTTTCCGGCACCAAGCGGTGCCGGAAGCTGGCTGGAG
 TCGCATCTTCTGACGCCGATACTGTCTGTCGTCCCTCAAACCTGGCAGATGC
 ACGGTTACGATGCGCCTATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAA
 TCCGCCGTTTGTTCGCCGCGGAGAATCCGACAGGTTGTTACTCGCTCACATTT
 AATATTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGAT
 GGC GTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCTGGTTACG
 GCCAGGACAGCCGTTTGGCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGC
 CGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTA
 TCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCG
 TTGCTGCATAAACCGACCACGCAAATCAGCGATTTCCAAGTTACCACTCTCT
 TTAATGATGATTTTCAGCCGCGCGGTACTGGAGGCAGAAAGTTCAGATGTACG
 GCGAGCTGCGCGATGAACTGCGGGTGACGGTTTCTTTGTGGCAGGGTGAAA
 CGCAGGTGCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGC
 GTGGCGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGCCTGAACGTTGAAAATCCGG
 AACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCAGTGGTTGAACTGC
 ACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGACGTCGGTTTCC
 GCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGC
 TGATTGCGGCGGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCAT
 GGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTT
 TAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTG
 TGCAGCCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCAC
 GGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCCGCG
 ATGAGCGAACCGGTAACGCGGATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGT
 GTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGAC
 CGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCCCGGTACAGTATG
 AAGGCGGCGGAGCCGACACCGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACG
 CGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCGGTGCCGAAATGGTCCATCA
 AAAAATGGCTTTTCGTGCCTGGAGAAATGCGCCCCGCTGATCCTTTGCGAATA
 TGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGCTTCGCTAAATACTGGCAGGC
 GTTTCGTACGTACCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGAT

CAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGC
GGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGG
TCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCGGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAAC
AGCAGTATTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCGAACCATCGAAGTGACCAGCGA
ATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGTTCCTGCACTGGATGGTGGCACTG
GATGGCAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTTGGCCCCGAA
GGTAAGCAGTTGATTGAACTGCCTGAACTGCCGCAGCCGGAGAGCGCCGGA
CAACTCTGGCTAACGGTACGCGTAGTGCAACCAAACGCGACCGCATGGTCA
GAAGCCGGACACATCAGCGCCTGGCAGCAATGGCGTCTGGCGGAAAACCTC
AGCGTGACACTCCCCTCCGCGTCCCACGCCATCCCTCAACTGACCACCAGCG
GAACGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCA
GTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATGAAAAACAACCTGCTGACC
CCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCGCCGCTGGATAACGACATTGGCGTA
AGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCG
GCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCGGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACA
CTTGCCGACGCGGTGCTGATTACAACCGCCACGCGTGGCAGCATCAGGGG
AAAACCTTATTTATCAGCCGGAACCTACCGGATTGATGGGCACGGTGAG
ATGGTCATCAATGTGGATGTTGCGGTGGCAAGCGATACACCGCATCCGGCG
CGGATTGGCCTGACCTGCCAGCTGGCGCAGGTCTCAGAGCGGGTAACTGG
CTCGGCCTGGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACTGCAGCCTGTT
TTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCGTACGTCTTCCC
GAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCACA
CCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGCCAACAACA
ACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATG
GCTGAATATCGACGGTTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAG
CCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAG
TTGGTCTGGTGTCAAAAATAA

Tabla 26

Secuencias de nucleótidos de construcción Pfnr3-PAL3, bajo número de copias (SEQ ID NO: 36)

GGTACCgtcagcataacacctgacctctcattaattgttcatgccggcgcgactatcgtegtcggcctttctc
tcttactctgctacgtacatctattctataaatccgttcaatttgtctgtttttgcacaaacatgaaatatcagacaattcc
gtgacttaagaaaatttatcaaatcagcaatataccccttaaggagtatataaagggaatttgatttacatcaataag
cgggggtgctgaatcggttaaGATCCctctagaataattttgtttaactttaagaaggagatatatATGAA
AGCTAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCT
TTGGAAGATATCTATGACATTGCGGATAAAACAAAAAAAGTAGAAATATCA
ACGGAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCTGTGAAAAATTAGAGGAAAAA
TTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGATTTGGAGGGAAT
GCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGT
TAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAACCTTGTATTAA
GCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCA
GACCAATTGTGCTCAAGCAATTGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTCC
TCTGGTTTCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTAT
CTTATATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGCGC

AGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAACGTGCAGGGTTGACACCATTATC
GTTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTC
AGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAACTGGAAAACTATTTAAAGCCTC
AATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAAGCATTACTTGCATCTCATGAACATT
ATGATGCCCGGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGG
CAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATC
TGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGTCGTCATCAAGAAATTACCCA
ACTAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTA
TTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAAATATTGGAACGG
GAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGATCCAGAAAAATGGCGAT
GTTCTACACGGTGGAATTTTATGGGGCAATATGTCGCCCGAACAATGGAT
GCATTA AAACTGGATATTGCTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGG
CTCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTGAGTCCG
ACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAACCTTCTCAAACCGCTT
TAGTTGCTGCAATTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGC
CACAGAACAATACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAA
GATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTC
TGGTAGTTTGTCAGGCCATTTCATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCC
TGAAACTGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATC
ACTGATCGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTA
ATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGAATAA

Tabla 27

Secuencias de nucleótidos de construcción Pfnr4-PAL3, bajo número de copias (SEQ ID NO: 37)

GGTACCcatttctctcatcccatcggggtgagagtcttttccccgacttatggetcatgcatgcatcaaaaaag
atgtgagcttgatcaaaaaacaaaaatatttctcgcacaggagtatttatattgccccGGATCCctctagaat
aattttgtttaactttaagaaggagatatatatATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGCCAACCATT
ATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATTGCGA
TAAAACAAAAAAAAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAACTTTTGACGC
ATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATG
GAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTGAGA
AAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTTAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGG
GGACTATATGTCCAAACCTTGATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTT
TCTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCAATTG
TTGATCATATTAATCATGACATTGTTCCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCAGTG
GGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGAGCATTATGTG
GTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAA
TTAAACGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTG
CTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGAATCAGTGCAATCACCGTCAT
TAAACTGGAAAACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTT
GAAGCATTACTTGCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTCAACAAGTAA
AAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGC
AGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAA
AGCTTGTCGTCATCAAGAAATTACCAACTAAATGATACCTTACAGGAAGTT

TATTCAATTGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAG
CTACCGCTCGGAAAAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATC
CATTGATAGATCCAGAAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAATTTTATGG
GGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAAAACTGGATATTGCTTTAAT
TGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTC
GTGGATTACCTAATTCAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAA
AGGCGTCCAACCTTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCATGATTGT
GCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGAACAATACAATCAAGATATTG
TCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATT
ACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCATTTCATCTTC
GCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTACCATGCAGT
ACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCATTGGATGAAGATATA
ATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCA
TGCTGGAAGAATAA

Tabla 28

Secuencias de nucleótidos de construcción PfnrS-PAL3, bajo número de copias (SEQ ID NO: 38)

GGTACCagttgttcttattggtggtgtgctttatggttgcacgtagtaaatggttgaacaaagcaatttttcggt
 ctgtctgtatacaaaaacgcgtaagtttgagcgaagtcaataaaactctctaccattcagggaatattctctcttGG
 ATCCctctagaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatATGAAAGCTAAAGATGTTCA
 GCCAACCATTTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTAT
 GACATTGCGATAAAACAAAAAAAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGA
 ACTTTTGACGCATGGTTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGA
 GGTTATATATGGAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTG
 CCATTTGAGAAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTAACTTTTCTTTCTG
 CTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAACCTTGTATTAAAGCGTCACAATTTAC
 TATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCT
 CAAGCAATTGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTCTCTGGTTCCTCGCTA
 TGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGA
 GCATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACGCTG
 CTGAAGCAATTAACGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAGCCAAAG
 AAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGTAATGTCAGGAATCAGTGCAA
 TCACCGTCATTAAACTGGAAAACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGC
 CTTTGCTGTTGAAGCATTACTTGCATCTCATGAACATTATGATGCCCCGATT
 CAACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGT
 AATTTATTTGGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAAC
 AAGCCAATAAAGCTTGTGTCATCAAGAAATTACCCAATAAATGATACCTT
 ACAGGAAGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCA
 GAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTA
 ATGATAATCCATTGATAGATCCAGAAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAA
 ATTTTATGGGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAAAACTGGATAT
 TGCTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACC
 GTTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTCCGACACCCGGCATGTATCA
 AGGTTTTAAAGGCGTCCAACCTTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTTCG

CATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGAACAATACAATC
 AAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGA
 GCAGAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCC
 ATTCATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTT
 ACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCATTGGA
 TGAAGATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTG
 CCAGAAATCATGCTGGAAGAATAA

Cada uno de los plásmidos se transformó en Nissle de *E. coli*, como se ha descrito anteriormente. Los cultivos de Nissle de *E. coli* transformado se cultivaron durante una noche y a continuación se diluyeron 1:200 en LB. Las células se cultivaron con agitación a 250 rpm de forma aerobia o anaerobia en una cámara anaerobia Coy suministrada con N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %. Después de 4-6 horas de incubación, se recogieron muestras y se analizó la actividad del promotor realizando ensayos de β-galactosidasa (Miller, 1972). Como se muestra en la **figura 20**, las actividades de los promotores FNR mejoraron mucho en condiciones anaerobias en comparación con las condiciones aerobias.

Ejemplo 7. Medición de la actividad de un promotor FNR

Para determinar la cinética de la expresión génica impulsada por el promotor FNR, cepas de *E. coli* que albergan un gen de fusión *fnrS-lacZ* con un número bajo de copias (**figura 19A**) se cultivaron de forma aerobia con agitación a 250 rpm. Los cultivos se dividieron después de 1 hora y a continuación se incubaron de forma aerobia o de forma anaerobia en una cámara anaerobia Coy (que suministraba N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %) a 37 °C. La actividad del promotor se midió en función de la actividad de la β-galactosidasa usando un ensayo colorimétrico estándar (Miller, 1972). La **figura 19B** demuestra que el promotor *fnrS* comienza a impulsar la expresión génica de alto nivel en 1 h. en condiciones anaerobias. Las curvas de crecimiento de cultivos de células bacterianas que expresan *lacZ* se muestran en la **figura 19C**, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Ejemplo 8. Producción de PAL a partir del promotor FNR en *E. coli* recombinante

Los cultivos de Nissle de *E. coli* transformados con un plásmido que comprende el gen *PAL* impulsado por cualquiera de los promotores FNR de ejemplo se cultivaron durante una noche y a continuación se diluyeron 1:200 en LB. Las células bacterianas pueden comprender además el gen *pheP* impulsado por el promotor Tet e incorporado en el cromosoma. Se añadió ATC a los cultivos a una concentración de 100 ng/ml para inducir la expresión de *pheP*, y las células se cultivaron con agitación a 250 rpm, ya sea de forma aerobia o anaerobia, en una cámara anaerobia Coy suministrada con N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %. Después de 4 horas de incubación, las células se sedimentaron, se lavaron y se resuspendieron en medio mínimo M9 complementado con glucosa al 0,5 % y fenilalanina 4 mM. Se recogieron alícuotas a las 0 horas, 2 horas, 4 horas y 24 horas para la cuantificación de fenilalanina (**figura 20**). Como se muestra en la **figura 20B**, las bacterias manipuladas genéticamente que expresan *PAL3* impulsadas por el promotor FNR son más eficaces para eliminar la fenilalanina del medio de cultivo en condiciones anaerobias, en comparación con las condiciones aerobias (**figura 20A**). La expresión de *pheP* junto con *PAL3* redujo aún más los niveles de fenilalanina.

Ejemplo 9. Degradación de fenilalanina en *E. coli* recombinante con y sin sobreexpresión de *pheP*

Las cepas SYN-PKU304 y SYN-PKU305 contienen plásmidos de bajo número de copias que albergan el gen *PAL3* y una copia de *pheP* integrada en el locus *lacZ*. Las cepas SYN-PKU308 y SYN-PKU307 también contienen plásmidos de bajo número de copias que albergan el gen *PAL3*, pero carecen de una copia de *pheP* integrada en el locus *lacZ*. En las cuatro cepas, la expresión de *PAL3* y *pheP* (cuando corresponda) está controlada por un promotor dependiente del nivel de oxígeno.

Para determinar las velocidades de degradación de fenilalanina en Nissle de *E. coli* manipulada con y sin *pheP* en el cromosoma, se diluyeron cultivos de una noche de SYN-PKU304 y SYN-PKU307 1:100 en LB que contenía ampicilina, y los cultivos de una noche de SYN-PKU308 y SYN-PKU305 se diluyeron 1:100 en LB que contenía kanamicina. Todas las cepas se cultivaron durante 1,5 horas antes de colocar los cultivos en una cámara anaerobia Coy que suministraba N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %. Después de 4 horas de inducción, las bacterias se sedimentaron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en 1 ml de tampón de ensayo. El tampón de ensayo contenía medio mínimo M9 complementado con glucosa al 0,5 %, bicarbonato de sodio al 8,4 % y fenilalanina 4 mM.

Para el ensayo de actividad, los recuentos de partida de unidades formadoras de colonias (ufc) se cuantificaron utilizando dilución en serie y siembra. Se extrajeron alícuotas de cada ensayo celular cada 30 minutos durante 3 horas para la cuantificación de fenilalanina mediante espectrometría de masas. Específicamente, se sedimentaron 150 µl de células bacterianas y el sobrenadante se recogió para análisis LC-MS, con medio de ensayo sin células utilizado como punto de tiempo cero. La **figura 21** muestra la degradación de fenilalanina observada para cepas con *pheP* en el cromosoma (SYN-PKU304 y SYN-PKU305; izquierda), así como cepas que carecen de *pheP* en el cromosoma (SYN-PKU308 y SYN-PKU307; derecha). Estos datos muestran que la sobreexpresión de *pheP* es importante para aumentar las velocidades de degradación de la fenilalanina en los probióticos sintéticos.

Ejemplo 10. Actividad de cepas con inserciones de PAL3 cromosómicas únicas y múltiples

Para evaluar el efecto del sitio de inserción y el número de inserciones en la actividad de las bacterias manipuladas genéticamente, se midió la actividad *in vitro* de cepas con diferentes inserciones únicas de PAL3 en diferentes localizaciones cromosómicas y con múltiples inserciones PAL3

Las células se cultivaron durante una noche en LB y se diluyeron 1:100. Después de 1,5 horas de crecimiento, los cultivos se colocaron en una cámara anaerobia Coy suministrando N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %. Después de 4 horas de inducción, las bacterias se resuspendieron en tampón de ensayo que contenía fenilalanina 50 mM. Se retiraron alícuotas de los ensayos celulares cada 20 min durante 1,5 horas para la cuantificación del trans-cinamato por absorbancia a 290 nm. Los resultados se muestran en la **figura 22 y 23** y en la **Tabla 39** y la **Tabla 40**. La **figura 22** representa las concentraciones de trans-cinamato (actividad PAL) para cepas que comprenden inserciones de PAL3 únicas en diversas localizaciones del cromosoma. La **figura 23** representa las concentraciones de trans-cinamato (actividad PAL) para cepas que comprenden múltiples inserciones de PAL3 en diversas localizaciones del cromosoma.

Tabla 39. Actividad de varias cepas que comprenden inserciones cromosómicas de PAL3 únicas en varios sitios

Inserción:	Cepa:	velocidad (umol/h/1e9 células)
<i>agal/rsml</i>	SYN-PKU520	1,97
<i>vicS/nepl</i>	SYN-PKU521	2,44
<i>cea</i>	SYN-PKU522	ND
<i>malEK</i>	SYN-PKU518	1,66
<i>malPT</i>	SYN-PKU523	0,47

Tabla 40. Actividad *in vitro* de varias cepas que comprenden una o más inserciones

cromosómicas de PAL3

Genotipos:	Cepa	velocidad ($\mu\text{mol/h}/1\text{e}9$ células)
<i>agal:PAL</i> , <i>cea:PAL</i> , <i>matPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>thyA-</i>	SYN-PKU512	6,76
<i>agal:PAL</i> , <i>yicS:PAL</i> , <i>cea:PAL</i> , <i>matPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>thyA-</i>	SYN-PKU5 11	7,65
<i>malPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i>	SYN-PKU524	2,89
<i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>ara-LAAD</i>	SYN-PKU702	1,53
<i>malPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>ara-LAAD</i>	SYN-PKU701	2,65
<i>malPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>agal:pheP</i> , <i>ara-LAAD</i>	SYN-PKU703	3,14
<i>yicS:PAL</i> , <i>malPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>ara-LAAD</i>	SYN-PKU704	3,47
<i>yicS:PAL</i> , <i>malPT:PAL</i> , <i>malEK:PAL</i> , <i>lacZ:pheP</i> , <i>agal:pheP</i> , <i>ara-LAAD</i>	SYN-PKU705	3,74

Ejemplo 11. Actividad de una cepa con cinco copias cromosómicas de PAL3

- 5 Se evaluó la actividad de una cepa SYN-PKU511, una cepa que comprende cinco copias integradas de un PAL3 controlado de forma anaerobia (FNR) y un pheP controlado de forma anaerobia integrado en el locus lacZ.

- 10 Las bacterias manipuladas genéticamente se cultivaron durante una noche, se diluyó y se dejaron crecer durante otras 2,5 horas. A continuación, los cultivos se colocaron en una cámara anaerobia Coy que suministró N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %. Después de 3,5 horas de inducción en medio que contenía fenilalanina (fenilalanina 4 mM), se prepararon extractos de células completas cada 30 minutos durante 3 horas y la fenilalanina se cuantificó mediante espectrometría de masas. Los resultados se muestran en la **figura 24**.
- 15 La actividad *in vitro* de las células fue de 8 $\mu\text{mol/h}/1\text{e}9$ células. Los niveles de fenilalanina caen aproximadamente a la mitad de los niveles originales después de 2 horas.

Ejemplo 12. Actividad de una cepa que expresa LAAD

- 20 Para evaluar si la expresión LAAD se puede utilizar como un medio de degradación alternativo, adicional o complementario de fenilalanina a PAL3, la capacidad de la cepa manipulada genéticamente SYN-PKU401, que contiene un plásmido con alto número de copias que expresa LAAD impulsado por un promotor inducible por Tet, se midió a diversas concentraciones de células y a distintos niveles de oxígeno.

- 25 Los cultivos de una noche de SYN-PKU401 se diluyeron 1:100 y se cultivaron hasta la fase logarítmica temprana antes de la inducción con ATC (100 ng/ml) durante 2 horas. Las células se centrifugaron y se incubaron de la siguiente manera.

- Las células (1 ml) se incubaron de forma aerobia en un tubo de cultivo de 14 ml, agitando a 250 rpm (**figura 25A y B**). Para condiciones microaerobias, las células (1 ml) se incubaron en un tubo cónico de 1,7 ml sin agitar. Las células se incubaron de forma anaerobia en una cámara anaerobia Coy que suministraba N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 % (**figura 25B**). Se extrajeron alícuotas de los ensayos celulares cada 30 minutos durante 2 horas para la cuantificación de fenilalanina mediante espectrometría de masas, y los resultados se muestran en las **figura 25A y 25B**. La **figura 25A** muestra la actividad aerobia dependiente de la concentración celular. La actividad en condiciones aerobias es ~50 umol/h/1e9 células, y se retiene algo de actividad en condiciones microaerobias, lo que puede permitir la actividad en ambientes con concentraciones de oxígeno menores que el aire ambiente. La actividad de SYN-PKU401 en condiciones microaerobias es comparable a SYN-PKU304 en condiciones anaerobias, aunque la actividad parece ser dependiente de la densidad celular.
- La **Tabla 41** y la **Tabla 42** contienen construcciones de LAAD de interés. La **Tabla 41** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica LAAD de *Proteus mirabilis* y un gen represor de Tet y una secuencia de promotor Tet y RBS y región líder, en un plásmido de SEQ ID NO: 39, con la secuencia de *LAAD* subrayada la secuencia de TetR en cursiva y la secuencia de promotor Tet en negrita y el RBS y la región líder subrayados y en cursiva. La **Tabla 42** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo que comprende un gen que codifica *araC* y un gen que codifica LAAD de *Proteus mirabilis* y una secuencia de promotor inducible por arabinosa (ParaBAD) para la inserción cromosómica en el operón de arabinosa endógeno (SEQ ID NO: 40), con la secuencia de *araC* subrayada y la secuencia de promotor ParaBAD en negrita y la secuencia de LAAD en cursiva y el RBS y región líder subrayados y en cursiva.

En algunas realizaciones, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 99 % homóloga a la Secuencia de ADN de SEQ ID NO: 20-42, o un fragmento funcional de la misma.

Tabla 41. LAAD impulsada por un promotor inducible por Tet en un plásmido

Secuencias de nucleótidos de construcción TetR-plásmido LAAD (SEQ ID NO: 39)	

*Tiaagaccacatttcacatttaagttgttttttaacccgcataatgatcaattcaagccgaataagaaggctggctctgcacc
ttggatgataaataatcagatagcttgcgaataatggcggcatactatcagtagtaggtgttcccttctctttagcgacttg
atgctcttgatcttccaatcgcacacctaagtaaaatgccccacagcgctgagtgcatataatgcattctctagtgaaaa
ccttgttggcataaaaaggctaattgatttgcagagttcactatgttttctgtaggcggtgacctaataatgacttttgcctcat
cgcatgacttagtaagcacatctaaaaacttttagcggttattacgtaaaaaatcttgccagctttcccttctaaaaggcga
aagtgagtaggtgactatcaacatctcaatggcgaaggcgtagcgaagcccgcttatttttacaatgccaalacaatgt
aggctgctctacacctagcttctggcgagttacgggttggtaaaccttgcattccgacctcattaagcagctcctaagcgt
gttaacacatttacttttactaacttagacatcattaattcctaattttgttgacactctatcattgatagagttattttaccactc
cctatcagtgatagagaaaagtgaactctagaataaattttgttgaactttaagaaggagatalacatgaacatttcaagg
agaaagctacttttaggtgttggctgctggcggttttagcaggtggtgctggctttagtccaatggttccgctgacggcgaatt
tgtgaagctaaatcaagagcatcatttgttgaaggtacgcaagggtcttctcctaagaagcagatgtagtgattattgtgctc
ggtattcaaggatcatgaccgtattaaaccttctgaacgtggtatgagtgctactatctagaaaaaggctcagattgcccgtg
agcaatcagggcgtgcatagccaaattattagttaccaaacatcgccagaaatcttccattacaccattatgggaaaatatta
tggcgtggcatgaatgagaaaattgtgctggatacagttatcgtactcaaggtcgtgtagaagcgtgagatgaaaaagc
attagataaagctcaagcgtgcatcaaaacagctaaagaagcggcaggttttgatacaccattaataactcgcatcattaaggt
gaagagctatcaaatcgcttagctcggtcctcaaacgcatggactgttctgctcatttgaagaagattcaggtctgttgatcctga
aacaggcacacctgcactcgctcgttatccaaacaaatcggtgtgaaaatttatacactgtgcagtaagaggtattgaaact
gggggtggtaaaatctctgatgtggtgagtgagaaaaggcggtgaaatttatacactgtgcagtaagaggtattgaaact
cggtttattatgggcaatattggtattgatcccaacgctcaatgtatatctatcacaacaacgtgtctcaggggttctgtgca
ccacgtggtatgtgcatttaccatattggtattcattccgcaacaagcggatggtactatgcccgttcaccacgtatctttacg
agttcaatagtaagatagcttctgtagggcctaaatttatgcacttattaggtggcgagaggtaccgttggaaattcttattg
gtgaagatctatttattcattttaaattccgaccttgggaatttagatgaaaaaacaccattcgaacaattccgagttgccacgg
caacacaaaatacgcacacttagatgctgttttccaagaatgaaaacagaattcccagttattgaaaaatcagaagttgttga
cgttgggtgcccgttgtagtccaacatttgatgaattacattctgaggtcaagaataccagggcttagtgattaacac
ggcaacagtggtgggtatgacagaaggcccgaggggtgaagtgaccgctgatatgtcatgggcaagaacacctgttatt
gatccaacgccgttttagtttgatcgttttaagaagtaa*

Tabla 42. Secuencia de LAAD impulsada por el promotor AraBAD para la inserción en el operón Ara

Secuencias de nucleótidos de construcción de AraC-promotor ARABAD-LAAD (SEQ ID NO: 40)

TtattcacaaactgccttaaaactgctcggactcgccccgggtgcatTTTTTaaatactcgcgagaaatagagttgatcgcaaaa
cgcacattgcgaccgacgggtggcgataggcatccgggtgggtgctcaaaagcagcttcgcctgactgatcgctggctcctcgc
gccagcttaatacgtaatccctaactgctggcggaacaaatcgacagacgcgacggcgacagcgacacatgctgtgcga
cgctggcgatataaaaattactgctgccaggtgatcgctgatgtactgacaagcctcgcgtaccgattatccatcggtggatg
gagcgactcgttaatcgcttccatcgcccgagtaacaattgctcaagcagatttatgccagcaattccgaatagcgcccttcc
ccttgcggcgattaatgatttgcctcaaacagggtcgctgaaatcgcgctgggtcgcttcacccggcgaaagaacccggtattg
gcaaatatcgacggccagtttaagccattcatgccagtggcgcgacgaaagtaaacccactggtgataccattcgtgag
cctccggatgacgaccgtagtgtgaatctctccaggcggggaacagcaaaatcacccggctcgccagacaaaattctcgtcc
ctgatttttaccacccctgaccgcgaatggtgagattgagaatataacctttcattccagcggtcggtcgataaaaaaatcg
agataaccgttggcctcaatcgcggttaaacccgccaccagatggcggttaaacgagtatccggcgacgaggggacattttg
cgcttcagccaacttttatactccgccattcagagaagaaccaattgtccatattgcatcagacattgccgtcactgctgtt
ttactggctcttctcgtaaccaacggtaacccgcttattaaaagcattctgtaacaaagcgggaccaaagccatgacaaa
aacgcgtaacaaaagtgtctataatcacggcagaaaagtcacattgattattgacggcgctcacatttgcctatgccatagcat
ttttaccataagattagcggtacccgctgacgcttttttgcactctctactgttttccatAcctctagaaataattttgtttaa
ctttaagaaggagataalacatgatgaacatttcaaggagaaagctacttttaggtgtgtgtgctcgggcggtttagcagggtgg
tgcggctttagttccaatggttgcggtgacggcaaatgttgggaagctaaatcaagagcatatttgaagggtacgcaa
ggggctcttccaaagaagcagatgtagtgatttgggtgcccgttattcaagggaatcagaccgtattaaccttgcctgaac
gtggatgagtgacactatcttagaaaagggtcagattgccgtgagcaatcaggccgtgcatacagccaaattatttagtta
ccaaacatcgccagaaatcttccattacaccattatgggaaatattatggcggtgcatgaatgagaaaattgggtgcgga
taccagttatcgactcaaggctggtgtagaagcgctggcagatgaaaaagcatttagataaagctcaagcgtggatcaaaa
cagctaaagaagcggcaggtttgatalacaccattaaatctcgcacattaaagggtgaagagctacaaatcgcttagtcg
gtgctcaaacgccatggactgttgccttgaagaagattcaggctctgttgatcctgaaacaggcacacctgcactcgc
tcgttatgccaacaaatcggtgtgaaaaattataccaactgtgcaglaagaggtattgaaactcggggtggtaaaaatctct
gatgtgtgagtgagaaaagggcggtataaaacgctcdaagttgtactcgtgggggtatctggctcgcttatttatgggca
atatgggtattgatacccaacgctcaatgtatctatcacaacacgctcaggggttctggtgcaccacgtggtaat
gtgcatttaccatggatttcccggaacaaagcggatggtaactatgccgttgaccacgtatctttacgagttcaatag
tcaagatagcttctgtagggcctaaatttatgcacttattaggtggcgagagttaccgttggaaattcttattgggtgaag
atctatttattcattttaaattgccgaccttgggaatttagatgaaaaaacacattcgaaacattccgagttgccacggca
acacaaaatagcaacacattagatgctgtttccaaagaatgaaaacagaattccagttttgaaaaatcagaagttgtt
gaacgttgggggtcggtgtgagtcacacatttgaatlaacatttctgaggtcaagaataaccaggttagtgatt
aacacggcaacagtggtgggtatgacagaaggcccgccagcggtgaagtgaccgctgatatgtcatgggcaagaa
acctgttattgatccaacgcggtttaggttgatcggtttaaagaagtaa

Ejemplo 13. Eficacia de bacterias que expresan PAL en un modelo de ratón de PKU

- 5 Para los estudios *in vivo*, se obtuvieron ratones *BTBR-Pah^{enu2}* de Jackson Laboratory y se criaron para homocigosidad para el uso como un modelo de PKU. Se cultivaron bacterias que albergaban un plásmido de origen pSC101 de bajo número de copias que expresa *PAL3* del promotor Tet, así como una copia de *pheP* impulsada por el promotor Tet integrado en el genoma (SYN-PKU302). SYN-PKU1 fue inducido por ATC durante 2 horas antes de la administración. Las bacterias se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se administraron 10⁹ bacterias SYN-PKU302 inducidas por ATC o bacterias Nissle de control a los ratones mediante sonda oral.

- 15 Al comienzo del estudio, a los ratones se les dio agua que se complementó con 100 microgramos/ml de ATC y sacarosa al 5 %. Los ratones se mantuvieron en ayunas retirando la comida durante una noche (10 horas) y se recogieron muestras de sangre mediante sangrado mandibular a la mañana siguiente para determinar los niveles de fenilalanina basales. Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados y se centrifugaron a 2G durante 20 min para producir plasma, que a continuación se extrajo y se almacenó a -80 °C. Se les dio comida a los ratones de nuevo y se les administró por sonda después de 1 h. con 20 100 µl (5x10⁹ UFC) de bacterias que previamente habían sido inducidas durante 2 horas con ATC. Los ratones se volvieron a poner con comida durante 2 horas. Las muestras de plasma se prepararon como se ha descrito anteriormente.

La **figura 26A** muestra los niveles de fenilalanina antes y después de la alimentación, y la **figura 26B** muestra el cambio porcentual (%) en los niveles de fenilalanina en sangre antes y después de la alimentación como promedio del grupo de hombres o mujeres ($p < 0,01$).
 5 Como se muestra en la **figura 26**, los ratones PKU tratados con SYN-PKU1 exhiben un aumento post-alimentación significativamente reducido en los niveles de fenilalanina en suero en comparación con los controles.

Ejemplo 14. Eficacia de las bacterias que expresan *PAL* tras la exposición subcutánea a fenilalanina
 10

Se cultivó Nissle de *E. coli* (SYN-PKU901) resistente a estreptomicina a partir de reservas congeladas hasta una densidad de 10^{10} células/ml. Se cultivaron bacterias que contenían una copia de *pheP* bajo el control de un promotor Tet integrado en el locus *lacZ*, así como
 15 un plásmido con alto número de copias que expresaba *PAL3* bajo el control de un promotor Tet (SYN-PKU303) hasta una A_{600} de 0,25 y a continuación se indujeron por ATC (100 ng/ml) durante 4 h. Las bacterias se centrifugaron, se lavaron, y se resuspendieron en tampón de bicarbonato a una densidad de 1×10^{10} células/ml antes de la congelación a -80°C .

A partir de al menos 3 días antes del estudio (es decir, días -6 a -3), se mantuvieron ratones BTBR-Pah^{enu2} homocigotos (aprox. 6-12 semanas de edad) con comida libre de fenilalanina y agua que se suplementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El día 1, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento y se recogieron muestras de sangre
 25 mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina basales. También se pesaron los ratones para determinar el peso promedio de cada grupo. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea a 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. A los 30 y 90 min después de la inyección, se administraron 200 μ l de H_2O ($n = 30$),
 30 SYN-PKU901 ($n = 33$) o SYN-PKU303 ($n = 34$) a ratones mediante sonda oral. Se recogieron muestras de sangre a las 2 horas y 4 horas después de la exposición a fenilalanina, y se midieron los niveles de fenilalanina en sangre usando espectrometría de masas.

La **figura 27** muestra las concentraciones en sangre de fenilalanina en relación con las concentraciones iniciales a las 2 horas (**figura 27A**) y 4 horas (**figura 27B**) después de la inyección de fenilalanina. Estos datos sugieren que la inyección subcutánea de fenilalanina causa hiperfenilalaninemia en ratones *enu2/enu2* homocigotos, y que la administración oral de SYN-PKU303 reduce significativamente los niveles de fenilalanina en sangre después de
 40 la exposición a fenilalanina, en comparación con los grupos de control ($p < 0,00001$ a las 4 horas). Además, estos resultados confirman que las bacterias manipuladas genéticamente administradas por vía oral, y no la Nissle parental no manipulada, pueden afectar significativamente los niveles de fenilalanina en sangre independientemente de la exposición dietética. Por lo tanto, es posible que no sea necesario administrar un probiótico específico
 45 de PKU junto con la dieta.

Ejemplo 15. Actividad dosis-respuesta de bacterias que expresan *PAL* sobre fenilalanina sistémica

La Nissle de *E. coli* (SYN-PKU901) resistente a estreptomicina se cultivó a partir de soluciones madre congeladas a una densidad de 10^{10} células/ml. Se cultivaron bacterias que contenían una copia de *pheP* bajo el control de un promotor P_{trS} integrado en el locus *lacZ*, así como un plásmido de bajo número de copias que expresa *PAL3* bajo el control de

un promotor P_{fmrS} (SYN-PKU304) hasta una A_{600} de 0,25 y a continuación se indujeron de forma anaerobia purgando el fermentador bacteriano con nitrógeno durante 4 horas. Las bacterias se centrifugaron, se lavaron, y se resuspendieron en tampón de bicarbonato a una densidad de 5×10^9 células/ml antes de la congelación a -80°C .

5

A partir de al menos 3 días antes del estudio (es decir, días -6 a -3), los ratones se mantuvieron con comida libre de fenilalanina y agua que fue complementado con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El día 1, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento y se recogieron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina basales. También se pesaron los ratones para determinar el peso promedio de cada grupo. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea a 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. A los 30 y 90 min después de la inyección, se administraron 200 μl de H_2O ($n = 12$), 200 μl de SYN-PKU901 ($n = 12$) o 100 μl , 200 μl o 400 μl 5 de SYN-PKU304 ($n = 12$ en cada grupo de dosis) a ratones mediante sonda oral. Se recogieron muestras de sangre a las 2 horas y 4 horas después de la exposición a fenilalanina, y se midieron los niveles de fenilalanina en sangre usando espectrometría de masas.

10

15

20

25

La **figura 30** muestra las concentraciones en sangre de fenilalanina en relación con las concentraciones basales después de la inyección de fenilalanina. Estos datos demuestran una disminución dependiente de la dosis en los niveles de fenilalanina en sangre en ratones tratados con SYN-PKU304 en comparación con el tratamiento simulado (H_2O) o la administración de la cepa precursora (SYN-PKU901), después de la inyección subcutánea de fenilalanina (*disminución del 30 %; $p < 0,05$).

Ejemplo 16. Actividad de degradación de fenilalanina *in vivo* (PAL)

30

Para comparar la correlación entre la actividad de fenilalanina *in vivo* e *in vitro*, el plásmido SYN-PKU304, que contiene un con bajo número de copias que expresa *PAL3* con una inserción cromosómica de P_{fmrS} -pheP en el locus LacZ, se comparó con SYN-PKU901, un control de cepa Nissle con resistencia a estreptomycin *in vivo*.

35

A partir de al menos 3 días antes del estudio (es decir, días -6 a -3), se mantuvieron ratones BTBR-Pah^{enu2} homocigotos (aprox. 6-12 semanas de edad) con comida libre de fenilalanina y agua que se suplementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El día 1, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento y se recogieron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina basales. También se pesaron los ratones para determinar el peso promedio de cada grupo.

40

A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea a 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. A los 30 y 90 minutos después de la inyección, las bacterias se administraron a ratones mediante sonda oral.

45

Para preparar las células, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 litros), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia, a continuación se desplazaron a la cámara anaerobia durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron 200X y se congelaron (glicerol al 15 %, glucosa 2 g/l, en PBS). Las células se descongelaron en hielo, 4×10^{10} ufc/ml y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M. Cada ratón ingirió 800 μl en total, o $2,9 \times 10^{10}$ ufc/ratón.

50

Se recogieron muestras de sangre a las 2 horas y 4 horas después de la exposición a fenilalanina, y se midieron los niveles de fenilalanina en la sangre usando espectrometría de

masas, y se calculó el cambio en la concentración de fenilalanina por hora. Los resultados se muestran en la **figura 32**. La actividad metabólica total medida fue 81,2 umol/h, y la reducción total en el cambio de fenilalanina fue del 45 % ($P < 0,05$). Estas mismas células mostraron una actividad *in vitro* de 2,8 umol/h/1e9 células.

Además, se midieron varios metabolitos para determinar si los metabolitos secundarios pueden usarse como un parámetro adicional para evaluar la tasa de consumo de fenilalanina de las bacterias manipuladas. Cuando la actividad de la PAH se reduce en la PKU, la fenilalanina acumulada se convierte en fenilpiruvato, metabolito específicos de la PKU, que puede convertirse en ácido fenil-láctico. En presencia de las bacterias manipuladas genéticamente, la PAL convierte la fenilalanina en metabolito específico de PAL, ácido transcinámico, que a continuación puede ser convertido por las enzimas hepáticas en ácido hipúrico (**figura 32**). Las muestras de sangre se analizaron en busca de fenilpiruvato, fenil-lactato, ácido transcinámico y ácido hipúrico, como se describe en el Ejemplo 24-26. Los resultados se muestran en las **figura 32C, 32D, 32E y 32F** y son consistentes con la degradación de fenilalanina mostrada en la **figura 32A y 32B**. Para SYN-PKU304, los metabolitos específicos de PAL se detectan a las 4 horas y, además, se observan niveles más bajos de metabolitos específicos de PKU en comparación con SYNPKU901, lo que indica que la degradación de fenilalanina PAL puede provocar un cambio de los metabolitos específicos de PKU a favor o metabolitos específicos de PAL.

Ejemplo 17. Actividad de degradación de fenilalanina *in vivo* (PAL)

Se comparó SYN-PKU517 (que comprende 2 inserciones cromosómicas de PAL (2X f_{nrS} -PAL (maleK, malPT)) y una inserción cromosómica de *pheP* (f_{nrS} -*pheP* (lacZ)), auxotrofia de thyA (kan/cm)) con SYN-PKU901.

Los ratones se mantuvieron, alimentaron y fueron administrados con fenilalanina, como se describió anteriormente. Para preparar las células bacterianas para la alimentación por sonda, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 litros), se cultivaron durante 1,5 h en condiciones aerobias y a continuación se cambiaron a la cámara anaerobia durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron 200X y se congelaron (glicerol al 15 %, glucosa 2 g/l, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 4-10 ufc/ml 9:1 en bicarbonato 1 M. Cada ratón fue administrado con 800 ul en total, o 3,6e10 ufc/ratón.

Como se ha descrito anteriormente, se recogieron muestras de sangre, y se calculó el cambio en la concentración de fenilalanina en comparación con la línea base. Los resultados se muestran en las **figura 33A y 33B**. La actividad metabólica total medida fue de 39,6 umol/h, y la reducción total en el cambio de fenilalanina fue del 17 % ($P < 0,05$). Estas mismas células mostraron una actividad *in vitro* de 1,1 umol/h/1e9 células.

Los niveles absolutos de fenilalanina y de metabolitos de PKU y PAL se muestran en la **figura 33C, 33D, 33E, y 33F** y son consistentes con la degradación de fenilalanina que se muestra en la **figura 33A y 33B**. Para SYN-PKU517, se detectaron metabolitos específicos de PAL a las 4 horas y, además, se observaron niveles más bajos de metabolitos específicos de PKU en comparación con SYN-PKU901, lo que indica que la degradación de fenilalanina PAL puede provocar un cambio de los metabolitos específicos de PKU a favor o metabolitos específicos de PAL.

En algunas realizaciones, la orina se recoge en los puntos de tiempo predeterminados, y se analizó para los niveles de fenilalanina y niveles de metabolitos PAL y PKU.

Ejemplo 18. Actividad de degradación de fenilalanina *in vivo* (PAL)

Se comparó SYN-PKU705 (que comprende 3 inserciones cromosómicas de PAL (3XfmrS-PAL (Malek, malPT, CIJs/NEPL)), y 2 inserciones cromosómicas de *pheP* (2XfmrS-*pheP* (lacZ, agal/RSML)), y LAAD (impulsada por el promotor ParaBAD integrado dentro del operón arabinosa endógeno) con SYN-PKU901.

Los ratones se mantuvieron, alimentaron y administraron con fenilalanina, como se ha descrito anteriormente. Para preparar las células bacterianas para la alimentación por sonda, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 L), se cultivaron durante 1,5 h en condiciones aerobias y a continuación se cambiaron a la cámara anaerobia durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron 200X y se congelaron (glicerol al 15 %, glucosa 2 g/l, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 5-10 ufc/ml 9:1 en bicarbonato 1 M. A cada ratón se le administraron 800 ul en total, o 3,6e10 ufc/ratón. Nota: aunque esta cepa contiene el gen LAAD, no se indujo en este estudio.

Como se ha descrito anteriormente, se recogieron muestras de sangre, y se calculó el cambio en la concentración de fenilalanina en comparación con la línea base. Los resultados se muestran en la **figura 34A**. La actividad metabólica total medida fue de 133,2 umol/h, y la reducción total en el cambio de fenilalanina fue del 30 % (P <0,05). Estas mismas células mostraron una actividad *in vitro* de 3,7 umol/h/1e9 células.

Los niveles absolutos de fenilalanina y de los metabolitos de PKU y PAL se muestran en la **figura 34C, 34D, 34E, y 34F** y son consistentes con la degradación de fenilalanina que se muestra en la **figura 34A y 34B**. Se detectaron metabolitos específicos de PAL a las 4 horas y, además, se observaron niveles más bajos de metabolitos específicos de PKU en comparación con SYN-PKU901, lo que indica que la degradación de fenilalanina de PAL puede provocar un cambio de los metabolitos específicos de PKU a favor o de los metabolitos específicos de PAL. La actividad metabólica total medida fue mayor que la actividad metabólica total medida de la cepa SYN-PKU304 basada en plásmido PAL3 y la reducción total de fenilalanina se acercó a la de SYN-PKU304 (30 % en comparación con 45 %).

En algunas realizaciones, la orina se recoge en los puntos de tiempo predeterminados, y se analizó para los niveles de fenilalanina y niveles de metabolitos PAL y PKU.

Ejemplo 19. Actividad de degradación de fenilalanina *in vivo* (PAL) LAAD

La idoneidad de LAAD de *P. proteus* para la degradación de fenilalanina por las bacterias manipuladas genéticamente se evalúa adicionalmente *in vivo*. La cepa bacteriana SYN-PKU401 (que comprende un plásmido con un alto número de copias que comprende LAAD dirigido por un promotor inducible por Tet se compara con SYN PKU901.

Los ratones se mantienen, alimentan y fueron administrados con fenilalanina, como se ha descrito anteriormente. Para preparar las células bacterianas para la alimentación por sonda, las células se diluyen 1:100 en LB (2 litros), se cultivan durante 1,5 h en condiciones aerobias, a continuación se añade ATC y las células se cultivan durante otras 2 horas. Antes de la administración, las células se concentran 200 veces y se congelan para su almacenamiento. Las células se descongelan en hielo y se resuspenden. Las células se mezclan 9:1 en bicarbonato 1 M. A cada ratón se le aplica una sonda cuatro veces con un volumen total de 800 ul, o con un total de bacterias que van desde 2 x 10⁹ a 1 x 10¹⁰. Se recogen muestras de sangre de los ratones descritos en los ejemplos anteriores y se analizan los niveles de fenilalanina, fenilpiruvato, fenil-lactato, ácido transcinámico y ácido

hipúrico. Se calcula la reducción total de fenilalanina y la actividad metabólica total.

Ejemplo 20. Efecto del pH sobre la degradación de fenilalanina en *E. coli* recombinante

- 5 Para determinar si las velocidades de degradación de fenilalanina en SYN-PKU304 y SYN-PKU302 se ven afectadas por un bajo pH, se diluyeron cultivos de una noche de ambas cepas 1:100 en LB y se dejaron crecer con agitación (250 rpm) a 37 °C. Después de 1,5 horas de crecimiento, se añadió ATC (100 ng/ml) a los cultivos de SYN-PKU302, y los cultivos de SYN-PKU304 se colocaron en una cámara anaerobia Coy (suministrando N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 %). Después de 4 horas de inducción, las bacterias se sedimentaron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en tampón de ensayo (medio mínimo M9 con glucosa al 0,5 %, bicarbonato de sodio al 8,4 % y Phe 4 mM) a una concentración de 5e9 células/ml. El tampón de ensayo se preparó con valores de pH decrecientes incrementalmente, que van desde 7,25-2,25, utilizando HCl 1 M. Se retiraron alícuotas del ensayo celular cada 30 minutos durante 2 horas para la cuantificación de fenilalanina por espectrometría de masas. Como se muestra en la **figura 70**, las velocidades de degradación de la fenilalanina disminuyeron a medida que el pH del tampón de ensayo disminuyó en ambas cepas, SYN-PKU302 (**figura 70A**) y SYN-PKU304 (**figura 70B**).

20 Ejemplo 21. Degradación de dipéptidos y tripéptidos

- Las cepas de una noche de SYN-PKU304 y SYN-PKU705 se diluyeron 1: 100 y se cultivaron hasta log temprano antes de cambiar a condiciones anaerobias para la inducción de PAL y pheP. También se indujo un cultivo de SYN-PKU705 con arabinosa para inducir la proteína LAAD. El objetivo de este estudio fue determinar si las cepas de PKU podrían degradar la Phe cuando se secuestran en forma de dipéptidos y tripéptidos. Después de la inducción de la cepa, las células se centrifugaron y se resuspendieron en tampón de ensayo que contenía medio mínimo M9, glucosa al 0,5 %, MOPS 50 mM y 50 mM de Phe o dipéptido o tripéptido que contenía Phe. Las muestras de sobrenadante se extrajeron cada 20 minutos durante un total de 80 minutos y el sobrenadante se analizó en un espectrofotómetro UV-Vis para medir la absorbancia a 290 nm (el pico de absorción del ácido transcinámico). Los resultados se muestran en la **figura 36** e indican que las cepas de PKU eran capaces de degradar Phe rápidamente incluso en forma de dipéptidos o tripéptidos.

35 Ejemplo 22. Manipulación de cepas bacterianas usando inserciones cromosómicas

- Se construyeron cepas bacterianas, en las que los genes *pheP* y/o *PAL3* se integran directamente en el genoma de Nissle de *E. coli* bajo el control de un promotor sensible a FNR. Los procedimientos descritos a continuación pueden usarse para manipular cepas bacterianas que comprenden inserciones cromosómicas (por ejemplo, SYN-PKU902 y/o cualquiera de las cepas integradas enumeradas en la **Tabla 14**).

- La cepa SYN-PKU902 (*lacZ::P_{fmrS}-PAL3-pheP*) contiene una copia de *PAL3* y una copia de *pheP* integrada en el locus *lacZ*, con ambos genes unidos de manera operativa a un promotor único *fmrS* y cotranscritos en un mensaje bicistrónico (**figura 81**). La **Tabla 21** muestra la secuencia de una construcción de ejemplo en la que los genes *PAL3* y *pheP* se cotranscriben bajo el control de un promotor FNR de ejemplo (SEQ ID NO: 31), con la secuencia del promotor FNR **en negrita**, la secuencia *PAL3* encuadrada, la secuencia de *pheP* está subrayada y los sitios de unión ribosómica resaltados.

Para crear un vector capaz de integrar la secuencia de *P_{fmrS}-PAL3-pheP* en el cromosoma, se utilizó el ensamble de Gibson para agregar secuencias de 1000 pb de ADN homólogo al

locus *lacZ* de Nissle a ambos lados de un casete de resistencia a cloranfenicol (*cm^R*) flanqueado de sitio de diana de recombinación de flipasa (FRT) en un plásmido knock-in knock-out (KIKO). A continuación, se utilizó un ensamblaje de Gibson para clonar la secuencia de ADN de *P_{fnrS}-PAL3-pheP* entre estos brazos de homología, adyacente al sitio FRT-*cm^R*-FRT. La inserción exitosa del fragmento se validó mediante secuenciación. Se utilizó PCR para amplificar toda la región *lacZ::FRT-cm^R-FRT::P_{fnrS} PAL3- pheP::lacZ*. Este fragmento de PCR incorporado se usó para transformar una cepa de Nissle electrocompetente que contiene un plásmido sensible a la temperatura que codifica los genes de recombinasa roja lambda. Después de la transformación, las células se cultivaron durante 2 horas a 37 °C. El crecimiento a 37 °C curó el plásmido sensible a temperatura. Los transformantes con integración cromosómica satisfactoria del fragmento se seleccionaron en cloranfenicol a 20 µg/ml.

La cepa SYN-PKU501 (*malPT::P_{FNRS} -PAL3, lacZ::P_{FNRS} -pheP*) contiene una copia de *PAL3* integrada en el locus *malP/T*, y una copia de *pheP* integrada en el locus *lacZ*, con ambos genes unidos de manera operativa a promotores *fnrS* separados (véase la **Tabla 28**; SEQ ID NO: 38). La cepa SYN-PKU502 (*malPT::P_{fnrS} -PAL3, lacZ: P_{fnrS} - PAL3-pheP*) contiene una copia de *PAL3* integrada en el locus *malP/T* bajo el control de un promotor *fnrS* (véase la **Tabla 28**; SEQ ID NO: 38), así como una construcción *PAL3-pheP* integrada en el locus *lacZ*, en el que ambos genes en el locus *lacZ* están unidos de manera operativa a un único promotor *fnrS* y cotranscritos en un mensaje bicistrónico (véase la **Tabla 21**; SEQ ID NO: 31).

Para crear un vector capaz de integrar la secuencia *P_{fnrS}-PAL3* (SEQ ID NO: 38) en el cromosoma de Nissle de *E. coli* en SYN-PKU501 y SYN-PKU502, se utilizó el ensamblaje de Gibson para agregar secuencias de 1000 pb de ADN homóloga a los locus *malP* y *malT* de Nissle a cada lado de un casete de resistencia a la kanamicina (*kn^R*) flanqueado en el sitio de FRT en un plásmido KIKO. A continuación, se utilizó el ensamblaje de Gibson para clonar la secuencia de ADN de *P_{fnrS} -PAL3* entre estos brazos de homología, adyacentes al sitio de FRT-*kn^R*-FRT. La inserción exitosa del fragmento se validó mediante secuenciación. Se utilizó PCR para amplificar toda la región *malP::FRT-kn^R -FRT::P_{fnrS}-PAL3::malT*. Este fragmento de PCR knock-in se usó para transformar una cepa de Nissle electrocompetente que ya contenía *P_{fnrS} pheP* o *P_{fnrS} -PAL3-pheP* bicistrónico en el locus *lacZ*, y que expresaba los genes de recombinasa roja lambda. Después de la transformación, las células se cultivaron durante 2 horas a 37 °C. Los transformantes con integración exitosa del fragmento se seleccionaron en kanamicina a 50 µg/ml. Estos mismos procedimientos pueden usarse para crear un vector capaz de integrar la secuencia *P_{fnrS} -PAL3* (SEQ ID NO: 38) en el sitio de inserción *malE/K* en SYN-PKU506 y SYN-PKU507.

En algunas realizaciones, los conmutadores basados en recombinasa se pueden usar para activar la expresión de *PAL3*. La cepa SYN-PKU601 (*malPT::P_{fnrS}-Int5, rrnBUP-PAL3; lacZ::P_{fnrS}-pheP*) contiene la recombinasa *Int5* unida de manera operativa a un promotor *P_{fnrS}*, así como una copia de *PAL3* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, integrado en el locus *malT* (**figura 82**). La **Tabla 45** muestra la secuencia de una construcción *P_{fnrS}-Int5, rrnBUP PAL3* de ejemplo (SEQ ID NO: 42), en la que *P_{fnrS}*, *Int5* y *PAL3* están en orientación inversa. La secuencia de *Int5* está en **negrita**, la secuencia de *P_{fnrS}* está encuadrada, la secuencia de *PAL3* está subrayada y los sitios de recombinasa están en **negrita** y subrayados. Los sitios de unión ribosómica están resaltados y la secuencia de promotor constitutivo *rrnBUP* está encuadrada. El promotor *rrnBUP* de *E. coli* que contiene el elemento UP se seleccionó para producir una alta expresión de *PAL3* (Estrem et al., 1998), aunque se puede usar cualquier promotor fuerte. SYN-PKU601 también contiene una copia de *pheP* integrada en el locus *lacZ*.

Para construir la cepa SYN-PKU601, se sintetizaron las secuencias de genes de *Int5* impulsada por P_{fnrS} y de *PAL3* flanqueado de sitio de recombinasa impulsada por *rrnBUP* por GENEWIZ (Cambridge, MA). El ensamblaje de Gibson se utilizó para añadir secuencias de ADN de 1000 pb homólogas a los locus *malP* y *malT* de Nissle a ambos lados de la
 5 secuencia de ADN de P_{fnrS} -*Int5*, *rrnBUP*-*PAL3* y para clonar esta secuencia entre los brazos de homología. La inserción exitosa del fragmento en un plásmido KIKO se validó mediante secuenciación. Se utilizó PCR para amplificar toda la región P_{fnrS} -*Int5*, *rrnBUP*-*PAL3*. Este fragmento de PCR knock-in se utilizó para transformar una cepa de Nissle electrocompetente que ya contenía P_{fnrS} -*pheP* en el locus *lacZ*, y que expresa los genes de
 10 recombinasa roja lambda. Después de la transformación, las células se cultivaron durante 2 horas a 37 °C. Los transformantes con integración exitosa del fragmento P_{fnrS} -*PAL3* en la región intergénica de *malPT* se seleccionaron en kanamicina a 50 µg/ml. Esta estrategia también puede usarse para construir una cepa basada en recombinasa que requiera actividad polimerasa T7 para la expresión de *PAL3* (**figura 83**). [La **Tabla 46** muestra la
 15 secuencia de un ejemplo de construcción P_{fnrS} -*Int5*, *rrnBUP*-T7 (SEQ ID NO: 43), en la que el gen P_{fnrS} , *Int5* y polimerasa T7 están en orientación inversa. La secuencia de *Int5* está en **negrita**, la secuencia de P_{fnrS} está encuadrada, la secuencia de la polimerasa T7 está subrayada y los sitios de recombinasa están en **negrita** y subrayados. Los sitios de unión ribosómica están resaltados y la secuencia de promotor constitutivo *rrnBUP* está
 20 enmarcada.

La **Tabla 44** muestra la secuencia de una construcción P_{T7} -*PAL3* de ejemplo, con la secuencia P_{T7} resaltada, el sitio de unión al ribosoma subrayado y la secuencia de *PAL3* en **negrita**.

25
 Tabla 44

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-PAL3-pheP (SEQ ID NO. 41)

ggtaccAGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTA
 AATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAAACG
 CCGCAAAGTTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAA
 TATCTCTCTTggatccaaagtgaactctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatatATGAAA
 GCTAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCT
 TTGGAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAAAAAAGTAGAAATATC
 AACGGAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAA
 AATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGATTTGGAGGG
 AATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAA
 TCTGTTAACCTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAACCTTGT
 ATTAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGTCT
 GCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCAATTGTTGATCATATTAATCATGAC
 ATTGTTCCCTCTGGTTCCCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTA
 ATTCCTTTATCTTATATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTAT
 TATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAACGTGCAGGGTT
 GACACCATTATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCA
 CCCGGGTAATGTCAGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAAACTGGAAAAA
 CTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAAGCATTACTT
 GCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTCAACAAGTAAAAAATCATCC
 TGGTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAA
 CGCAGGTTAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGT
 CGTCATCAAGAAATTACCCAATAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTC
 AATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTAC
 CGCTCGGAAAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCAT
 TGATAGATCCAGAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAATTTTATGGGG

CAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAAAACTGGATATTGCTTTAATT
GCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTTTCTCT
CGTGGATTACCTAATTCAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTT
AAAGGCGTCCAACCTTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCATGAT
TGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGAACAATAACAATCAAGA
TATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCA
GAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGTCAGGCCAT
TCATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTA
CCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGGA
TGAAGATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCT
GCCAGAAATCATGCTGGAAGAATAAaagaaggagatatatacatgAAAAACGCGTCA
ACCGTATCGGAAGATACTGCGTCGAATCAAGAGCCGACGCTTCATCGCGG
ATTACATAACCGTCATATTCAACTGATTGCGTTGGGTGGCGCAATTGGTAC
TGGTCTGTTTCTTGGCATTGGCCCCGGCGATTGAGATGGCGGGTCCGGCTGT
ATTGCTGGGCTACGGCGTCGCCGGGATCATCGCTTTCCTGATTATGCGCCA
GCTTGGCGAAATGGTGGTTGAGGAGCCGGTATCCGGTTCATTGCCCCACTT
TGCCTATAAAATACTGGGGACCGTTTGCGGGCTTCCTCTCTGGCTGGAATA
CTGGGTAAATGTTTCGTGCTGGTGGGAATGGCAGAGCTGACCGCTGCGGGCA
TCTATATGCAGTACTGGTTCCCGGATGTTCCAACGTGGATTTGGGCTGCCG
CCTTCTTTATTATCATCAACGCCGTTAACCTGGTGAACGTGCGCTTATATG
GCGAAACCGAGTTCTGGTTTGCGTTGATTAAAGTGCTGGCAATCATCGGTA
TGATCGGCTTTGGCCTGTGGCTGCTGTTTTCTGGTCACGGCGGCGAGAAAG
CCAGTATCGACAACCTCTGGCGCTACGGTGGTTTCTTCGCCACCGGCTGGA
ATGGGCTGATTTTGTGCTGGCGGTAATTATGTTCTCCTTCGGCGGTCTGG
AGCTGATTGGGATTACTGCCGCTGAAGCGCGCGATCCGGAAAAAAGCATT
CCAAAAGCGGTAAATCAGGTGGTGTATCGCATCCTGCTGTTTTACATCGGT
TCACTGGTGGTTTTACTGGCGCTCTATCCGTGGGTGGAAGTGAAATCCAAC
AGTAGCCCGTTTGTGATGATTTTCCATAATCTCGACAGCAACGTGGTAGCT
TCTGCGCTGAACTTCGTCATTCTGGTAGCATCGCTGTCAGTGTATAACAGC
GGGTTTTACTCTAACAGCCGCATGCTGTTTGGCCTTTCTGTGCAGGGTAAT
GCGCCGAAGTTTTTGAATCGCGTCAGCCGTCGCGGTGTGCCGATTAACTCG
CTGATGCTTTCCGGAGCGATCACTTCGCTGGTGGTGTAACTAATCTG
CTGCCGAAAAAGCGTTTGGTCTGCTGATGGCGCTGGTGGTAGCAACGCT
GCTGTTGAACTGGATTATGATCTGTCTGGCGCATCTGCGTTTTCTGTGCAGC
GATGCGACGTCAGGGGCGTGAAACACAGTTTAAGGCGCTGCTCTATCCGT
TCGGCAACTATCTCTGCATTGCCTTCCTCGGCATGATTTTGCTGCTGATGTG
CACGATGGATGATATGCGCTTGTGAGCGATCCTGCTGCCGGTGTGGATTGT
ATTCTGTTTATGGCATTAAACGCTGCGTCGGAAAtaa

Tabla 45

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-Int5, rrnBuP-PAL3 (SEQ ID NO. 42)
ttaggtacgggctgccatttgatttaacgcgttcaccatcaaacggacgaccacgctggccttttgaacccaaatttc

atcgatgcaggtatcaataattgcattacgcatggcggggtgcacgcagccacagttctcataatcgctgctatcaacaat
 ccagtaacatcaactgctgcgcttgcgctgctttcgtaactgcatcttggctgcctgcaggggtgctcagtgcttcttgat
 gcaggggcaaaaaactgttctgcccggaccatcataaacaccattctgacgatcacgcagcagggcgaccagatTTTTTCGG
 cttcacgaaactgcggcttttgcatactttcatcttcgcttgccgtgcggatgggtcagtgctcccagcgatctgcaactgcaat
 acaaacggatcatccggttcgcttgctgctaattttgctgcccaacgaaatgcaacatattctcaacgcttttacgtgcaaca
 taggtcggtgccggacaaccacctttcacactgctacgccaacaacgataaccattaccgctatagctacagctaccaccac
 aacccggacaacgcatacagaccgctcagcagatgtttgcgacgggtatcatgatcgctaccatccagcggaacaccaaca
 ccattctcaccttaacggctgcttttgcggcttcttcttcatcgggtaccagcgaggaccatgcataacgctaacacggtt
 accttcaccgttataaaaggtcagacgacgctgtttaccatcctgacgacctgtggtctgccaacccgcatatgccggattct
 gaatcatatcacgcacggtaactgcaatccacggaccacgggtcgggctcggaatttcacgggtattcattgcatgtgcggt
 gcctgcatagctcagacgatcggttaaccggcagggtaaaaaccagacgggctgcttctgctttggtcagaccatcaggac
 caccgcgcatcttcatctgctgccagtttacgttcatcatattcatcacccttctcatcactaacggttaaccagaacaacacg
 cagaccatacgggtgcacgggcattaaccattcaccattttcacgctgatgtgctttggtatcacgaacacgttcgctcagttt
 tctgcttcttcgctgcttcttctgcacgacgaatcagttcaccgcgatcacgtttattggtgctatccagaaccggacgaccg
 gtattctcatcccaaccaaacagcagacgacgaggcataccatcttccggttcgataatttcagaattgcaccggcaccacc
 acgatcccaacgatccagacgataacaccacagtgcaccaacttcaccgctttccagggctttcagtgcttgcctgatcat
 cacgtgctttacctttacgaaaacggcttgcgctaccaactcttcttccaaacatgacgaacctgcatacccagcagtgctgca
 actttacgaccagggttcttctgtgctgcaatgctaatttctgtttacgacgctgacctgcaccatttcacgggcttttaactgctt
 tgcctttacgacaaaacagtgcaatcagacctgcaggatccggaccgggttcggtggtcataccaggcatatgtatatctctt
 cttaaagttaaacaaaattatttctagagttcactttggatccAAGAGAGATATTGCCCTGAATGGGT
 AGAGAGTTTATTGACTTCGCTCAAACCTTTGCGGCGTTTTTGTATACAGACA
 GCCGGA AAAATTGCTTTTGT TACAACCATT TACTACGATGCAACCATAAA
 GCAACACCACCAATAAGAACA ACTgggtaccGGATATTCATATGGACCATGGC
 AGCTAGCCCTGCAGGGTGCAC TCAGAAAATTATTTTAAATTTCTCTTGT
 CAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCAC gagcgccggatcagggagtgac
 ggctgggagcgctacacgctgtggctgcggctcgggtcTTATTCTTCCAGCATGATTCTGGCAG
 AGGAAGTTGATCATTATAAATTGCATCCGCAATGCGGATTATATCTTCATC
 CAACGCACGATCAGTGATCAAAGGAGAACTGATTTTCGCGTACTGCATGGT
 AAAATTTAGCAGTTTCAGGCGCAATTTCACTAATATTGCCGCGAAGATGA
 ATGGCCTGACAACTACCAGAATTGTCATTGAAACAATATTGCGTAATTTT
 TGCTCCATCTCTAAAACATCTTGAGCGGCATGCAGACCTAACTGACAAT
 ATCTTGATTGTATTGTTCTGTGGCGAGGGTATGAATACCTGATGCAGCACA
 ATCATGGCGAATTGCAGCAACTAAAGCGGTTTGAGAAAGTTGGACGCCTT
 TAAAACCTTGATACATGCCGGGTGTCGGACTCAGTGAATTAGGTAATCCA
 CGAGAGAAACGGTTATCCATCATAAGAGCCACAATGGCGTGAAGATGATT
 GGCAATTAAAGCAATATCCAGTTTTAATGCATCCATTGTTTCGGGCGACATA
 TTGCCCCATAAAATTTCCACCGTGTAGAACATCGCCATTTTCTGGATCTAT
 CAATGGATTATCATTAGCTGAGATAACTTCCCGTTCCAATATTTTCCGAGC
 GGTAGCTAAAGATTCTGGCACTATACTTAATACTTGTGGTGCACAGCGAA
 TTGAATAAACTTCCTGTAAGGTATCATTTAGTTGGGTAATTTCTTGATGAC
 GACAAGCTTTATTGGCTTGTTCTTTAACCCAGATAATAGATTAACCTGCG
 TTGAACCTGCCAATAAATTACGCAATGCACTTGCCACCGCGTTTTGACCAG
 GATGATTTTTTACTTGTGAATCCGGGCATCATAATGTTTCATGAGATGCAA
 GTAATGCTTCAACAGCAAGGGCAATCGCAGAAATTGAGGCTTTAAATAGT
 TTTTCCAGTTTAATGACGGTGATTGCACTGATTCCTGACATTACCCGGGTG

CCGTTAATCAGAGCAAGACCTTCTTTGGCTTTTAACGATAATGGTGTCAAC
 CCTGCACGTTTAATTGCTTCAGCAGCGTCAATTTCTGCGCCCATATAATAA
 ACTTTGCCGATAACCACATAATGCTCGTGCAATATAAGATAAAGGAATTA
 ATCACCGCTTGACCCACTGAGCCATAGCGAGGAACCAGAGGAACAATGT
 CATGATTAATATGATCAACAATTGCTTGAGCGACAATTGGTCTGGTTGCAG
 ACCAACCTTTGCAAACAGAAAGTAACATAGTAAATTGTGACGCTTTAATA
 CAAGGTTTGGACATATAGTCCCCAGTACCAGCAGAAAGAAAAGTTAACAG
 ATTTTGCTGATGCTCTGCGATTTTCTCAAATGGCACAATAATTGGCATT
 CCCTCCAAATCCTGTATTGATTCCATATATAACCTCTCCTGAATTTAATTTT
 TCCTCTAATTTTTCACGACCATGCGTCAAAAAGTTCAGTGATCTCCGTTGAT
 ATTTCTACTTTTTTTTGTGTTTATCGCAATGTCATAGATATCTTCCAAAGAGA
 TAAGGCCATTTTTATTAATAATAATGGTTGGCTGAACATCTTTAGCTTTCA
 Tatgtatatctccttetaaagttaaacaattatttctagagcagatcagggtgcgcaagtgtcaacgctcccaggaga
 gttatcgacttgcgtattaggg

Tabla 46

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor FNR-Int5, rrnBuP-T7 (SEQ ID NO. 43)

ttaggtacgggctgcccatttgattttaacgcgttcaccatcaaacggacgaccacgctggcctttgcaacca
 aatttcacgatgcaggatcaataattgcattacgcattggcggggtgcacgcagccacagttcttcataatcgctg
 ctatcaacaatccagctaacaatcaactgctgcgttgcgtgctttcgtaactgcattcttggtgctgcagggtgc
 tcagtgtcttctgatatgcaggggcaaaaaactgttctgcggaccatcataaacaccattctgacgatcacgcagc
 aggcgaccagattttttcggttcacgaactgcggctttgcatactttcatcttcgcttgctgcggatgggtcagt
 gctgcccagcgatcgcaactgcaataacaaacggatcatcgggttcgcttgctgtaattttgctgcccacgaat
 gcaacatattctcaacgcttttaactgcaacatagggtcggtgcgggacaaccaccttcacactgctacgccaaca
 cgataaccattaccgctatagctacagctaccaccacaaccgggacaacgcatacagccgctcagcagatgtttgc
 gacgggtatcatgatcgctaccatccagcgggaacaccaacaccatttcacctttaacggctgcttttcggtctctg
 ttcttcateggtcaccagcggaggaccatgcataacgtaaacacgtttaccttcacggttataaaaggctcagacgac
 gctgtttaccatcctgacgacctgtggtctgccaaccgcataatgcggattctgaatcatatcacgcacggtaactg
 caatccacggaccaccggctgggctcggaatttcacgggtattcattgcattgtgcgggtgctgcatagctcagacga
 tcggtaaccggcagggtaaaaaccagacgggctgcttctgctttgggtcagaccatcaggaccaccgcattctc
 atctgctgccagtttacgttcacatattcatcacctcttcactaactacggtaaccagaacaacgcagaccatac
 ggtgcacgggcatttaaccattcaccattttcacgctgatgtgctttggtatcacgaacacgttcgctcagttttctgc
 ttcttcgctgcttcttctgcacgacgaatcagttcacgcgatacagtttattggtgctatccagaacgggacgaccg
 gtattctcatcccaacaaacagcagacgacgaggcataccattcttcgggtcgataatttcagaattgcacggga
 ccaccacgateccaacgatccagacgataacaccacagtgacccaacttcacgctttccagggtttcagtgctttg
 ctctgatcatcagtgctttacetttaacgaaaacgggtgcgctaccaactctttccaacatgacgaacctgcatac
 ccagcagtgctgcaactttacgacccagggtttctgtgctgcaatgctaatttctgtttacgacgtgacctgcacca
 tttgcagggcttttaactgctttgcttttacgacaaaacaggtcaatcagacctgcaggatccggaccgggttcgggtg
 tcataccaggcatatgtatatctccttetaaagttaaacaattatttctagagttcactttggatccAAGAGAGAT
 ATTGCCCTGAATGGGTAGAGAGTTTATTGACTTCGCTCAAACCTTTGCGGCG
 TTTTGTATACAGACAGCCGGAAAAATTGCTTTTGTACAAACCATTACTA
 CGATGCAACCATAAAGCAACACCACCAATAAGAACAACtggtaccGGATATT

CATATGGACCATGGCAGCTAGCCCTGCAGGGTGCAC TCAGAAAATTATTT
TAAATTTCTCTTGTTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCAC **ga**
gcgcggatcagggagtggaacggcctgggagcgctacacgctgtggctgcggtcgggtgcttacgcgaacgcgaagt
ccgactctaagatgtcacggagggttaagttaccttttagccgggaagtgtggtcattttgtccaattgagactcgtgcaactggt
cagcgaactggtcgtagaaatcagccagtacatcacaaagactcatatgtgtcaaccatagtttcgcgcactgctttgaacagg
ttcgagcgtcagccggaatggtaccgaaggagtcgtgaatcagtgcaaaagattcgattccgtacttctcgtgtgccaca
ctacagtcttacgaagggtggtaccgtcttggctgtgtacaaagttaggagcgataccagactcctgtttgtgtgcatcaatct
cgctatctttgttgggttaagtgtaggctgtgaagcgggaactgaccgaggaacatcaggttcaagcgcgtctgaataggcttct
tgtattcctgccaacagggaaacatcaggagttacccaatgcacagcgcgaacgcttgcgaagaatctctccagtcttcta
tctttgacctcagcagccagcagcttagcagcagacttaagccagttcattgcttcaaccgcagctaccaccgtcacgctcac
agattcccaaatcagcttagccatgtatccagcagcctgattcggctgagtgaaatcagacccttgcgggaatcaatagctg
gctgaatggtatcttccagcacttgttgacggaagccgaactctttggaccgtaagccagcgtcatgactgaacgcttagtc
acactgcgagtaacaccgtaagccagccattgaccagccagtccttagtgcccagcttgactttctcagagatttcaccagt
gttctcatcggtcacggtaactacttctgtatcggtcccattgattgcgtctgctttagaattctcgttgactttcttagcaacaatc
ccgtagatgtcctgaacgggttctactaggaagcaagtaaccgcgcgaccacctacctcatctcggagcatcgcggagaag
tgctggatgccagagcaagaccgtcaaaccgagcgggaaggagcagttatagctcagccggtggtgctgtaccccag
cgtactcaaagcagaacgcgaagggaagcagaacggagaatcttgcctcagcccaccaagtgttctccagtggagacttagcg
caagccatgatgttctcgtggtttctcaatgaacttgatgcgtcaggggaacgggaacctatcgacaccgcacagtttga
ccgtggattttcagccagtagtaaccttcttaccgattggtttacctttgccagcgtgaagcagtcctttggtcatatcgttacct
tgcgggttgaaacttgacacagcgtaaacacgaccgcgcagtcctatgttgaagggaaccagatggccttatggttagca
aaactattggcttgctcaagcatgaactcaaggctgatacggcgagacttgcgagccttgccttgcggtacacagcagcgg
cagcacgtttccacgcggtgagagcctcaggattcatgtcgtatgtcttcgggttcatcgggagttcttcacgctcaatcgag
ggatgtcctcgaccggacaatgcttccacttgggtgattacgttggcgaccgctaggacttcttgttgattttccatcggtgttt
tgcgcaatgtaatcgctttgtacacctcagggcatgaaacgtcttcgtagcgcacatcagtgctttcttactgtgagtacgcacca
gcgccagaggacgacgaccgttagcccaatagccaccaccagtaatgccagtcacggcttaggaggaactacgcaag
gttggaaacatcgagagatgccagccagcgcacctgcacgggttgcgatagcctcagcgtattcagtgcgagttcgata
gtctcagagcttgacctactacgccagcattttggcggtgtaagctaaccattccggttgactcaatgagcatctcgatgcag
cgtactcctacatgaatagagtcttctttagccacgaagaccacgcctcgcaccgagtagacccttagagagcatgtcag
cctcgacaacttgcataaatgctttctttagacgtgcccctacgcgcttgttgagttgttctcaacggttttctgaagtgttag
cttcaaggtcacggatacagccgaagcgagcctcgtcctcaatggcccagaccgattgcgcttgctacagcctgaacggttg
tattgtcagcactggttaggcaagccagagtgggtcttaatgggtgatgtacgctacggcttccggcttgatttcttcaggaact
ggaaggctgtcgggcttggcgcgcttagcttctcacttctcaaacagtcgttgatgcgtgcaatcatcttagggagtagg
gtagtgtatgagagcgttggcggcagcgttatccgcaacctaccagctttaaagtgacgctcaaacatcttgcggaagcgtg
cttccaccatctcgtgaagactcatgctcaaggcccaactgttcgcgagctaaacgctcaccgtaatggtcagccagagtgtt
gaacgggatagcagccagttcgtatgtcagagaagtcgttcttagcgatgttaatcgtgttcatatgtatatctcttcttaagtt
aaacaaaattatttctagagcagatcaggggtgcgcaagttgtcaacgctcccaggagagttatcgacttgcgtattagg
g

Tabla 47

Secuencias de nucleótidos de construcción de promotor T7-PAL3 (SEQ ID NO. 44)
taatacgaactactatagggagaaagtgaactctagaaataattttgtttaaacttaagaaggagatatacatATGAAAG
CTAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCT

CTTTGGAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAAAAAAGTAGAAA
TATCAACGGAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAATTAG
AGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGAT
TTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAATCGCAGAG
CATCAGCAAAATCTGTAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTAT
ATGTCCAAACCTTGTATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTG
TTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTGCTCAAGCAATTG
TTGATCATATTAATCATGACATTGTTCCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCT
CAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGAG
CATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACG
CTGCTGAAGCAATTAAACGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAG
CCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGA
ATCAGTGCAATCACCGTCATTAAACTGGAAAACTATTTAAAGCCTCA
ATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAAGCATTACTTGCATCTCATGAA
CATTATGATGCCCCGGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCAAAAC
GCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGT
TAATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGTCGTCA
TCAAGAAATTACCCAATAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAAT
TCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTAC
CGCTCGGAAAATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCC
ATTGATAGATCCAGAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAATTTTAT
GGGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAAAACTGGATATTG
CTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATA
ACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTCCGACACCCGGCA
TGTATCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAACCTTTCTCAAACCGCTTTAGTTG
CTGCAATTTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCA
CAGAACAATACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTC
AAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTGTTTCAATGA
CAATTCTGGTAGTTTGTGTCAGGCCATTCATCTTCGCGGCAATATTAGTG
AAATTGCGCCTGAACTGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCA
GTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCA
TTGCGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGC
TGGAAGAATAA

Para construir la cepa SYN-PKU602 que comprende la construcción P_{ARA} -*Int5*, la construcción P_{T7} -*PAL3* y la construcción P_{Lac} -polimerasa T7 (**figura 84**), se usó el ensamblaje de Gibson esencialmente como se describe anteriormente.

5

La **Tabla 48** muestra la secuencia de una construcción P_{ARA} -*Int5* de ejemplo (SEQ ID NO: 45), para la integración en el locus *Ara*. La secuencia *Int5* está en **negrita**, la secuencia P_{ara} que contiene los sitios TSS y RBS está subrayada y la secuencia *AraC* está en *cursiva*.

10 Tabla 48

Secuencia de nucleótidos de construcción de P_{ARA} - <i>Int5</i> ; SEQ ID NO: 45
<i>TTATTCACAACCTGCCCTAAACTCGCTCGGACTCGCCCCGGTGCATTTTTTAAATA</i>

CTCGCGAGAGAAATAGAGTTGATGTCGTCGACAAACCCGACATTGCGCAGCCAGGACGGTGGGCGA
TAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCCTGACTGATGCGCTGGTCTCT
CGCGCCAGCTTAATACGCTAATCCCTAATGCTGGCGGAACAAATGCGACAGAC
GCGACGGCGACAGGCAGACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTACTGT
CTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGG
TGGAITGGAGCGACTCGTAAATCGCTTCCAATGCGCCCGCAGTAACAATTGCTCAAGC
AGATTTATCGCCAGCAATTCCGAATAGCGCCCTTCCCCCTTGTCGGGCATTAATGAT
TTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTTCATCCGGGGCGAAAGAA
ACCGGTATTGGCAAATATCGACGGGCCAGTTAAGCCATTATGCCAGTAGGGCGCG
CGGACGAAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTTCGTGAGCCTCCGGATGACGACC
TAGTGTATGAATCTCTCCAGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGGTTCGGCAGAC
AATAATCTCGTCCCTGATTTTTTCCACCCCTGACCCGGAATGGTGAGATTGAGA
AAATTCCTTTTATTCCTCCAGCGGTGCGTGATAAAAAAATCAGAGTAACCGTTGAGC
CTCAATTCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCGTTAAACGAGTATCCCGGCAG
CAGGGGATCATTTTTGCGCTTCAGCCATACTTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGA
AGAAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTTAC
TGGCTCTTCTCGCTAACCCCAACCGGTAACCCCGCTTATTAAAAGCATTCTGT
AACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTAT
AATCACGGCAGAAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCT
ATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCAGCCTGACGCTTTTT
TTCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTT
TAAGAAGGAGATATACATATGCCTGGTATGACCACCGAAACCGGTCCGG
ATCCTGCAGGCTGATTGACCTGTTTGTGCGTAAAAGCAAAGCAGTTAA
AAAGCCGTGCAAATGGTGACGGTCAGCGTCGTAAACAAGAAATTAGCAT
TGCAGCACAAAGAAACCCCTGGGTGCTAAAGTTGCAGCACTGCTGGGTAT
GCAGGTTTCGTATGTTTGAAAGAAGTTGGTAGCGCAAGCCGTTTTCTGT
AAAGGTAAAGCACGTGATGATCAGAGCAAAGCACTGAAAGCCCTGGAA
AGCGGTGAAGTTGGTGCACTGTGGTGTTATCGTCTGGATCGTTGGGAT
CGTGGTGGTGCCGGTGCAATTCGAAATTATCGAACCAGGAAGATGGT
ATGCCCTCGTCGTCTGCTGTTTGGTTGGGATGAAGATACCGGTGCTCGG
GTTCTGGATAGCACCAATAAACGTGATCGCGGTGAACTGATTCGTGCTG
CAGAAGAAGCACGCGAAGAAAGCAGAAAAACTGAGCGAACGTGTTTCGTG
ATACCAAAGCACATCAGCGTGAAAATGGTGAATGGGTTAATGCCCGTG
CACCGTATGGTCTGCGTGTTGTTCTGGTTACCGTTAGTGATGAAGAGGG
TGATGAATATGATGAACGTAAACTGGCAGCAGATGATGAAGATGCGGG
TGGTCCTGATGGTCTGACCAAAGCAGAAGCAGCCCGTCTGGTTTTTACC
CTGCCGGTTACCGATCGTCTGAGCTATGCAGGCACCGCACATGCAATG
AATACCCGTGAAATTCGAGCCCGACCGGTGGTCCGTGGATTGCAGTT
ACCGTGCGTGATATGATTGAGAATCCGGCATATGCGGGTTGGCAGACC
ACAGGTCGTCAGGATGGTAAACAGCGTCGTCTGACCTTTTATAACGGTG
AAGGTAAACGTGTTAGCGTTATGCATGGTCCTCCGCTGGTGACCGATG
AAGAACAAGAAGCCGCAAAAGCAGCCGTTAAAGGTGAAGATGGTGTG
GTGTTCCGCTGGATGGTAGCGATCATGATACCCGTCGCAACATCTGCT
GAGCGGTGATATGCGTTGTTCGGGTTGTGGTGGTAGCTGTAGCTATAG
CGGTAATGGTTATCGTTGTTGGCGGTAGCAGTGTGAAAGGTGGTTTACC
GGCACCGACCTATGTTGTCACGTAAAAAGCGTTGAAGAATATGTTGCATT
CGTTGGGCAGCAAAATTAGCAGCAAGCGAACCGGATGATCCGTTTGTT
ATTGCAGTTGCAGATCGCTGGGCAGCACTGACCCATCCGCAGGCAAGC
GAAGATGAAAAGTATGCAAAAGCCGCAGTTCGTGAAGCCGAAAAAAAT

CTGGGTCGCCTGCTGCGTGATCGTCAGAATGGTGTTTATGATGGTCCG
GCAGAACAGTTTTTTGCCCTGCATATCAAGAAGCACTGAGCACCCTGC
AGGCAGCCAAAGATGCAGTTAGCGAAAGCAGCGCAAGCGCAGCAGTTG
ATGTTAGCTGGATTGTTGATAGCAGCGATTATGAAGAACTGTGGCTGCG
TGCAACCCCGACCATGCGTAATGCAATTATTGATACCTGCATCGATGAA
ATTTGGGTGCAAAAGGCCAGCGTGCTCCGTTTGATGGTGATGAA
CGCGTTAAATCAAATGGGCAGCCCGTACCTAA

Ejemplo 23. Generación de DeltaThyA

Una mutación auxotrófica causa que las bacterias mueran en ausencia de un nutriente esencial añadido exógenamente para la supervivencia o el crecimiento porque carecen del gen o genes necesarios para producir ese nutriente esencial. Para generar bacterias manipuladas genéticamente con una modificación auxotrófica, se eliminó el *thyA*, un gen esencial para la síntesis de oligonucleótidos. La delección del gen *thyA* en Nissle de *E. coli* produce una cepa que no puede formar una colonia en placas LB a menos que se complementen con timidina.

Se amplificó un fragmento de PCR *thyA::cam* usando 3 rondas de PCR de la siguiente manera. Las secuencias de los cebadores utilizados a una concentración de 100 µm se encuentran en la Tabla 49.

Tabla 49. Secuencias de cebadores

Nombre	Secuencia	Descripción	SEQ NO	ID
SR36	tagaactgatgcaaaaagtgtctcgacgaaggcacacagaTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC	Ronda 1: Se une en pKD3	SEQ NO: 46	ID
SR38	gtttcgtaattagatagccaccggcgctttaatgcccggaCATA TGAATATCCTCCTTAG	Ronda 1: Se une en pKD3	SEQ NO: 47	ID
SR33	caacacgtttcctgaggaacctgaaacagtatttagaactgatgc aaaaag	Ronda 2: Se une al producto de PCR de la ronda 1	SEQ NO: 48	ID
SR34	cgcacactggcgctcggctctggcaggatgtttcgtaattagatagc	Ronda 2: Se une al producto de PCR de la ronda 1	SEQ NO: 49	ID
SR43	atatcgtcgcagcccacagcaacacgtttcctgagg	Ronda 3: Se une al producto de PCR de la ronda 2	SEQ NO: 50	ID
SR44	aagaatttaacggaggggcaaaaaaacgcacactggcgctc ggc	Ronda 3: Se une al producto de PCR de la ronda 2	SEQ NO: 51	ID

Para la primera ronda de PCR, se llevaron 4x50 µl mezclas de reacción de PCR que contenían 1 ng de pKD3 como molde, 25 µl de 2xphusion, 0,2 µl de cebador SR36 y SR38, y 0, 0,2, 0,4 o 0,6 µl de DMSO hasta un volumen de 50 µl con agua libre de nucleasa y se amplificaron en las siguientes condiciones de ciclo:

Etapa 1: 98c durante 30 s

Etapa 2: 98c durante 10 s

5 Etapa 3: 55c durante 15 s

Etapa 4: 72c durante 20 s

Repetir las etapas 2-4 durante 30 ciclos

10

Etapa 5: 72c durante 5 min

Posteriormente, 5 ul de cada reacción de PCR se procesó sobre un gel de agarosa para confirmar un producto de PCR del tamaño apropiado. El producto de PCR se purificó de la
15 reacción de PCR restante usando un kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean según las instrucciones del fabricante y se eluyó en 30 ul de agua libre de nucleasas.

Para la segunda ronda de PCR, 1 ul de producto de PCR purificado de ronda 1 se utilizó como molde, en 4x50ul de mezclas de reacción de PCR como se ha descrito anteriormente,
20 excepto con 0,2 ul de cebadores SR33 y SR34. Las condiciones del ciclo fueron las mismas que las indicadas anteriormente para la primera reacción de PCR. El producto de PCR se procesó en un gel de agarosa para verificar la amplificación, se purificó y se eluyó en 30 ul como se ha descrito anteriormente.

25 Para la tercera ronda de PCR, se usó 1 ul de producto de PCR purificado de la ronda 2 como molde en reacciones de PCR de 4x50 ul, como se ha descrito, excepto con los cebadores SR43 y SR44. Las condiciones del ciclo fueron las mismas que las descritas para las rondas 1 y 2. Se verificó la amplificación, se purificó el producto de PCR y se eluyó como se ha descrito anteriormente. La concentración y la pureza se midieron usando un
30 espectrofotómetro. El fragmento de ADN lineal resultante, que contiene 92 pb homólogo con respecto a la cadena arriba de thyA, el casete de cloranfenicol flanqueado por sitios frt, y 98 pb homólogo con respecto a la cadena abajo del gen thyA, se transformó en una cepa de Nissle 1917 de *E. coli* que contenía pKD46 cultivada para recombinación. Después de la electroporación, se añadió 1 ml de medio SOC que contenía timidina 3 mM y se dejó que las
35 células se recuperaran a 37 °C durante 2 h con agitación. A continuación, las células se sedimentaron a 10.000 xg durante 1 minuto, el sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 100 ul de LB que contenía timidina 3 mM y se extendió sobre placas de agar LB que contenían thy 3 mM y 20 ug/ml de cloranfenicol. Las células se incubaron a 37 C durante una noche. Las colonias que aparecieron en las placas LB se
40 volvieron a sembrar. + cam 20 ug/ml + o - thy 3 mM. (Los auxótrofos thyA solo crecerán en medios complementados con thy 3 mM).

A continuación, se eliminó la resistencia a los antibióticos con transformación de pCP20. pCP20 tiene el gen Flp de recombinasa de levadura, FLP, genes resistentes a cloranfenicol
45 y ampicilina, y replicación sensible a la temperatura. Las bacterias se cultivaron en medio LB que contenía el antibiótico de selección a 37 °C hasta una DO600 = 0,4 - 0,6. Se lavó 1 ml de células de la siguiente manera: las células se sedimentaron a 16.000 xg durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de glicerol al 10 % enfriado con hielo. Esta etapa de lavado se repitió 3 veces. El sedimento final se
50 resuspendió en 70 ul de glicerol al 10 % enfriado con hielo. A continuación, las células se sometieron a electroporación con 1 ng de ADN plasmídico pCP20 y se añadió inmediatamente a la cubeta 1 ml de SOC complementado con timidina 3 mM. Las células se resuspendieron y se transfirieron a un tubo de cultivo y se cultivaron a 30 °C durante 1 hora.

A continuación, las células se sedimentaron a 10.000 xg durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de LB que contenía timidina 3 mM y se extendió sobre placas de agar LB que contenían thy 3 mM y 100 µg/ml de carbenicilina y se cultivó a 30 °C durante 16-24 horas. A continuación, los transformantes se purificaron en colonias de forma no selectiva (sin antibióticos) a 42 °C.

Para probar los transformantes de colonias purificada, se recogió una colonia de la placa de 42 °C con una punta de pipeta y se resuspendió en 10 µl de LB. Se añadieron por pipeteo 3 µl de la suspensión celular en un conjunto de 3 placas: Cam, (37 °C; pruebas de presencia/ausencia del gen CamR en el genoma de la cepa huésped), Amp, (30 °C, pruebas de presencia/ausencia de AmpR del plásmido pCP20) y LB solamente (células deseadas que han perdido el casete de cloranfenicol y el plásmido pCP20), 37 °C. Las colonias se consideraron curadas si no había crecimiento ni en la placa Cam ni en la Amp, se recogieron y se volvieron a sembrar en una placa LB para obtener colonias individuales y se cultivaron durante una noche a 37 °C.

Ejemplo 24. Cuantificación de fenilalanina (derivatización con cloruro de dansilo)

Para los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en esta invención, que evalúan la capacidad de las bacterias manipuladas genéticamente para degradar fenilalanina y que requieren la cuantificación de los niveles de fenilalanina en la muestra, se empleó un protocolo de derivatización de cloruro de dansilo de la siguiente manera.

Preparación de la muestra

Se prepararon patrones de fenilalanina (1000, 500, 250, 100, 20, 4 y 0,8 µg/ml en agua). En hielo, se añadieron por pipeteo 10 µl de muestra en una placa de 96 pocillos de polipropileno de fondo en V y se añadieron 190 µl de acetonitrilo al 60 % con 1 µg/ml de patrón interno L-fenil-d5-alanina. La placa se selló con calor, se mezcló bien y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. A continuación, se añadieron 5 µl de muestras diluidas a 95 µl de mezcla de derivatización (85 µl de NaHCO₃ 10 mM pH 9,7 y 10 µl de 10 mg/ml de cloruro de dansilo (diluido en acetonitrilo)) en una placa de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V y la placa se selló con calor y se mezcló bien. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 45 min para derivatizar y, a continuación, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 20 µl de las muestras derivatizadas a 180 µl de agua con ácido fórmico al 0,1 % en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, las placas se sellaron térmicamente y se mezclaron bien.

Procedimiento LC-MS/MS

La fenilalanina se midió mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo TSQ Quantum Max. Los detalles del procedimiento de HPLC se describen en la **Tabla 50** y la **Tabla 51**. Los detalles de la espectrometría de masas en tándem se describen en la **Tabla 52**.

Tabla 50. Detalles del procedimiento de HPLC

Columna	Columna Luna C18(2), 5 µm (50 x 2,1 mm)
Fase móvil A	H ₂ O al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	ACN al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Volumen de inyección	10 µl

Tabla 51. Detalles del procedimiento de HPLC

Tiempo total (min)	Caudal (µl/min)	% de A	% de B
0	400	90	10
0,5	400	90	10
0,6	400	10	90
2	400	10	90
2,01	400	90	10
3	400	90	10

Tabla 52. Detalles de la espectrometría de masas en tándem

Fuente de iones	HESI-II
Polaridad	Positiva
Transiciones SRM	
L-Fenilalanina	399,1/170,1
L-Fenil-d5-alanina	404,1/170,1

5 Ejemplo 25 Cuantificación de ácido transcinámico (derivatización de trifluoroetilamina)

Para los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en esta invención, que evalúan la capacidad de las bacterias manipuladas genéticamente para degradar fenilalanina y que requieren la cuantificación de los niveles de ácido Trans- cinámico en la muestra, se empleó un protocolo de derivatización de trifluoroetilamina de la siguiente manera.

Preparación de la muestra

Se preparó un patrón de ácido Trans-cinámico (500, 250, 100, 20, 4 y 0,8 µg/ml en agua). En hielo, se añadieron por pipeteo 10 µl de muestra en una placa de 96 pocillos de polipropileno con fondo en V. A continuación, se añadieron 30 µl de acetonitrilo al 80 % con 2 µg/ml de patrón interno de ácido transcinámico-d7 y la placa se selló con calor, se mezcló bien y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 20 µl de muestras diluidas a 180 µl de MES 10 mM pH 4, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) 20 mM, trifluoroetilamina 20 mM en una placa de polipropileno de 96 pocillos de fondo redondo. La placa se selló con calor, se mezcló bien y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

Procedimiento LC-MS/MS

El ácido transcinámico se midió mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem 25 (LC-MS/MS) usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo TSQ Quantum Max. Los detalles del procedimiento de HPLC se describen en la **Tabla 53** y la **Tabla 54**. Los detalles de la espectrometría de masas en tándem se describen en la **Tabla 55**.

Tabla 53. Detalles del procedimiento de HPLC

Columna	Columna Thermo Aquasil C18, 5 µm (50 x 2,1 mm)
Fase móvil A	H2O al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	ACN al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Volumen de inyección	10 µl

Tabla 54. Detalles del procedimiento de HPLC

Tiempo total (min)	Caudal (µl/min)	% de A	% de B

0	500	100	0
1	500	100	0
2	500	10	90
4	500	10	90
4,01	500	100	0
5	500	100	0

Tabla 55. Detalles de la espectrometría de masas en tándem

Fuente de iones:	HESI-II
Polaridad	Positiva
Transiciones SRM	
Ácido trans-cinámico:	230,1/131,1
Ácido trans-cinámico-d7	237,1/137,2

Ejemplo 26. Cuantificación de fenilalanina, ácido trans-cinámico, ácido fenilacético, ácido fenilpirúvico, ácido fenil-láctico, ácido hipúrico y ácido benzoico (derivatización de 2-hidrazinoquinolina)

Para los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en esta invención, que evalúan la capacidad de las bacterias manipuladas genéticamente para degradar fenilalanina y que requieren la cuantificación de los niveles de fenilalanina, ácido trans-cinámico, ácido fenilacético, ácido fenilpirúvico, ácido fenil-láctico, ácido hipúrico y ácido benzoico en la muestra, se empleó un protocolo de derivatización de 2-hidrazinoquinolona de la siguiente manera.

Preparación de la muestra

Se prepararon soluciones patrón que contenían 250, 100, 20, 4, 0,8, 0,16 y 0,032 µg/ml de cada patrón en agua. En hielo, se añadieron por pipeteo 10 µl de muestra en una placa de 96 pocillos de polipropileno con fondo en V y se añadieron 90 µl de la solución de derivatización que contenían 50 mM de 2-hidrazinoquinolona (2-HQ), sulfuro de dipiridilo y trifetilfosfina en acetonitrilo con patrones internos en 1 µg/ml de L-fenil-d5-alanina, 1 µg/ml de ácido hipúrico d5 y 0,25 µg/ml de ácido trans-cinámico-d7. La placa se selló con calor, se mezcló bien y las muestras se incubaron a 60 °C durante 1 hora para derivatización y, a continuación, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. En una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se añadieron 20 µl de las muestras derivatizadas a 180 µl de agua con ácido fórmico al 0,1 %. Las placas se sellaron con calor y se mezclaron bien.

Procedimiento LC-MS/MS

Los metabolitos derivatizados mediante 2-HQ se midieron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo TSQ Quantum Max. Los detalles del procedimiento de HPLC se describen en la **Tabla 56** y la **Tabla 57**. Los detalles de la espectrometría de masas en tándem se describen en la **Tabla 58**.

Tabla 56. Detalles del procedimiento de HPLC

Columna	Columna Luna C18(2), 3 µm (150 x 2,1 mm)
Fase móvil A	H ₂ O al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	ACN al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Volumen de inyección	10 µl

Tabla 57. Detalles del procedimiento de HPLC

Tiempo total (min)	Caudal (µl/min)	% de A	% de B
0	500	90	10
0,5	500	90	10
2	500	10	90
4	500	10	90
4,01	500	90	10
4,25	500	90	10

Tabla 58. Detalles de la espectrometría de masas en tándem

Fuente de iones	HESI-II
Polaridad	Positiva
Transiciones SRM	
L-Fenilalanina:	307,1/186,1
L-Fenil-d5-alanina	312,1/186
Ácido trans-cinámico	290,05/131,1
Ácido trans-cinámico-d7	297,05/138,1
Ácido hipúrico	321,1/160,1
Ácido hipúrico-d5	326/160
Ácido fenilacético	278,05/160,1
Ácido fenil-láctico	308,05/144,1
Ácido benzoico	264,05/105,1
Fenilpiruvato	306,05/260,1

Ejemplo 27. Eficacia relativa de las cepas con inserción cromosómica y portadoras de plásmidos

Para comparar la velocidad de degradación de fenilalanina entre las cepas bacterianas manipuladas con inserciones cromosómicas y aquellas con plásmidos, se diluyeron cultivos durante una noche 1:100 en LB y se dejaron crecer con agitación (250 rpm) a 37 °C. Después de 1,5 horas de crecimiento, los cultivos se colocaron en una cámara anaerobia Coy que suministraba N₂ al 90 %, CO₂ al 5 %, H₂ al 5 %. Después de 4 horas de inducción, las bacterias se sedimentaron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en tampón de ensayo (medio mínimo M9 con glucosa al 0,5 %, 40 bicarbonato de sodio al 8,4 % y Phe 4 mM). Las velocidades de degradación de la fenilalanina (es decir, la desaparición de la solución de ensayo) o la acumulación de cinamato de 30 a 90 min se normalizaron a 1e9 células. La Tabla 59 muestra las velocidades normalizadas para todas las cepas y describe los genotipos y las actividades de ejemplos no limitantes de cepas manipuladas que llevan plásmidos y cepas manipuladas que comprenden inserciones cromosómicas.

Tabla 59. Genotipo y actividad de cepas manipuladas que llevan plásmidos y cepas manipuladas que comprenden inserciones cromosómicas

Nombre de la cepa	Genotipo	Actividad de PAL (umol/h/10 ⁹ células)	Actividad de LAAD (umol/h/10 ⁹ células)
Cepas basadas en plásmidos			
SYN-PKU101	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina	ND	NA
SYN-PKU102	Alto número de copias de pColE1-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina,	ND	NA

SYN-PKU201	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina	ND	NA
SYN-PKU202	Alto número de copias de pColEI-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina,	ND	NA
SYN-PKU203	<i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i>	0	NA
SYN-PKU401	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina, <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico	1,1	NA
SYN-PKU402	Alto número de copias de pColEI-Ptet::PAL1, resistente a ampicilina, <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico	0,8	NA
SYN-PKU302	Bajo número de copias de pSC101-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina; <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico	2,2	NA
SYN-PKU303	Alto número de copias de pColEI-Ptet::PAL3, resistente a ampicilina, <i>lacZ::Ptet-pheP::cam</i> cromosómico	7,1	NA
SYN-PKU304	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS-PAL3, resistente a ampicilina; <i>lacZ::PfmrS-pheP::cam</i> cromosómico	3	NA
SYN-PKU305	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS-PAL3, resistente a kanamicina; <i>lacZ::PfmrS-pheP::cam</i> cromosómico	3	NA
SYN-PKU306	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS-PAL3, resistente a kanamicina; <i>thyA</i>	0,3	NA
SYN-PKU307	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS-PAL3, resistente a ampicilina;	0,3	NA
SYN-PKU308	Bajo número de copias de pSC101-PfmrS-PAL3, resistente a kanamicina;	0,3	NA
SYN-PKU401	Alto número de copias de pUC57-Ptet::LAAD; resistente a kanamicina	NA	50 (+O ₂), 0(- O ₂)
<u>Cepas integradas</u>			
SYN-PKU501	<i>malPT:: PfmrS-PAL3::kan</i>	0,3	NA
SYN-PKU502	<i>malPT:: PfmrS-PAL3::kan; lacZ::</i> bicistrónico <i>PfmrS-PAL3-pheP::cam</i>	ND	NA
SYN-PKU503	<i>malEK::PfmrS-PAL3::cam</i>	0,3	NA

SYN- PKU504	<i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i>	0,3	NA
SYN- PKU505	<i>cea::PfnrS-PAL3</i>	0,3	NA
SYN- PKU506	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i>	0,7	NA
SYN- PKU507	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i>	5,2	NA
SYN- PKU508	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>pheA</i> auxótrofo	0,4	NA
SYN- PKU509	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i>	4,9	NA
SYN- PKU601	<i>malPT::PfnrS-INT5::kan</i> , <i>rrnBUP</i> - [PAL3]; <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i> (cepa a base de recombinasa)	0,9	NA
SYN- PKU510	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ;	0,6	NA
SYN- PKU511	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; <i>yicS/nepl::PfnrS-PAL3::kan</i> ; <i>malPT::PfnrS-PAL3</i> ; <i>lacZ::PfnrS-pheP</i> ; $\Delta thyA$	7,7	NA
SYN- PKU204	<i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i>	ND	NA
SYN- PKU512	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; <i>malPT::PfnrS-PAL3</i> ; <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i> ; $\Delta thyA$	6,7	NA
SYN- PKU513	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; <i>lacZ::PfnrS-pheP</i> ; $\Delta thyA$	4,9	NA
SYN- PKU514	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; <i>malPT::PfnrS-PAL3</i> ; $\Delta thyA$	0,8	NA
SYN- PKU515	<i>malEK::PfnrS-PAL3</i> ; <i>agallrsmI::PfnrS-PAL3</i> ; <i>cea::PfnrS-PAL3</i> ; $\Delta thyA$	0,7	NA
SYN- PKU516	<i>agallrsmI::PfnrS-PAL3::kan</i>	0,3	NA
SYN- PKU517	<i>malEK::PfnrS-PAL3::cam</i> ; <i>malPT::PfnrS-PAL3::kan</i> ;	2,9	NA

	<i>lacZ::PfnrS-pheP; ΔthyA</i>		
SYN- PKU518	<i>malEK-PfnrS-PAL3::cam;</i> <i>PfnrS::pheP::kan</i>	1,7	NA
SYN- PKU519	<i>ParaBC-PAL3::cam; PfnrS-</i> <i>pheP::kan</i>	1,3	NA
SYN- PKU520	<i>agallrsml::PfnrS-PAL3::kan;</i> <i>PfnrS-PheP::cam</i>	2,0	NA
SYN- PKU801	<i>ΔargR; thyA::cam</i>	ND	NA
SYN- PKU701	<i>ParaBC-LAAD::cam; malEK-</i> <i>PfnrS-PAL3; malPT::PfnrS-</i> <i>PAL3::kan; PfnrS-pheP</i>	2,7	28 (+O ₂), 0(- O ₂)
SYN- PKU521	<i>yicS/nepI::PfnrS-PAL3::kan;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i>	2,4	NA
SYN- PKU522	<i>cea::PfnrS-PAL3::kan;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i>	ND	NA
SYN- PKU523	<i>mailPT::PfnrS-PAL3::kan;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP::cam</i>	0,5	NA
SYN- PKU524	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP</i>	2,9	NA
SYN- PKU702	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP; Para::LAAD</i>	1,5	ND
SYN- PKU703	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP;</i> <i>agallrsml::PfnrS::pheP;</i> <i>Para::LAAD</i>	3,1	ND
SYN- PKU704	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3;</i> <i>yicS/nepI::PfnrS-PAL3;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP; Para::LAAD</i>	3,5	ND
SYN- PKU705	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3;</i> <i>yicS/nepI::PfnrS-PAL3::kan;</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP;</i> <i>agallrsml::PfnrS::pheP</i> <i>Para::LAAD</i>	3,7	ND
SYN- PKU602	<i>malEK:: PT7::PAL3;</i> <i>Para::INT5::cam (recombinasa);</i> <i>lacZ::PfnrS-pheP;</i> <i>malPT::Pconstitutivo::polimeras</i> <i>a T7 (al revés);</i>	2,4	NA
SYN- PKU901	<i>Nissle con resistencia a</i> <i>estreptomycin</i>	NA	NA
SYN- PKU713	<i>LacZ::PfnrS-PAL3::pheP</i>	NA	NA
SYN- PKU706	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepI::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP;</i>	ND	ND

	<i>Para::LAAD, ΔdapA::cm</i>		
SYN- PKU707	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP;</i> <i>Para::FNRS24Y::cm</i>	4,0	NA
SYN- PKU708	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP;</i> <i>Para::FNRS24Y-LAAD; ΔdapA</i>	4,0	44 (+O ₂),0(- O ₂)
SYN- PKU- 709	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP; Para-</i> <i>LAAD; ΔdapA</i>	ND	NA
SYN- PKU- 710	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP;</i> <i>Para::LAAD; exo/cea::</i> <i>LacIPAL3; rhtC/rhtB::LacIPAL3;</i> <i>ΔdapA</i>	4,4	40 (+O ₂),0(- O ₂)
SYN- PKU711	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP;</i> <i>Para::FNRS24Y-LAAD;</i>	ND	ND
SYN- PKU- 712	<i>malEK:: PfnrS-PAL3;</i> <i>malPT::PfnrS-PAL3; yicS/nepl::</i> <i>PfnrS-PAL3; lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP;</i> <i>Para::FNRS24Y; ΔDapA</i>	ND	ND
SYN- PKU- 714	<i>lacZ::PfnrS-pheP,</i> <i>agallrsml::PfnrS-pheP</i>	ND	ND

Ejemplo 28. Cribado por el consumo mejorado de Phe

Se llevan a cabo cribados que utilizan selección genética para mejorar el consumo de fenilalanina en las bacterias manipuladas genéticamente. Los análogos de fenilalanina tóxicos ejercen su mecanismo de acción (MOA) al ser incorporados a la proteína celular, provocando la muerte celular. Se evaluó la utilidad de estos compuestos en un enfoque no dirigido para seleccionar enzimas PAL con mayor actividad. Suponiendo que PAL puede metabolizar estos compuestos tóxicos en un metabolito no tóxico, en lugar de incorporarse a la proteína celular, las bacterias manipuladas genéticamente que tienen una actividad de degradación de fenilalanina mejorada pueden tolerar niveles más altos de estos compuestos, y se pueden cribar y seleccionar en esta base.

Varias cepas bacterianas manipuladas genéticamente, así como el control Nissle, se trataron con dos análogos, p-fluoro-DL-fenilalanina y o-fluoro-DL-fenilalanina (**figura 35**) a concentraciones crecientes. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC) y se

determinó el factor de cambio con respecto a Nissle de tipo natural. Los resultados se muestran en la Tabla 60.

- Estos resultados indican que el para-análogo parece ser captado fácilmente por *pheP* y es potencialmente un sustrato de PAL, y que el ortólogo parece ser captado fácilmente por *pheP* y es potencialmente un sustrato de PAL. Como resultado, estos compuestos tienen utilidad para el cribado de enzimas PAL con mayor actividad.

Tabla 60. MIC y factor de cambio en relación con WT para varias cepas

para-fluoro-Phe		
MIC (ug/ml)	factor de cambio (WT)	Cepa
1250	1	Nissle de tipo natural
<2,4	>↓520X	SYN-PKU203 (Ptet:: <i>pheP</i> cr.)
2500	↑2X	SYN-PKU202 (Ptet-PAL3 de alto número de copias)
19,5	↓64X	SYN-PKU302 (Ptet-PAL de bajo número de copias + Ptet- <i>pheP</i> cr.)
39	↓32X	SYN-PKU303 (Ptet-PAL de alto número de copias + Ptet- <i>pheP</i> cr.)
orto-fluoro-Phe		
MIC (ug/ml)	factor de cambio (WT)	Cepa
62,5	1	Nissle de tipo natural
1	↓64X	SYN-PKU203 (Ptet:: <i>pheP</i> cr.)
250	↑4X	SYN-PKU202 (Ptet-PAL3 de alto número de copias)
31,3	↓2X	SYN-PKU302 (Ptet-PAL de bajo número de copias + Ptet- <i>pheP</i> cr.)
15,6	↓4X	SYN-PKU303 (Ptet-PAL de alto número de copias + Ptet- <i>pheP</i> cr.)

10

Ejemplo 29. Estudio farmacocinético y farmacodinámico de dosis repetidas de bacterias modificadas genéticamente después de la administración diaria de dosis después de la administración por sonda nasogástrica durante 28 días en macacos cangrejeros (no GLP)

- 15 Para evaluar cualquier toxicidad potencial que surja de la administración de bacterias manipuladas genéticamente o de Nissle de *E. coli* sola, se estudian la farmacocinética y la farmacodinamia de las bacterias manipuladas genéticamente y una Nissle de *E. coli* después de la administración de una dosis diaria por sonda nasogástrica (NG) durante 28 días a macacos cangrejeros hembra. Los macacos cangrejeros se seleccionan porque esta especie está estrechamente relacionada, tanto filogenética como fisiológicamente, con los humanos y es una especie comúnmente utilizada para evaluaciones de toxicidad no clínicas. Las bacterias manipuladas genéticamente se administran mediante sonda gástrica nasal, según la vía de administración propuesta en humanos. Se realiza un seguimiento del bienestar general de los animales (observaciones clínicas), la patología clínica del peso (química del suero, hematología y coagulación). El plasma se analiza para determinar los niveles de amoníaco, y las muestras fecales se examinan por la carga bacteriana.

- La cepa manipulada genéticamente comprende una o más copias de PAL3 integrado en el cromosoma y una o más copias de *pheP* integrado en el cromosoma, cada uno de los cuales está bajo el control de un promotor FNRS. En algunos casos, la cepa manipulada genéticamente también comprende una o más copias de LAAD impulsadas por un promotor inducible por arabinosa, por ejemplo, ParaBAD. En algunos casos, la cepa comprende

30

además una mutación de auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además una resistencia a antibióticos, por ejemplo, kanamicina. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente no comprenden una mutación de auxotrofia. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente no comprenden una resistencia a los antibióticos.

Materiales, animales y régimen de dosificación:

El estudio se lleva a cabo de conformidad con las Normas de Buenas Prácticas de Laboratorio de Estudios de Laboratorio no clínicas emitidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (Título 21 del Código de Regulaciones Federales, Parte 58; efectivo el 20 de junio de 1979) y los Principios de Buenas Prácticas de la OCDE. Práctica de laboratorio (C [97] 186/Final; en vigor desde 1997). Los animales se alojan individualmente según las recomendaciones establecidas en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council 2011).

Los animales utilizados en el estudio son macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) criados específicamente no nativos, hembra, con 3 a 6 kg (en el examen físico inicial) de 3 a 8 años (en el examen físico inicial) de edad (ganado de SNBL USA, Origen: Camboya).

Durante la duración del estudio, a los animales se ofrece dieta de mono PMI LabDiet® fibra-Plus® de galletas 5049 dos veces al día. Los animales se mantienen en ayunas durante al menos 2 horas antes de la administración de la dosis y se alimentan dentro de la hora posterior a la dosis. Los animales también se mantienen en ayunas según lo requieran los procedimientos específicos (por ejemplo, antes de las extracciones de sangre para la química del suero, recolección de heces). La dieta se analiza de forma rutinaria en busca de contaminantes y se encuentran dentro de las especificaciones del fabricante. No se espera que estén presentes contaminantes a niveles que puedan interferir con el resultado del estudio. Los registros de análisis de alimentos se mantienen en los registros de las instalaciones de prueba.

Se proporciona agua potable fresca a voluntad a todos los animales. El agua se analiza de forma rutinaria en busca de contaminantes. No hay contaminantes presentes a niveles que puedan interferir con el resultado del estudio. Los animales reciben frutas, verduras, otros suplementos dietéticos y dispositivos de enriquecimiento de jaulas durante el transcurso del estudio.

Los animales previamente en cuarentena se aclimataron a la sala de estudio durante 7 días antes de la iniciación de la dosificación (día 1). La última dosificación se produce el día 28. Se utiliza un esquema de asignación al azar estratificado que incorpora pesos corporales para asignar animales a los grupos de estudio. Los animales se asignan a grupos y se tratan como se indica en la **Tabla 61**.

Tabla 61. Asignaciones de grupo

Grupo	Dosis				Lavado		Número de hembras
	Artículos de prueba/control	Nivel de dosis (ufc/animal)	Conc. (ufc/ml)	Volumen (ml/animal)	Bicar b. Conc. (M)	Volumen (ml/animal)	
1	Artículo de control	0	0	10	0,36	5	3

2	Nissle de <i>E. coli</i>	1x10 ⁹	1x10 ⁹	1	0,12	14	3
3	Nissle de <i>E. coli</i>	1x10 ¹²	1x10 ¹¹	10	0,36	5	3
4	Bacterias manipuladas genéticamente	1x10 ⁹	1x10 ⁹	1	0,12	14	3
5	Bacterias manipuladas genéticamente	1x10 ¹²	1x10 ¹¹	10	0,36	5	3

El control de Nissle y cepas bacterianas manipuladas genéticamente se preparan a 1 x 10⁹ ufc/ml y 1 x 10¹¹ ufc/ml en glicerol al 15 % en 1X PBS con glucosa al 2,2 % y timidina 3 mM y se mantienen de 86 a -60 °C (véase la **Tabla 61**). Como vehículo de control se utiliza PBS elaborado en glicerol al 20 % con bicarbonato de sodio. La concentración de carbonato es de 0,36 M y de 0,12 M para el bicarbonato de sodio. El día de cada dosificación, las bacterias y el control del vehículo se retiran del congelador y se ponen en hielo y se descongelan y se colocan en hielo hasta la dosificación.

- Los animales se dosificaron a 0, 1 × 10⁹ o 1 x 10¹² ufc/animal. Todos los animales se dosifican mediante sonda gástrica nasal (NG) seguida de control/lavado con vehículo una vez al día durante 28 días. La concentración de bicarbonato y el volumen de cada grupo se especifican en la Tabla YYY. Los viales se invierten al menos 3 veces antes de extraer la dosis en la jeringa. Se registran el lugar de la dosis y la hora de la dosis (final del tiempo de lavado).

Análisis

- Estado general: las observaciones clínicas se realizan dos veces al día comenzando el segundo día de aclimatación para cada animal. La primera observación es por la mañana, antes de la limpieza de la habitación. La segunda observación es no antes de 4 horas después de la observación de la mañana. Durante la fase de dosificación, la segunda observación se realiza 4 horas (± 10 minutos) después de la administración de la dosis. Se realizan observaciones clínicas adicionales, según sea necesario.

Peso: Cada animal se pesa en el Día -6, 1, 8, 15, 22, y 29 antes de la primera alimentación y también antes de la administración de la dosis. Se toman pesos corporales adicionales según sea necesario si es necesario.

- Recolección de sangre: se recolecta sangre de una vena periférica de animales conscientes restringidos. Siempre que sea posible, la sangre se recolecta mediante una sola extracción y a continuación se divide de manera apropiada. La frecuencia de recolección de muestras se resume en la Tabla 62.

Tabla 62. Frecuencia de recogida de muestras

Punto temporal	Hematología	Coagulación	Química sérica	Muestra plasma (en hielo)	Muestra fecal (en hielo)
Aclimatación	1x	1x	1x	1x	1x

Semana 1					
Dosificación	Día 2 (Predosis)	Día 2 (Predosis)	Día 2 (Predosis)	Días 2 y 7	Días 2 y 7
Dosificación	Día 14 (Predosis)	Día 14 (Predosis)	Día 14 (Predosis)	Día 14 (Predosis)	Día 14- 20
Dosificación	-	-	-		Día 21- 27-
Dosificación	-	-	-	Día 28 (Predosis)	Día 28- 30
Dosificación Semanas	Día 30	Día 30	Día 30	Día 30	Día 35, 40

- = No aplicable

x = Número de veces que el procedimiento se realiza en la semana

Hematología: se analizan aproximadamente 1,3 ml de sangre en tubos K2EDTA de 2 ml usando un analizador automático Advia. Los parámetros medidos son glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, anchura de distribución de glóbulos rojos, plaquetas, volumen plaquetario medio, recuento diferencial de leucocitos (absoluto): neutrófilos absoluto, linfocitos absoluto, monocitos absoluto, eosinófilos absoluto, basófilos absoluto, porcentaje de Reticulocitos y Recuento Absoluto de Reticulocitos.

Coagulación: se analizan aproximadamente 1,3 ml de sangre en tubos de citrato de sodio al 3,2 % de 1,8 ml. Los siguientes parámetros de coagulación se determinan utilizando un analizador automático STACompact: tiempo de tromboplastina parcial activado, fibrinógeno y tiempo de protrombina. El plasma tratado con citrato de sodio se almacena entre -60 y -86 °C antes del análisis y se desecha después del análisis.

Química del suero: Los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 horas antes de la extracción de la muestra. Los siguientes parámetros se analizan en aproximadamente 1 ml de sangre en tubos separadores de suero de 4 ml utilizando un analizador AU680: albúmina, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa aspartato aminotransferasa, bilirrubina total, calcio, colesterol total, creatina cinasa, creatinina, glucosa, fósforo inorgánico, proteína total, triglicéridos, sodio, potasio, cloruro, globulina, relación albúmina/globulina, nitrógeno ureico en sangre y gamma glutamiltransferasa.

El suero residual se almacena de -60 a -86 °C y se desecha antes de la finalización del estudio.

Muestras de plasma: Los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 horas antes de la extracción de la muestra. Se recogen muestras de sangre de la vena femoral en los puntos de tiempo objetivo que se enumeran en la Tabla YYY. Después de tomar alícuotas del volumen de sangre objetivo en el tubo de sangre, se agregan aproximadamente 0,05 ml de aceite mineral cubriendo la superficie de la sangre. Los tubos no se invierten y se colocan en una rejilla y se humedecen con hielo. Se registraron las fechas y horas de recolección de muestras de sangre. El volumen mínimo de muestra es de 1 ml de sangre recogida en un tubo de heparina de litio de 2 ml. Dentro de los minutos posteriores a la recolección, las muestras se centrifugan entre 2 y 8 °C para obtener plasma. El plasma se transfiere a un vial y se almacena entre -60 y -86 °C. Las muestras se almacenan en hielo seco antes del análisis. El análisis de las muestras se realiza utilizando un instrumento analizador de amoníaco en sangre.

La fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido hipúrico se miden mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo TSQ Quantum Max.

Recogida de muestras fecales: Dos muestras de heces por animal se recogen en los puntos temporales objetivo enumerados en la Tabla YYY. Las fechas y tiempos de recolección de muestra se registran. Se usa un tubo Falcon de 50 ml con aproximadamente 5 ml de PBS como recipiente (si las heces son líquidas, no se agrega PBS). Para obtener el peso de la muestra fecal, se tomó el peso del recipiente antes y después del muestreo. Se recogen muestras del fondo de la jaula de cada animal. Para obtener muestras frescas y no contaminadas, se retiran los restos de comida y se limpia y exprime la bandeja de la jaula para eliminar los residuos y/o el agua antes de la recolección. La muestra se coloca en hielo húmedo inmediatamente después de la recolección. Las muestras se almacenan entre -20 y -15 °C hasta su análisis. El análisis de las muestras se realiza mediante un procedimiento analítico de PCR.

Ejemplo 30. Estudio de toxicidad de 4 semanas en macacos cangrejeros con recuperación de 4 semanas (GLP)

Para evaluar cualquier toxicidad potencial derivada de la administración de las bacterias manipuladas genéticamente, se estudiaron la farmacocinética y la farmacodinámica de las bacterias manipuladas genéticamente después de la administración de dosis diaria por sonda nasogástrica (NG) durante 28 días a macacos cangrejeros hembra en condiciones de GLP.

La cepa manipulada genéticamente comprende una o más copias de PAL3 integrado en el cromosoma y una o más copias de pheP integrado en el cromosoma, cada uno de los cuales están bajo el control de un promotor FNRS. En algunos casos, la cepa manipulada genéticamente también comprende una o más copias de LAAD, impulsada por un promotor inducible por arabinosa, por ejemplo, ParaBAD. En algunos casos, las cepas comprenden además una mutación de auxotrofia, por ejemplo, deltaThyA. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente comprenden además una resistencia a antibióticos, por ejemplo, kanamicina. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente no comprenden una mutación de auxotrofia. En algunos casos, las bacterias manipuladas genéticamente no comprenden una resistencia a los antibióticos.

El estudio se lleva a cabo de conformidad con los Reglamentos de Buenas Prácticas de Laboratorio de Estudios de Laboratorio no clínicos emitidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (Título 21 del Código de Regulaciones Federales, Parte 58; efectivo el 20 de junio de 1979) y los Principios de Buenas Prácticas de la OCDE. Práctica de laboratorio (C [97] 186/Final; en vigor desde 1997). Los animales se alojan individualmente según las recomendaciones establecidas en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council 2011).

A los animales se les administra la bacteria manipulada genéticamente o el vehículo de control esencialmente como se describe en el Ejemplo 29, excepto que todos los materiales se fabrican según las normas GMP. La dosificación se tabula en la **Tabla 63**. Además, los animales se aclimatan durante 14 días y el período de dosificación es diario durante 28 días seguido de un período de recuperación de 28 días. Además, los animales se sacrifican al final del estudio para realizar un análisis histológico.

Tabla 63. Período y régimen de dosificación

ACLIMATACIÓN	14 días				
PREP. DE ARTÍCULO DE PRUEBA	Diariamente				
PERÍODO DE DOSIFICACIÓN	Diariamente durante 28 días				
PERÍODO DE RECUPERACIÓN	28 días				
REGULACIONES	FDA GLP				
				NÚMERO DE ANIMALES	
GRUPO	ARTÍCULO DE PRUEBA	NIVEL DE DOSIS	VÍA DE DOSIS	MACHOS (♂)	HEMBRAS (♀)
1	Vehículo	0	NG	3 ^a +2 ^b	3 ^a +2 ^b
2	Bacterias manipuladas genéticamente	1x10 ⁹	NG	3 ^a	3 ^a
3	Bacterias manipuladas genéticamente	1x10 ¹⁰	NG	3 ^a	3 ^a
4	Bacterias manipuladas genéticamente	1x10 ¹¹	NG	3 ^a +2 ^b	3 ^a +2 ^b

^aAutopsia terminal, Día 29

^bAutopsia de recuperación, Día 56

El análisis del estudio se realiza como se describe en la Tabla 64. Los parámetros de hematología, coagulación, química sérica y muestras de plasma son esencialmente como se describe en el ejemplo 30, y se analizan usando los procedimientos descritos en el ejemplo 30. La recolección y análisis de muestras fecales se realizan esencialmente como se describe en el Ejemplo 30.

Tabla 64. Análisis del estudio

PROCEDIMIENTO	PUNTOS TEMPORALES
ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE DOSIS	Día 1 y día 28
OBSERVACIONES CLÍNICAS	Dos veces la día (observaciones en el lateral de la jaula)
CONSUMO DE ALIMENTOS	Diariamente (cualitativo)
PESOS CORPORALES	Semanalmente
OFTALMOLOGÍA	Una vez durante la aclimatación, Semana 4 y Semana 8
ECG/HR/BP	Una vez durante la aclimatación, Semana 4 y Semana 8
HEMATOLOGÍA	Dos veces durante la aclimatación, Día 2 (predosis), Día 15 (predosis), Día 29, Día 42 y Día 56
COAGULACIÓN	Dos veces durante la aclimatación, Día 2 (predosis), Día 15 (predosis), Día 29, Día 42 y Día 56

QUÍMICA SÉRICA	Dos veces durante la aclimatación, Día 2 (predosis), Día 15 (predosis), Día 29, Día 42 y Día 56
TEMPERATURA DEL CUERPO (RECTAL)	Dos veces durante la aclimatación (con al menos 7 días entre las mediciones), una vez a la semana durante la dosificación (~6 horas después de la dosis), y las Semanas 5 y 8
RECOGIDA DE MUESTRA DE HECES (CULTIVO BACTERIANO)	Una vez durante la aclimatación, antes de la dosificación los Días 2, 7 y 14, Día 29, Día 33 y Semana 8. Se recogen hisopos rectales/fecales mediante un aplicador con punta de algodón; la parte de algodón del hisopo se transfiere a un tubo con un caldo/medio apropiado y se coloca inmediatamente en hielo húmedo. Las muestras fecales se almacenan a una temperatura de 2 a 8 °C hasta el momento del análisis.
RECOGIDA DE SANGRE PARA CITOCINAS	Una vez durante la aclimatación, los Días 1, 3, 7, 14 y 28 (6 horas después de la dosis) y el Día 56
RECOGIDA DE MUESTRA DE SANGRE PARA ARCHIVO (MUESTRA A CONSERVAR PARA POSIBLE ANÁLISIS)	Una vez durante la aclimatación, los Días 1, 3, 7, 14 y 28 (6 horas después de la dosis) y el Día 56; las muestras de sangre se procesan al suero; las muestras se almacenan congeladas.
AUTOPSIA Y RECOGIDA DE TEJIDO	Todos los animales (por ejemplo, colon, intestino, ciego, hígado, bazo)
PESOS DE LOS ÓRGANOS	Todos los animales
RECOGIDA DE TEJIDO PARA EVALUACIÓN DE PK/PD	Todos los animales
HISTOPATOLOGÍA	Todos los animales
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	Comparativo (Anova/Bartlett's)

Ejemplo 31: Bacterias modificadas genéticamente con etiqueta HlyA para la secreción de PME

- 5 Las construcciones para la secreción de PME se generaron, como se muestra en la **Tabla 65**. Estas secuencias se etiquetan posteriormente, por ejemplo, con una etiqueta de HIS, por ejemplo, insertada antes de la secuencia de secreción del extremo C. *E. coli* se transforma con las construcciones en un plásmido de bajo número de copias. Las PME secretadas se aíslan del medio usando cromatografía de afinidad (etiqueta de His). El peso molecular de PME se confirma mediante transferencia Western. La actividad de la enzima purificada se prueba en un ensayo *in vitro* en un tampón que contiene fenilalanina. Los metabolitos se miden a lo largo del tiempo, como se describe en los Ejemplos 24-26.

Tabla 65. Secuencias de secreción

SEQ NO	ID	Descripción	Secuencia
SEQ NO: 52	ID	Etiqueta de secreción HlyA	

		<u>LNPLINEISKIISAAGNFDVKEERAAASL</u> <u>LQLSGNASDFS YGRNSITLTASA</u>
SEQ ID NO: 53	PAL (mayúsculas) expresada como proteína de fusión con los 53 aminoácidos de los extremos C de la alfa- hemolisina (hlyA) de CFT073 de <i>E. coli</i> (minúsculas).	MKAKDVQPTIIINKNGLISLEDIYDIAIK QKKVEISTEITELLTHGREKLEEKLSNG EVIYGINTGFGGNANLVVPFEKIAEHQ QNLLTFLSAGTGDYMSKPCIKASQFTM LLSVCKGWSATRPIVAQAIVDHINHDI VPLVPRYGSVGASGDLIPLSYIARALCG IGKVYYMGAEIDAAEAIKRAGLTPLSL KAKEGLALINGTRVMSGISAITVIKLEK LFKASISAIALAVEALLASHEHYDARIQ QVKNHPGQNAVASALRNLLAGSTQVN LLSGVKEQANKACRHQEITQLNDTLQE VYSIRCAPQVLGIVPESLATARKILERE VISANDNPLIDPENGDLVHGGNFMGQY VARTMDALKLDIALIANHLHAIVALM MDNRFSRGLPNSLSPTPGMYQGFKGV QLSQTALVAIRHDCAASGIHTLATEQ YNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRLNI VSMITLVVCQAIHLRGNISEIAPETAKF YHAVREISSPLITDRALDEDIIRIADAIIN DQLPLPEIMLEE <u>Inplineiskiisaagnfdvkeeraaasllqlsgnasdfs ygr</u> <u>nsitltasa*</u>
SEQ ID NO: 54	LAAD (mayúsculas) expresada como proteína de fusión con los 53 aminoácidos de los extremos C de la alfa- hemolisina (hlyA) de CFT073 de <i>E. coli</i> (minúsculas).	MNISRRKLLLVGAAGVLGGAALVP MVR RDGKFVEAKSRASFVEGTQGALP KEADVVIIGAGIQGIMTAINLAERGMS VTILEKGQIAGEQSGRAYSQIISYQTSPE IFPLHHYGKILWRGMNEKIGADTSYRT QGRVEALADEKALDKAQAWIKTAKEA AGFDTPLNTRIIKGEELSNRLVGAQTP WTVAAFEEDSGSVDPETGTPALARYA KQIGVKIYTNC AVRGIETAGGKISDVVS EKGAIKTSQVVLGGIWSRLFMGNMGI DIPTLNVYLSQQRVSGVPGAPRGNVHL PNGIHFREQADGTYAVAPRIFTSSIVKD SFLLGPKFMHLLGGGELPLEFSIGEDLF NSFKMPTSWNLDEKTPFEQFRVATATQ NTQHLD AVFQRMKTEFPVFEKSEVVE RWGAVVSPTFDELPIISEVKEYPGLVIN TATVWGMTEGPAAGEVTADIVMGKK PVIDPTPFS LDRFKK <u>Inplineiskiisaagnfdvkeeraaasllqlsgnasdfs ygr</u>
		<u>nsitltasa</u>
SEQ ID NO: 55	Señal de secreción de HylA	

		CTTAATCCATTAATTAATGAAATCAG CAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAATT TTGATGTTAAAGAGGAAAGAGCTGC AGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTA ATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGG AACTCAATAACTTTGACAGCATCAGC ATAA
SEQ ID NO: 56	LAAD (en negrita y cursiva) impulsada por ParaBAD (subrayado) con etiqueta de secreción de HylA del extremo C (en negrita)	<u>Acttttcatactccccccattcagagaagaaaccaattgtcca</u> <u>tattgcatcagacattgccgtcactgcgtctttactggctcttct</u> <u>cgctaaccacccgtaaccccgcttattaaaaagcattctgtg</u> <u>acaaaagcgggaccaaagccatgacaaaaacgcgtacaaaa</u> <u>agtctctataatcacggcagaaaa</u> <i>atgaacattcaaggagaaagctacttttaggtgtgtgtgt</i> <i>gcgggcggttttagcagggtgtgtgcggcttagttccaatgggt</i> <i>cgccgtgacggcaaatgttggaagctaaatcaagagcat</i> <i>cattgtgtgaaggtaagcaaggggctcttctaaagaagca</i> <i>gatgtagtattattgtgtccggtattcaagggtatgacc</i> <i>gctattaaccttgcgtgaacgtggtatgagtgctactatcttag</i> <i>aaaagggtcagattgcgggtgagcaatcaggccgtgcat</i> <i>acagccaaattattagttaccaaacatcgccagaaatcttc</i> <i>ccattacaccattatgggaaaaatattatggcggtggcatgaa</i> <i>tgagaaaaattgtgtcggtatgataccagttatcgctactcaaggte</i> <i>gtgtagaagcgctggcagatgaaaaagcattagataaag</i> <i>ctcaagcggtggatcaaacagctaaagaagcggcagggt</i> <i>ttgatacaccattaaatctgcctcattaaagggtgaagag</i> <i>ctatcaaatcgcttagtcgggtctcaaacgccatggactgtt</i> <i>gtgtcatttgagaagattcagggtctgtgtgactctgaaaca</i> <i>ggcacacctgcactcgtctgttatgcaaaaacaaatcggtgt</i> <i>gaaaatttataccaactgtgcagtaagagggtattgaaactg</i> <i>cgggtgtgtaaaatctctgtatgtgtgagtgagaaaggggc</i> <i>gattaaaacgtctcaagttgtactcgtgggggtatctggte</i> <i>gcgtttatttatgggcaatatgggtattgatacccaacgctc</i> <i>aatgtatatctatcacacaacgtgtctcaggggttcctggt</i> <i>gcaccacgtggtaatgtgcatttacctaaggtattcatttc</i> <i>gcgaacaagcggatggtacttatgcggtgcaccacgtatc</i> <i>tttacgagttcaatagtc aaagatagcttctctgtagggcct</i> <i>aaatttatgcacttattaggtggcggagagttaccgttgaa</i> <i>ttctctattgtgaagatctatttaattcatttaaaatgccgac</i> <i>ctcttggaatttagatgaaaaaacaccattcgaacaattcc</i> <i>gagttgccacggcaacacaaaatacgcacacacttagatg</i> <i>ctgttttcaaagaatgaaaacagaaattccagttattgaa</i> <i>aaatcagaagttgtgaacgttgggggtgccgttgtagtec</i> <i>aacatttgatgaattacctatcatttctgaggtcaagaata</i> <i>cccaggcttagtgattaacacggcaacagtggtgggtatg</i> <i>acagaaggccccgcagcgggtgaagtgaccgctgatatt</i> <i>gtcatgggcaagaaacctgtattgatccaacccgttagt</i>

		<i>ttggatcggtttaagaagtaaCTTAATCCATTAAT TAATGAAATCAGCAAAATCATTTTCAGC TGCAGGTAATTTTGATGTTAAAGAGG AAAGAGCTGCAGCTTCTTTATTGCAGT TGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCAT ATGGACGGAACCTCAATAACTTTGACA GCATCAGCATAA</i>
SEQ ID NO: 57	PfnrS-PAL3 con etiqueta de secreción del extremo C. PfnrS (minúscula en negrita), la secuencia <i>PAL3</i> está subrayada y en mayúsculas. La etiqueta de secreción del extremo C está en mayúsculas en negrita	GGTACCagttgttcttattgggtggtgttgccttatggtt gcatcgtagtaaatgggtgtaacaaaagcaattttccgg ctgtctgtatacaaaaacgcgtaagtttgagcgaagtc aataaactctctaccattcagggaatctctcttGG ATCCctctagaataattttgtttaactttaagaaggag atatacatATGAAAGCTAAAGATGTTCA <u>GCCAACCATTATTATTAATAAAAAATG</u> <u>GCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTAT</u> <u>GACATTGCGATAAAACAAAAAAAG</u> <u>TAGAAATATCAACGGAGATCACTGA</u> <u>ACTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAAT</u> <u>TAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGA</u> <u>GGTTATATATGGAATCAATACAGGAT</u> <u>TTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTG</u> <u>CCATTTGAGAAAAATCGCAGAGCATCA</u> <u>GCAAAATCTGTAACTTTTCTTTCTGC</u> <u>TGGTACTGGGGACTATATGTCCAAAC</u> <u>CTTGTATTAAAGCGTCACAATTTACT</u> <u>ATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTG</u> <u>GTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTC</u> <u>AAGCAATTGTTGATCATATTAATCAT</u> <u>GACATTGTTCTCTGGTTCCTCGCTAT</u> <u>GGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTT</u> <u>AATTCCTTTATCTTATATTGCACGAG</u> <u>CATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTAT</u> <u>TATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGC</u> <u>TGAAGCAATTAACGTGCAGGGTTG</u> <u>ACACCATTATCGTTAAAAGCCAAAGA</u> <u>AGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCC</u> <u>GGGTAATGTCAGGAATCAGTGCAATC</u> <u>ACCGTCATTAACTGGAAAACTATT</u> <u>TAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCC</u> <u>TTGCTGTTGAAGCATTACTTGCATCT</u> <u>CATGAACATTATGATGCCCGGATTCA</u> <u>ACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCAA</u> <u>AACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTA</u> <u>ATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTT</u> <u>AATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACA</u> <u>AGCCAATAAAGCTTGTCGTCATCAAG</u> <u>AAATTACCCAACTAAATGATACCTTA</u> <u>CAGGAAGTTTATTCAATTCGCTGTGC</u> <u>ACCACAAGTATTAGGTATAGTGCCAG</u>

		<u>AATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAATA</u> <u>TTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAA</u> <u>TGATAATCCATTGATAGATCCAGAAA</u> <u>ATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAT</u> <u>TTTATGGGGCAATATGTCGCCCCGAAC</u> <u>AATGGATGCATTA AAACTGGATATTG</u> <u>CTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCC</u> <u>ATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCG</u> <u>TTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAT</u> <u>GAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAG</u> <u>GTTTTAAAGGCGTCCA ACTTTCTCAA</u> <u>ACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCA</u> <u>TGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATA</u> <u>CCCTCGCCACAGAACAATACAATCAA</u> <u>GATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGC</u> <u>CGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGC</u> <u>AGAAATTACGCAATATTGTTTCAATG</u> <u>ACAATTCTGGTAGTTTGTCAGGCCAT</u> <u>TCATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAA</u> <u>TTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTAC</u> <u>CATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCC</u> <u>TTTGATCACTGATCGTGCGTTGGATG</u> <u>AAGATATAATCCGCATTGCGGATGCA</u> <u>ATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCC</u> <u>AGAAATCATGCTGGAAGAATAACTT</u> <u>AATCCATTAATTAATGAAATCAGCA</u> <u>AAATCATTTTCACTGCAGGTAATTT</u> <u>TGATGTTAAAGAGGAAAGAGCTGC</u> <u>AGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGT</u> <u>AATGCCAGTGATTTTTCATATGGAC</u> <u>GGA ACTCAATAACTTTGACAGCAT</u> <u>CAGCATAA</u>

Tabla 66. Secuencias de las proteínas HlyB y HlyD

SEQ ID NO: 58	Proteína HlyB	MDSCHKIDYGLYALEILAQYHNVSVPN EEIKHRFDTDGTGLGLTSWLLAAKSLE LKVKQVKKTIDRLNFISLPALVWREDG RHFILTKVSKEANRYLIFDLEQRNPRVL EQSEFEALYQGHIIILASRSSVTGKLAK FDFTWFIPAIKRYRKIFIETLVVSVFLQLF ALITPLFFQVVMKVLVHRGFSTLNVI TVALSVVVVFEILSGLRTYIFAHSTSRI DVELGAKLFRHLLALPISYFESRRVGD TVARVRELDQIRNFLTGQALTSVLDLL FSFIFFAVMWYYSPLTLVILFSLPCYA AWSVFISPIRLRRLLDDKFSRNADNQSF VESVTAINTIKAMAVSPQMTNIWDKQL AGYVAAGFKVTVLATIGQQGIQLIKT

		VMIINLWLG AHLVISGDL SIGQLIAFNM LAGQIVAPVIRLAQIWQDFQQVGISVT RLGDVLNSPTESYHGKLALPEINGNITF RNIRFRYKPDSPVILDNINLSIKQGEVIG IVGRSGSGKSTLTKLIQRFYIPENGQVLI DGHDLALADPNWLRQVGVVLQDNV LLNRSIIDNISLANPGMSVEKVIYA AKL AGAHDFISELREGYNTIVGEQGAGLSG GQRQRIAIARALVNNPKILIFDEATSAL DYESEHIIMRNMHKICKGRTVIIIHRL STVKNADRIIVMEKGKIVEQGKHKELL SEPESLYSYLYQLQSD
SEQ ID NO: 59	Proteína HlyD	MKTWLMGFSEFLRYKLVWSETWKIR KQLDTPVREK DENEFLPAHLELIETPVS RRPRLVAYFIMGFLVIAVILSVLGQVEI VATANGKLTLSGRSKEIKPIENSIVKEII VKEGESVRKGDVLLKLTALGAEADTL KTQSSLLQTRLEQTRYQILSR SIELNKL PELKLDP EYPFQNVSEEEVLRLTSLIKE QFSTWQNQKYQKELNLDKKRAERLTI LARINRYENLSRVEKSRLDDFRSLLHK QAIKHAVLEQENKYVEAANELRVYK SQLEQIESEILSAKEEYQLVTQLFKNEIL DKLRQTTDNIELLTLEKNEERQQAS VIRAPVSGKVQQLKVHTEGGVVTAE TLMVIVPEDDTLEV TALVQNKDIGFIN VGQNAIIKVEAFPYTRYGYLVGKVKNI NLDAIEDQKLGLVFN VIVSVEENDLST GNKHIPLSSGMAVTA EIKTGMRSVISY LLSPLEESV TESLHER

Ejemplo 32: Bacterias modificadas genéticamente que comprenden construcciones adicionales

- 5 Las construcciones para la secreción de PME se generaron como se muestra en la **Tabla 66**.

Tabla 66

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Transportador de fenilalanina [cepa de <i>Escherichia coli</i> K-12 sustr. mg1655] Ac. N.º NP_415108 (PheP)	MKNASTVSED TASNQEPTLHRGLHNRHIQ LIALGGAIGTGLFLGIGPAIQMAGPAVLLG YGVAGIIAFLIMRQLGEMVVEEPVSGSFAH FAYKYWGPFAGFLSGWNYWVMFVLVGM AELTAAGIYMQYWFPDVPTWIWAAFFIII	60

	NAVNLVNVRLYGETEFWFALIKVLAIGMI GFGLWLLFSGHGGEKASIDNLWRYGGFFA TGNGLLILSLAVIMFSFGGLELIGITAAEA RDPEKSIPKAVNQVVYRILLYIGSLVVLL ALYPWVEVKSNSPFVMIFHNLDNSNVAS ALNFVILVASLSVYNSGVYSNSRMLFGLS VQGNAPKFLTRVSRRGVPINSLMLSGAITS LVVLINYLTPQKAFGLLMALVVATLLLNW IMICLAHLRFRAAMRRQGRETQFKALLYP FGNYLCIAFLGMILLMCTMDDMRLSAIL LPVWIVFLFMAFKTLRRK	
Proteína de transporte de aminoácido aromático AroP [F11 de <i>Escherichia coli</i>] Ac. N.º: EDV65095	MEGQQHGEQLKRGLKNRHIQLIALGGAIG TGLFLGSASVIQSAGPGIILGYAAGFIAFLI MRQLGEMVVEEPVAGSFSHFAYKYWGSF AGFASGWNWVLYVLVAMAELTAVGKY IQFWYPEIPTWVSAAVFFVVINAINLTNVK VFGEMEFWFAIKVIAVVAMIFGAWLLFS GNGGPQASVSNLWDQGGFLPHGFTGLVM MMAIIMFSFGGLELVGITAAEADNPEQSIP KATNQVIYRILIFYIGSLAVLLSLMPWTRV TADTSPFVLIFHELGDTFVANALNIVVLT ALSVYNLCVYCNSRMLFGLAQGNAPKA LASVDKRGVPVNTILVSALVTALCVLINYL APESAFGLLMALVVSALVINWAMISLAHM KFRRAKQEQGVVTRFPALLYPLGNWVCL LFMAAVLVIMLMTPGMAISVYLIPVWLIV LGIGYLFKEKTAKAVKAH	61
promotor FNRS (en negrita, minúsculas)-PheP (mayúsculas subrayado)	GGTACCagttgttcttattggtggtgtgctttatggttgc tcgtagtaaatggtgtaacaaaagcaattttccgctgtctgt atacaaaaacgcgtaaatgttgagcgaagtcaataaactct ctaccattcagggaataatctctcttGGATCCctctagaa ataatttgtttaactttaagaaggagatatacatATGAAA <u>AACGCGTCAACCGTATCGGAAGATACTG</u> <u>CGTCGAATCAAGAGCCGACGCTTCATCG</u> <u>CGGATTACATAACCGTCATATTCAACTG</u> <u>ATTGCGTTGGGTGGCGCAATTGGTACTG</u> <u>GTCTGTTTCTTGGCATTGGCCCGGCGATT</u> <u>CAGATGGCGGGTCCGGCTGTATTGCTGG</u> <u>GCTACGGCGTCGCCGGGATCATCGCTTT</u> <u>CCTGATTATGCGCCAGCTTGGCGAAATG</u> <u>GTGGTTGAGGAGCCGGTATCCGGTTCAT</u> <u>TTGCCCACTTGCCTATAAATACTGGGG</u> <u>ACGTTTTCGGGCTTCCTCTCTGGCTGGA</u> <u>ACTACTGGGTAATGTTCTGTGCTGGTGGG</u> <u>AATGGCAGAGCTGACCGCTGCGGGCATC</u> <u>TATATGCAGT63ACTGGTTCCCGGATGTT</u> <u>CCAACGTGGATTTGGGCTGCCGCCTTCTT</u> <u>TATTATCATCAACGCCGTTAACCTGGTG</u> <u>AACGTGCGCTTATATGGCGAAACCGAGT</u>	62

	<u>TCTGGTTTTCGTTGATTAAAGTGCTGGC</u> <u>AATCATCGGTATGATCGGCTTTGGCCTG</u> <u>TGGCTGCTGTTTTCTGGTCACGGCGGCG</u> <u>AGAAAGCCAGTATCGACAACCTCTGGCG</u> <u>CTACGGTGGTTTCTTCGCCACCGGCTGG</u> <u>AATGGGCTGATTTTGTCTGCTGGCGGTAA</u> <u>TTATGTTCTCCTTCGGCGGTCTGGAGCTG</u> <u>ATTGGGATTACTGCCGCTGAAGCGCGCG</u> <u>ATCCGGAAAAAAGCATTCCAAAAGCGGT</u> <u>AAATCAGGTGGTGTATCGCATCCTGCTG</u> <u>TTTTACATCGGTTCACTGGTGGTTTTACT</u> <u>GGCGCTCTATCCGTGGGTGGAAGTGAAA</u> <u>TCCAACAGTAGCCCGTTTGTGATGATTTT</u> <u>CCATAATCTCGACAGCAACGTGGTAGCT</u> <u>TCTGCGCTGAACTTCGTCATTCTGGTAGC</u> <u>ATCGCTGTCAGTGTATAACAGCGGGGTT</u> <u>TACTCTAACAGCCGCATGCTGTTTGGCCT</u> <u>TTCTGTGCAGGGTAATGCGCCGAAGTTT</u> <u>TTGACTCGCGTCAGCCGTCGCGGTGTGC</u> <u>CGATTAACCTCGCTGATGCTTTCCGGAGC</u> <u>GATCACTTCGCTGGTGGTGTAAATCAAC</u> <u>TATCTGCTGCCGCAAAAAGCGTTTGGTC</u> <u>TGCTGATGGCGCTGGTGGTAGCAACGCT</u> <u>GCTGTTGAACTGGATTATGATCTGTCTG</u> <u>GCGCATCTGCGTTTTTCGTGCAGCGATGC</u> <u>GACGTCAGGGGCGTGAAACACAGTTTAA</u> <u>GGCGCTGCTCTATCCGTTCCGGCAACTAT</u> <u>CTCTGCATTGCCTTCCTCGGCATGATTTT</u> <u>GCTGCTGATGTGCACGATGGATGATATG</u> <u>CGCTTGTGAGCGATCCTGCTGCCGGTGT</u> <u>GGATTGTATTCCTGTTTATGGCATTAAA</u> <u>ACGCTGCGTCGGAAATAA</u>	
promotor FNRS (en negrita, minúsculas)-AroP (en mayúsculas subrayado, optimizado por codones)	GGTACC<u>agttgttcttattggtggtgtgctttatggttgc</u> <u>tcgtagtaaagttgtaacaaaagcaattttccggtgtctgt</u> <u>atacaaaaacgccgtaaagtttgagcgaagtcaataaactct</u> <u>ctaccattcagggaataatctctcttGGATCC</u><u>cctetaga</u> <u>ataattttgtttaactttaagaaggagatacatATGGAG</u> <u>GGCAGCAGCATGGGGAGCAACTGAAG</u> <u>CGCGGGTTAAAAAATCGTCACATTCAAT</u> <u>TAATCGCGCTGGGCGGAGCAATTGGTAC</u> <u>GGGATTGTTCTGGGTTCAGCGAGCGTC</u> <u>ATCCAATCGGCAGGTCCAGGGATCATCT</u> <u>TGGGATATGCGATCGCAGGCTTTATCGC</u> <u>TTTTCTTATTATGCGCCAATTAGGTGAGA</u> <u>TGGTGGTCGAGGAGCCTGTAGCTGGCTC</u> <u>CTTCTCACATTTGCGGTACAAGTATTGGG</u> <u>GATCCTTTGCGGGATTTGCTTCTGGTTGG</u> <u>AACTATTGGGTTCTTTATGTCCTGGTGGC</u>	63

	<u>CATGGCGGAGCTGACCGCGGTTGGAAAA</u> <u>TATATCCAGTTCTGGTACCCCGAGATCC</u> <u>CGACGTGGGTCTCAGCCGCGGTATTCTT</u> <u>TGTTGTTATCAATGCAATCAATTTAACCA</u> <u>ACGTAAAAGTATTTGGTGAAATGGAGTT</u> <u>CTGGTTCGCGATTATCAAAGTAATTGCC</u> <u>GTAGTTGCTATGATTATTTTTGGGGCATG</u> <u>GTTGCTTTTCTCAGGAAATGGCGGACCA</u> <u>CAAGCGTCGGTTTCAAACCTGTGGGATC</u> <u>AAGGGGATTCTGCGGCACGGATTAC</u> <u>GGGCTTGGTGATGATGATGGCTATCATT</u> <u>ATGTTTTCTTTCGGTGGTCTTGAATTAGT</u> <u>GGGTATTACCGCAGCAGAGGCAGATAAT</u> <u>CCCGAACAAAGCATCCCAAAAGCTACTA</u> <u>ACCAAGTTATTTACCGTATCCTGATTTTT</u> <u>TATATTGGTTCTCTGGCAGTCCTGCTTTC</u> <u>CTTAATGCCCTGGACACGTGTAACGGCC</u> <u>GATACATCCCCTTTTGTACTTATCTTTCA</u> <u>CGAACTGGGAGACACGTTCGTCGCCAAT</u> <u>GCATTAAACATTGTTGTGCTGACAGCTG</u> <u>CCTTATCTGTGTATAATAGCTGCGTTTAT</u> <u>TGCAATTCACGTATGTTATTCGGGCTTGC</u> <u>TCAGCAGGGTAACGCGCCAAAGGCGTTG</u> <u>GCCTCAGTAGATAAGCGCGGAGTGCCTG</u> <u>TAAATACAATTTTGGTCAGCGCATTAGT</u> <u>CACGGCTCTTTGCGTTCTGATTAACATC</u> <u>TGGCTCCTGAAAGCGCATTTCGGATTACT</u> <u>TATGGCCCTGGTTGTTCCGCCCTGGTTA</u> <u>TCAATTGGGCAATGATTAGTTTGGCACA</u> <u>TATGAAGTTCCGCCGTGCTAAACAAGAA</u> <u>CAAGGTGTCGTAACCTCGTTTCCCTGCCTT</u> <u>ATTGTATCCGCTGGGGAATTGGGTATGC</u> <u>CTTCTTTTATGGCCGCAGTACTGGTAAT</u> <u>TATGTTGATGACGCCCCGCATGGCTATT</u> <u>AGTGTATACCTTATTCCGGTATGGTTAAT</u> <u>CGTCTTGGGTATCGGCTACTTATTTAAAG</u> <u>AAAAAACAGCAAAAGCCGTAAAGGCTC</u> <u>AT</u>	

Ejemplo 33. Cuantificación de ácido hipúrico, ácido transcinámico, fenilalanina y fenilpiruvato en plasma y orina por LC-MS/MS

5 Preparación de muestras

Las siguientes soluciones madre se prepararon (10 mg/ml), se dividieron en alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml (100 µl) y se almacenaron a -20 °C: fenilalanina (HCl 0,1 M), fenilpiruvato de sodio (HCl 0,1 M), ácido transcinámico (DMSO) y ácido hipúrico (DMSO). A continuación, se prepararon en agua 250, 100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 µg/ml de cada uno de los estándares.

La orina de los ratones se diluyó 40 veces añadiendo 195 µl de agua con respecto a 5 µl de orina. En hielo, la muestra y los estándares (10 µl) se añadieron por pipeteo en una placa de 96 pocillos de polipropileno con fondo en V. A continuación, se añadieron 90 µl de la solución de derivación que contenía 50 mM de 2-hidrazinoquinolina (2-HQ), disulfuro de

dipiridilo y trifenilfosfina en acetonitrilo con 1 ug/ml de fenilalanina-d5, ácido hipúrico-d5, ácido trans-cinámico-d7 y fenilpiruvato-d5 a la solución final. La placa se termoselló con una lámina ThermASeal y se mezcló bien, y las muestras se incubaron a 60 °C durante 1 h para la derivatización y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min. En una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se añadieron 20 µl de las muestras derivatizadas a 180 µl de ácido fórmico al 0,1 % en agua/ACN (140:40). La placa se volvió a termosellar con una lámina ClearASeal y se mezcló bien.

Procedimiento LC-MS/MS

Los metabolitos derivatizados se midieron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo TSQ Quantum Max. La Tabla 67, la Tabla 68 y la Tabla 69 proporcionan el resumen del procedimiento LC-MS/MS.

Tabla 67. Procedimiento LC/MS

Columna	Columna C18, 3 µm (100 x 2 mm)
Fase móvil A	H2O al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	ACN al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %
Volumen de inyección	0 µl

Tabla 68. Procedimiento HPLC:

Tiempo (min)	Caudal (µl/min)	% de A	% de B
0	500	90	10
0,5	500	90	10
2,0	500	72,5	97
4,0	500	60	97
4,01	500	10	10
4,25	500	10	10

Tabla 69. Espectrometría de masas en tándem:

Fuente de iones	HESI-II
Polaridad	Positiva
Transiciones de SRM:	
Fenilalanina	307,2/186,0
Fenild5-alanina	312,2/186
Ácido trans-cinámico	290,2/131,0
Ácido trans-cinámico-d7	297,05/138,1
Ácido hipúrico	321,1/160
Ácido hipúrico-d5	326,1/160
Fenilpiruvato	306,1/260,0
Fenilpiruvato-d5	311,1/265,1

Ejemplo 34. Efecto del número de copias de PAL, pheP y LAAD en la actividad de la cepa

Para ilustrar el efecto de pheP, se compararon conjuntamente diversos números de copias de PAL y la adición adicional de LAAD en la velocidad de degradación de fenilalanina *in vitro*, cepas que contenían diferentes números de copias de PAL, ya sea en presencia o ausencia de pheP y LAAD en un ensayo de consumo de fenilalanina *in vitro*.

Las bacterias manipuladas genéticamente se cultivaron durante una noche, se diluyeron y

se dejaron crecer durante otras 2,5 horas en ausencia o presencia de arabinosa al 0,1 % (si la construcción comprende LAAD). A continuación, los cultivos se colocaron en una cámara anaerobia Coy que suministraba N₂ al 90 %, CO₂ al 5 % y H₂ al 5 % durante 4 horas en medio que contenía fenilalanina (fenilalanina 4 mM). Se prepararon extractos de células enteras y se cuantificó la fenilalanina mediante espectrometría de masas y se calcularon las velocidades.

Los resultados que se muestran en la **figura 37** demuestran que aumentar el número de copias de PAL aumenta la velocidad de degradación de fenilalanina. La adición del transportador de alta afinidad pheP anula la limitación del transporte, lo que permite una mayor actividad de PAL. El número de copia del transportador no aumenta la velocidad (PAL, y transporte nulo (pheP), es limitante). En presencia de oxígeno, LAAD puede degradar Phe a una velocidad extremadamente alta.

Ejemplo 35. Detección de metabolitos específicos de PAL en SYN-PKU706 en sangre y orina

Para evaluar los niveles de TCA y ácido hipúrico en la orina, y para evaluar la utilidad de las mediciones de TCA y ácido hipúrico como indicador de la actividad de la cepa, se midieron los niveles de TCA y ácido hipúrico en suero y orina en un modelo de ratón *in vivo* (ratones BTBR-Pahenu2) después de la exposición a fenilalanina subcutánea. SYN-PKU706 (que comprende tres copias de fnrS-PAL (integradas en MalP/T, HA3/4 y MalE/K), 2 copias de fnr-PheP (integradas en HA1/2 y LacZ), y una copia de Para-LAAD (LAAD insertada en el operón de arabinosa (Para::LAAD)), se comparó con Nissle de tipo natural con resistencia a la estreptomycin (SYN-PKU901) en este estudio.

Para preparar las células, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 l), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia en presencia de arabinosa al 0,1 % y a continuación se trasladaron a la cámara anaerobia durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron y se congelaron (glicerol al 15 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M. Cada ratón recibió por sonda 750 ul en total, o 1x10¹¹ ufc/ratón en total en 3 tomas por sonda.

Comenzando 4 días antes del estudio (es decir, los Días -4-1), los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad) se mantuvieron con agua y comida sin fenilalanina que se complementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El Día 1, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento y se recogieron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina de referencia. Los ratones también se pesaron para determinar el peso promedio de cada grupo. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea de 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. 1, 2 y 3 horas después de la exposición a Phe, las bacterias se administraron a los ratones por sonda oral (3x250 ul; 1x10¹¹ ufc/ratón en total en 3 tomas por sonda) de la siguiente manera: SYN-PKU901 (Nissle resistente a estreptomycin, n = 12), SYN-PKU-706 (n = 12). Se añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Solo se administró H₂O como control (n = 12). Se extrajo sangre de los animales y se recogió la orina de todos los animales 4 horas después de la exposición a Phe. La sangre se almacenó en hielo para el análisis por LC/MS.

Se midieron el TCA y el ácido hipúrico como se describe en el Ejemplo 33. Como se ve en la **figura 44A**, la **figura 44B**, la **figura 44C** y la **figura 44D**, los niveles de TCA y ácido hipúrico tanto en suero como en orina aumentaron en SYN-PKU-706 sobre SYN-PKU-901 en comparación con los controles de H₂O. Se midieron niveles similares de metabolitos en

orina cuando se administraron otras cepas de PKU eficaces. Estaban presentes bajos niveles de TCA tanto en orina como en suero. Se detectaron niveles más bajos de ácido hipúrico en suero. Se detectaron los niveles más altos de ácido hipúrico en la orina, lo que indica que la mayoría del TCA generado por la bacteria se convierte en ácido hipúrico en el hígado y se excreta en la orina. Estos y otros resultados descritos en esta invención indican que los niveles de ácido hipúrico en la orina pueden usarse como indicador o biomarcador de la actividad de PAL.

Ejemplo 36. Medición de ácido hipúrico como procedimiento para medir la actividad celular *in vivo*

Para determinar si la detección de ácido hipúrico en la orina es adecuada como medida de la actividad celular *in vivo* y un biomarcador potencial, se evaluó el grado de conversión de TCA en ácido hipúrico mediante la administración por sonda oral de diversas concentraciones de TCA en ratones PKU y la posterior medición de TCA y ácido hipúrico por LC/MS.

El Día 1 del estudio, los ratones Pah ENU2/2 (~8-10 semanas) se asignaron al azar a grupos de tratamiento de exposición a TCA de la siguiente manera: Grupo 1: 0,1 mg/g de TCA (n = 6); Grupo 2: 0,05 mg/g de TCA (n = 6); Grupo 3: 0,025 mg/g de TCA (n = 6); Grupo 4: 0,0125 mg/g de TCA (n = 6); Grupo 5: Control de H₂O (n = 6). Se administraron diversas concentraciones de TCA por sonda oral.

Los animales se transfirieron a jaulas metabólicas (3 ratones por jaula, 2 jaulas por grupo) y se recogieron la orina y las heces durante 4 horas después de la dosis de TCA. La orina y las heces se transfirieron a tubos apropiados y las muestras se almacenaron en hielo hasta que se procesaron para el análisis por MS. La **figura 45A** y la **figura 45B** representan la cantidad de TCA (**figura 45A**) y ácido hipúrico (**figura 45B**) recuperados tras la administración por sonda oral de 0,0125, 0,025, 0,05 o 0,1 mg/g de TCA 4 horas después de la administración por sonda. Se detectaron cantidades insignificantes de TCA e hipurato en sangre y heces (datos no mostrados). Se observó una recuperación casi total de TCA en forma de hipurato en la orina. Como resultado, 1 mol de hipurato encontrado en la orina equivaldría a 1 mol de Phe convertido en TCA en el intestino delgado en un ratón PKU tras la administración de una cepa de PKU.

A continuación, se evaluó la cinética de conversión de TCA en ácido hipúrico en un curso de tiempo posterior a la administración por sonda oral de TCA puro. El Día 1 del estudio, los ratones Pah ENU2/2 (~8-10 semanas) se asignaron al azar a grupos de tratamiento de exposición a TCA de la siguiente manera: Grupo 1: 0,033 mg/g de TCA (n = 6); Grupo 2: 0,1 mg/g de TCA (n = 6); Grupo 3: Control de H₂O (n = 6). Se administraron concentraciones de TCA por sonda oral. Los animales se transfirieron a jaulas metabólicas (3 ratones por jaula, 2 jaulas por grupo) y se recogieron muestras de orina 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas después de la dosis de TCA. La orina se transfirió a tubos apropiados y las muestras se almacenaron en hielo hasta que se procesaron para el análisis por MS. Como se observa en la **figura 46**, en la administración por sonda de dosis alta de TCA, el TCA se convierte en hipurato y se excreta en la orina a las 4 horas.

Ejemplo 37. Generación de cepas adicionales de PKU

Se generaron las siguientes cepas de PKU para su uso en ejemplos posteriores. Los esquemas se representan en la **figura 47A**, la **figura 47B**, la **figura 47C**, la **figura 47D**, la **figura 47E** y la **figura 47F**.

SYN-PKU707 comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*)) y dos copias de *pheP* (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*)). SYN-PKU707 comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y (Para::FNRS24Y). SYN-PKU712 corresponde esencialmente a SYN-PKU707 con una auxotrofia *dapA*.

SYN-PKU708 comprende un cromosoma bacteriano con tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*)) y dos copias de *pheP* (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*)). SYN-PKU708 comprende además una copia del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y (Para::FNRS24Y) y una copia de la LAAD insertada en el mismo sitio de inserción (el operón de arabinosa), que se transcribe como un mensaje bicistrónico del promotor endógeno de arabinosa. El genoma se manipula adicionalmente para incluir una auxotrofia *dapA*, en la que se elimina el gen *dapA*. SYN-PKU711 corresponde esencialmente a SYN-PKU708 sin una auxotrofia *dapA*.

SYN-PKU709 comprende un cromosoma bacteriano que comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*)) y dos copias de *pheP* (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*)). SYN-PKU709 comprende además una copia de la LAAD insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para: :LAAD). El genoma se manipula adicionalmente para incluir una auxotrofia *dapA*, en la que se elimina el gen *dapA*.

SYN-PKU710 comprende un cromosoma bacteriano que comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*)) y dos copias de *pheP* (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*)). SYN-PKU710 comprende además una copia de la LAAD insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para: :LAAD). SYN-PKU710 comprende además dos copias de PAL3 inducible por IPTG (2XLacIPAL, *exo/cea* y *rhtC/rhtB*), una auxotrofia *dapA* y se cura de todas las resistencias a los antibióticos. En esta invención se describen construcciones y procedimientos para la generación de estas cepas. Las construcciones adicionales necesarias para la construcción de cepas se generan según los procedimientos descritos en esta invención, por ejemplo, los Ejemplos 1, 2, 22 y 23 y se muestran en la Tabla 70, Tabla 71 y Tabla 72.

Tabla 70. Secuencias Para-FNRS24Y

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
FNRS24Y (en negrita) impulsado por el promotor inducible por arabinosa (subrayado) y <i>araC</i> en dirección inversa (en cursiva). RBS está subrayado y en negrita		64

(véase la figura 48A)	TTATTCACAACCTGCCCTAAACTCGCTCGGACTCGCCCCGGTG CAITTTTTTAAATACTCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACC GACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGC TCAAAAGCAGCTTCGCCTGACTGATGCGCTGGTCCTCGCGCC AGCTTAATACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAACAAATGCGA CAGACGCGACGGCGACAGGCAGACATGCTGTGCGACGCTGG CGATATCAAAATTACTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTG ACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGA CTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCAGTAACAATTGCTCAAGC AGATTTATCGCCAGCAATTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGTG CGGCATTAAATGATTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCT GGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAAACCGGTATTGGCAAATA TCGACGGCCAGTTAAGCCATTATGCCAGTAGGCGCGCGGAC GAAAGTAAACCCACTGGTGATAACCATTCTGTGAGCCTCCGGAT GACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCAGGCGGGAACAGCAAAA TATCACCCGGTCGGCAGACAAATTCTCGTCCCTGATTTTTCAC CACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTC ATTCCCAGCGGTCCGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGG CCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCGTTAAACG AGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTTCGCTTCAGCCATACT TTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATT GCATCAGACATTGCCGTCCTGCGTCTTTTACTGGCTCTTC TCGCTAACCCAACCGGTAACCCCGCTTATTTAAAGCATTC TGTAACAAAGCGGGACCAAGCCATGACAAAAACGCGTA ACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGA TTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTT TATCCATAAGATTAGCGGATCCAGCCTGACGCTTTTTTTTCG CAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCTCTAGAAAATAATTTT GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCCCGGA AAAGCGAATTATACGGCGCATTCACTCTGGCGGTTGTG CTATCCATTGCCAGGATTGCTATATCAGCCAGCTTTGC ATCCCGTTCACACTCAACGAACATGAGCTTGATCAGCT TGATAATATCATTGAGCGGAAGAAGCCTATTCAGAAAG GCCAGACGCTGTTTAAAGGCTGGAGATGAACTTAAATCG CTTTATGCCATCCGCTCCGGTACGATTAAAGTTATAC CATCACTGAGCAAGGCGACGAGCAAATCACTGGTTTCC ATTTAGCAGGCGATCTGGTGGGATTTGATGCCATCGGC AGCGGTCAACACCCGAGTTTTCGCGCAGGCGCTGGAAA CCTCGATGGTATGTGAAATCCCGTTCGAAACGCTGGAC GATTTGTCTGGTAAAATGCCGAATCTGCGTCAGCAGAT GATGCGTCTGATGAGCGGTGAAATCAAAGGCGATCAG GACATGATCCTGCTGTTGTGCGAAGAAAAATGCCGAGG AACGTCTGGCTGCATTATCTACAACCTGTCCCGTCGT TTTGCCCAACGCGGCTTCTCCCCTCGTGAATTCGCCT	
	GACGATGACTCGTGGTGATATCGGTAACTATCTGGGCC TGACGGTTGAAACCATCAGCCGTCTGCTGGGTGCTTC CAGAAAAGCGGTATGCTGGCAGTCAAAGGTAAATACA TCACTATCGAAAATAACGATGCGCTGGCCAGCTTGCT GGTCATACGCGTAACGTTGCCTGA	
FNRS24Y		65

	ATGATCCCGGAAAAGCGAATTATACGGCGCATTTCAGTCTG GCGGTTGTGCTATCCATTGCCAGGATTGCTATATCAGCCA GCTTTGCATCCCGTTCACACTCAACGAACATGAGCTTGAT CAGCTTGATAATATCATTGAGCGGAAGAAGCCTATTCAGA AAGGCCAGACGCTGTTTAAGGCTGGAGATGAACTTAAATC GCTTTATGCCATCCGCTCCGGTACGATTAAAAGTTATACC ATCACTGAGCAAGGCGACGAGCAAATCACTGGTTTCCATT TAGCAGGCGATCTGGTGGGATTTGATGCCATCGGCAGCGG TCATCACCCGAGTTTCGCGCAGGCGCTGGAAACCTCGATG GTATGTGAAATCCCGTTCGAAACGCTGGACGATTTGTCTG GTAAAATGCCGAATCTGCGTCAGCAGATGATGCGTCTGAT GAGCGGTGAAATCAAAGGCGATCAGGACATGATCCTGCT GTTGTGCAAGAAAAATGCCGAGGAACGTCTGGCTGCATTC ATCTACAACCTGTCCCGTCGTTTTGCCCAACGCGGCTTCTC CCCTCGTGAATTCCGCCTGACGATGACTCGTGGTGATATC GGTAACTATCTGGGCCTGACGGTTGAAACCATCAGCCGTC TGCTGGGTCGCTTCCAGAAAAGCGGTATGCTGGCAGTCAA AGGTAAATACATCACTATCGAAAATAACGATGCGCTGGCC CAGCTTGCTGGTCATACGCGTAACGTTGCCTGA	
AraC (orientación inversa)	TTATTCACAACCTGCCCTAAACTCGCTCGGACTCGCCCCG GTGCATTTTTTAAATACTCGCGAGAAATAGAGTTGATCGT CAAAACCGACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCC GGGTGGTGCTCAAAGCAGCTTCGCCTGACTGATGCGCTG GTCCTCGCGCCAGCTTAATACGCTAATCCCTAACTGCTGG CGGAACAAATGCGACAGACGCGACGGCGACAGGCAGACA TGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAATTACTGTCTGCCA GGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATT ATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATG CGCCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCA ATCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGTCGGCATTAAATGATT TGCCCAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTTCAT CCGGGCGAAAAGAAACCGGTATTGGCAAATATCGACGGCC AGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGT AAACCCACTGGTGATACCATTCGTGAGCCTCCGGATGACG ACCGTAGTGATGAATCTCTCCAGGCGGGAACAGCAAAAT ATCACCCGGTCGGCAGACAAATTCTCGTCCCTGATTTTTCA CCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACC TTTCATTCCCAGCGGTTCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAA CCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGG CGTTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTTCGC TTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTCAGAGAAGAA ACCAATTGTCCATATTGCAT	66
Región promotora	CAGACATTGCCGTCAGTGCCTTTTTACTGGCTCTTCTCGC TAACCCAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTA	67
	ACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAA AAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT TTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATC CATAAGATTAGCGGATCCAGCCTGACGCTTTTTTTTCGAA CTCTCTACTGTTTCTCCATACCTCTAGAAATAATTTTGTTT AACTTTAAGAAGGAGATATACAT	

RBS y región líder	CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT	68
Polipéptido FNRS24Y	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCYISQLCIPFTLNEHELDQLDNI IERKKPIQKGQTLFKAGDELKSLYAIRSGTIKSYTITEQGDEQI TGFHLAGDLVGFDAIGSGHHPSPAQALETSMVCEIPFETLDD LSGKMPNLRQQMMRLMSGEIKGDQDMILLSSKKNAEERLA AFIYNLSRRFAQRGFSPREFRLTMTRGDIGNYLGLTVETISRL LGRFQKSGMLAVKKGKYITIENNDALAQLAGHTRNVA	69
Polipéptido AraC	MQYGQLVSSLNGGSMKSMAEAQNDP LLPGYSFNAHLVAGL TPIEANGYLDFIDRPLGMKGYILNL TIRGQGVVKNQGREFV CRPGDILLFPPGEIHHYGRHPEAHEWYHQWVYFRPRAYWHE WLNWPSIFANTGFFRPDEAHQPHFSDLFGQIINAGQGEGRYS ELLAINLLEQLLLRRMEAINESLHPPMDNRVREACQYISDHL ADSNFDIASVAQHVCLSPSRLSHLFRQQLGISVLSWREDQRIS QAKLLSTTRMPIATVGRNVGFDDQLYFSRVFKKCTGASPSE FRAGCE*	70
FNR de tipo natural	ATGATCCCGGAAAAGCGAATTATACGGCGCATTTCAGTCTG GCGGTTGTGCTATCCATTGCCAGGATTGCACGATCAGCCA GCTTTGCATCCCGTTCACACTCAACGAACATGAGCTTGAT CAGCTTGATAATATCATTGAGCGGAAGAAGCCTATTCAGA AAGGCCAGACGCTGTTTAAGGCTGGAGATGAACTTAAATC GCTTTATGCCATCCGCTCCGGTACGATTAAAAGTTATACC ATCACTGAGCAAGGCGACGAGCAAATCACTGGTTTCCATT TAGCAGGCGATCTGGTGGGATTTGATGCCATCGGCAGCGG TCATCACCCGAGTTTCGCGCAGGCGCTGGAAACCTCGATG GTATGTGAAATCCCGTTCGAAACGCTGGACGATTTGTCTG GTAAAATGCCGAATCTGCGTCAGCAGATGATGCGTCTGAT GAGCGGTGAAATCAAAGGCGATCAGGACATGATCCTGCT GTTGTGCAAGAAAAATGCCGAGGAACGTCTGGCTGCATTC ATCTACAACCTGTCCCGTCGTTTTGCCCAACGCGGCTTCTC CCCTCGTGAATTCCGCCTGACGATGACTCGTGGTGATATC GGTAACTATCTGGGCCTGACGGTTGAAACCATCAGCCGTC TGCTGGGTCGCTTCCAGAAAAGCGGTATGCTGGCAGTCAA AGGTAAATACATCACTATCGAAAATAACGATGCGCTGGCC CAGCTTGCTGGTCATACGCGTAACGTTGCCTGA	71
Polipéptido FNR de tipo natural	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNI IERKKPIQKGQTLFKAGDELKSLYAIRSGTIKSYTITEQGDEQI TGFHLAGDLVGFDAIGSGHHPSPAQALETSMVCEIPFETLDD LSGKMPNLRQQMMRLMSGEIKGDQDMILLSSKKNAEERLA AFIYNLSRRFAQRGFSPREFRLTMTRGDIGNYLGLTVETISRL LGRFQKSGMLAVKKGKYITIENNDALAQLAGHTRNVA	72

Tabla 71. Secuencia FNRS24Y-LAAD inducible por arabinosa

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Construcción en la que		73

FNRS24Y (en negrita) y LAAD (subrayada en negrita) se expresan como un mensaje bicistrónico a partir de un promotor inducible por arabinosa. AraC (en cursiva) se transcribe en la orientación inversa. El promotor está subrayado. Los RBS están en negrita, cursiva y subrayados (figura 48B)	<i>TTATTCACAACCTGCCCTAAACTCGCTCGGACTCGCC CCGGTGCATTTTTTAAATACTCGCGAGAAATAGAGTT GATCGTCAAAACCGACATTGCGACCGACGGTGGCGA TAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCCT GACTGATGCGCTGGTCTCGCGCCAGCTTAATACGC TAATCCCTAACTGCTGGCGGAACAAATGCGACAGACG CGACGGCGACAGGCAGACATGCTGTGCGACGCTGG CGATATCAAAATTACTGTCTGCCAGGTGATCGCTGAT GTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGT GGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGC AGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAATTC CGAATAGCGCCCTTCCCCTTGTCGGGCATTAATGATT TGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCT TCATCCGGGCGAAAGAAACCGGTATTGGCAAATATCG ACGGCCAGTTAAGCCATTATGCCAGTAGGCGCGCG GACGAAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTCTGTGAGC CTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCAGG CGGGAAACAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAGACAAA TTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCTGACCCGCG AATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCATTCCCA GCGGTTCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTT GGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGG GCGTTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCAT TTTGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCAT TCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAG ACATTGCCGTCCTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTC GCTAACCCAACCGGTAACCCCGCTTATTTAAAGC <u>ATTCTGTAAACAAGCGGGACCAAGCCATGACAAA</u> <u>AACGCGTAACAAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAA</u> <u>AAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTT</u> <u>TGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGC</u> <u>GGATCCAGCCTGACGCTTTTTTCGCAACTCTCTA</u> <u>CTGTTTTCTCCATACCTCTAGAAATAATTTGTTTAA</u> <u>CTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCCCGGAAA</u> <u>AGCGAATTATACGGCGCATTTCAGTCTGGCGGT</u> <u>TGTGCTATCCATTGCCAGGATTGCTATATCAGC</u> <u>CAGCTTTGCATCCCGTTTCACTCAACGAACAT</u> <u>GAGCTTGATCAGCTTGATAATATCATTGAGCGG</u> <u>AAGAAGCCTATTCAGAAAGGCCAGACGCTGTT</u> <u>TAAGGCTGGAGATGAACTTAAATCGCTTTATGC</u> <u>CATCCGCTCCGGTACGATTAAAAGTTATACCAT</u> <u>CACTGAGCAAGGCGACGAGCAAATCACTGGTT</u> <u>TCCATTTAGCAGGCGATCTGGTGGGATTTGATG</u> <u>CCATCGGCAGCGGTATCACCCGAGTTTCGCG</u></i>	

	CAGGCGCTGGAAACCTCGATGGTATGTGAAAT CCCGTTCGAAACGCTGGACGATTTGTCTGGTAA AATGCCGAATCTGCGTCAGCAGATGATGCGTC TGATGAGCGGTGAAATCAAAGGCGATCAGGAC ATGATCCTGCTGTTGTGCGAAGAAAAATGCCGA GGAACGTCTGGCTGCATTTCATCTACAACCTGTC CCGTGCTTTTGGCCAACGCGGCTTCTCCCCTCG TGAATTCGCGCTGACGATGACTCGTGGTGATAT CGGTAACTATCTGGGCCTGACGGTTGAAACCA TCAGCCGTCTGCTGGGTGCGTTCCAGAAAAAGC GGTATGCTGGCAGTCAAAGGTAAATACATCACT ATCGAAAAATAACGATGCGCTGGCCCAGCTTGC TGGTCATACGCGTAACGTTGCCTGA <u>AAGAAGGAGATATACATATGAACATTTCAAGGAG</u> <u>AAAGCTACTTTTAGGTGTTGGTGCTGCGGGCG</u> <u>TTTTAGCAGGTGGTGCGGCTTTAGTTCCAATGG</u> <u>TTCCGCGTGACGGCAAATTTGTGGAAGCTAAAT</u> <u>CAAGAGCATCATTTGTTGAAGGTACGCAAGGG</u> <u>GCTCTTCTAAAGAAGCAGATGTAGTGATTATT</u> <u>GGTGCCGGTATTCAAGGGATCATGACCGCTAT</u> <u>TAACCTTGCTGAACGTGGTATGAGTGTCACTAT</u> <u>CTTAGAAAAGGGTCAGATTGCCGGTGAGCAAT</u> <u>CAGGCCGTGCATACAGCCAAATTATTAGTTACC</u> <u>AAACATCGCCAGAAATCTTCCCATTACACCATT</u> <u>ATGGGAAAAATATTATGGCGTGGCATGAATGAG</u> <u>AAAATTGGTGCGGATACCAGTTATCGTACTCAA</u> <u>GGTCGTGTAGAAGCGCTGGCAGATGAAAAAGC</u> <u>ATTAGATAAAGCTCAAGCGTGGATCAAAACAG</u> <u>CTAAAGAAGCGGCAGGTTTTGATACACCATTA</u> <u>ATACTCGCATCATTAAGGTGAAGAGCTATCAA</u> <u>ATCGCTTAGTCGGTGCTCAAACGCCATGGACT</u> <u>GTTGCTGCATTTGAAGAAGATTCAGGCTCTGTT</u> <u>GATCCTGAAACAGGCACACCTGCACTCGCTCG</u> <u>TTATGCCAAACAAATCGGTGTGAAAATTTATAC</u> <u>CAACTGTGCAGTAAGAGGTATTGAAACTGCGG</u> <u>GTGGTAAAAATCTCTGATGTGGTGAGTGAGAAA</u> <u>GGGGCGATTAAACGTCTCAAGTTGTACTCGCT</u> <u>GGGGGTATCTGGTCGCGTTTATTTATGGGCAAT</u> <u>ATGGGTATTGATATCCCAACGCTCAATGTATAT</u> <u>CTATCACAACAACGTGTCTCAGGGGTTCTGGT</u> <u>GCACCACGTGGTAATGTGCATTACCTAATGGT</u> <u>ATTCATTTCCGCGAACAAGCGGATGGTACTTAT</u> <u>GCCGTTGCACCACGTATCTTTACGAGTTCAATA</u> <u>GTCAAAGATAGCTTCCTGCTAGGGCCTAAATTT</u> <u>ATGCACTTATTAGGTGGCGGAGAGTTACCGTT</u> <u>GGAATTCTCTATTGGTGAAGATCTATTTAATTC</u> <u>ATTTAAAATGCCGACCTCTTGGAATTTAGATGA</u> <u>AAAAACACCATTGCAACAATCCGAGTTGCCAC</u> <u>GGCAACACAAAATACGCAACACTTAGATGCTGT</u>	
	<u>TTTCCAAAGAATGAAAACAGAATTCCCAGTATT</u> <u>TGAAAAATCAGAAAGTTGTTGAACGTTGGGGTG</u> <u>CCGTTGTGAGTCCAACATTTGATGAATTACCTA</u> <u>TCATTTCTGAGGTCAAAGAATACCCAGGCTTAG</u> <u>TGATTAACACGGCAACAGTGTGGGGTATGACA</u> <u>GAAGGCCCGGCAGCGGGTGAAGTGACCGCTGA</u> <u>TATTGTCATGGGCAAGAAACCTGTTATTGATCC</u> <u>AACGCCGTTTAGTTTGGATCGTTTTAAGAAGTA</u> A	

Tabla 72. Secuencias de construcción Lac-PAL3 inducibles

Secuencia	Descripción	SEQ ID NO
Secuencia de construcción que comprende <i>LacI</i> en orientación inversa (subrayado), secuencia del promotor <i>tac</i> (en cursiva y subrayado), <i>lacO</i> (en negrita y subrayado), RBS y región líder (en negrita), PAL3 (en cursiva) (véase la figura 49)	<u>TC</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u>	74

	<u>TAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATA</u> <u>ACGTTACTGGTTTCATATTCACCACCCTGAATTGA</u> CTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAA GGTTTTGCGCCATTTCGATGGCGCGCCGCTTCGTCA GGCCACATAGCTTTCTTGTCTGATCGGAACGATC GTTGGCTGTGT<u>TGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA</u> <u>TGTGTGGAATTGTGAGCGCTCACAAATT</u>AGCTGTC ACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAG GACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTAAAAA CAACACCCACTAAGATAACTCTAGAAATAATTTTG TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGC TAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTAATAAAA ATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATT GCGATAAAACAAAAAAAAGTAGAAATATCAACG GAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAAA AATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTAT ATATGGAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCC AATTTAGTTGTGCCATTTGAGAAAAATCGCAGAGC ATCAGCAAAATCTGTAACTTTCTTTCTGCTGGT ACTGGGGACTATATGTCCAAACCTTGTAATAAAGC GTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAG GTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCA ATTGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTCTCT GGTTCCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTG ATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGAGCATTAT GTGGTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGCGCAGA AATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAACGTGCAGGG TTGACACCATATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTC TTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGA ATCAGTGCAATCACCGTCATTAACTGGAAAAAC TATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCT GTTGAAGCATTACTTGCACTCTCATGAACATTATGA TGCCCCGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTGGT CAAAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATT GGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATCTGGGG TTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGTCGTCATCA AGAAATTACCCAATAAATGATACCTTACAGGAA GTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGG TATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAA TATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAAT CCATTGATAGATCCAGAAAAATGGCGATGTTCTAC ACGGTGGAATTTTATGGGGCAATATGTCGCCCG AACAATGGATGCATTAAAACTGGATATTGCTTTAA TTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCTTATG ATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTAATTC ACTGAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTA AAGGCGTCCAACCTTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCT GCAATTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCA TACCCTCGCCACAGAACAATACAATCAAGATATT	
	GTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTTTT AGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTGTTTCA ATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCATTTCATCT TCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAACT GCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTC TCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGGATGAAGATA TAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATCAA CTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGAATAA	

LacI orientación inversa)	(en	TCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTG CCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG AGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCCAGGGTGGTT TTTCTTTTCACCACTGAGACTGGCAACAGCTGATT GCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGC AAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAA AATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAA CATGAGCTATCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTAC CGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCG GTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATC GTTGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCC TCATTGAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGA CATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCG GCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAG CCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTA ATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACC CAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTA CCGTCCTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGG GTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGG AACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCA TCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCC ACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCC GCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCAT CGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCG CGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCG CGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAAT CAGCAACGACTGTTTGCCCCGCCAGTTGTTGTGCCA CGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCC GCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTG GCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGA TAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATA ACGTTACTGGTTTCAT	75
Región promotora		ATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCT ATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTGCG ATGGCGCGCCGCTTCGTCAGGCCACATAGCTTTCT TGTTCTGATCGGAACGATCGTTGGCTGTGTTGACA ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTG AGCGCTCACAATTAGCTGTCACCGGATGTGCTTTC CGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTC TACAAATAATTTGTTTAAACAAACCCACTAAG ATAACCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAA	76
		GGAGATATACAT	
Promotor Tac		TGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGT	77
LacO		GGAATTGTGAGCGCTCACAATT	78
RBS y región líder		TGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC AGCCTCTA	79
Secuencia polipeptídica			80

LacI	MKPVTLYDVAEYAGVSYQTVSRVVNQASHVSAKT REKVEAAMAELNYIPNRVAQQLAGKQSLIGVATSS LALHAPSQIVAAIKSRADQLGASVVVSMVERSGVEA CKAAVHNLLAQRVSGLIINYPLDDQDAIAVEAACTN VPALFLDVSDQTPINSIIFSHEDGTRLGVEHLVALGH QQIALLAGPLSSVSARLRLAGWHKYLTRNQIQPIAER EGDWSAMSGFQQTMQMLNEGIVPTAMLVANDQM ALGAMRAITESGLRVGADISVVGYDDTEDSSCYIPPL TTIKQDFRLLGQTSVDRLLQLSQGQAVKGNQLLPVS LVKRKTTLAPNTQTASPRALADSLMQLARQVSRLES GQ	

Ejemplo 38. Análisis de los niveles de Phe en sangre y conversión metabólica en hipurato después de la administración de la cepa de PKU SYN-PKU-707

- 5 Se evaluó la capacidad de la cepa probiótica manipulada SYN-PKU-707 para convertir fenilalanina en hipurato. La cepa SYN-PKU-707 comprende tres copias de PAL impulsadas por el promotor FNR (insertadas en el cromosoma en los locus *malE/K*, *yicS/nepl* y *dmalP/T*), y dos copias de *pheP* impulsadas por el promotor FNR (insertadas en el cromosoma en los locus *LacZ* y *agal/rsml*), y el FNRS24Y mutante (véase, por ejemplo, la
- 10 **figura 47A**).

Los cultivos (1:100 retrodiluciones de cultivos nocturnos) se cultivaron hasta una fase logarítmica temprana durante 1,5 h antes de la adición de L-arabinosa a una concentración final del 0,15 % para la inducción. Los cultivos se indujeron durante 4 horas (de forma

15 aerobia). Antes de la administración, las células se concentraron 200 veces y se congelaron (glicerol al 10 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M. A cada ratón se le administraron por sonda 750 μ l en total, o 1×10^8 ufc/ratón.

- 20 Comenzando 4 días antes del estudio (es decir, los Días -4-1), los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad) se mantuvieron con agua y comida sin fenilalanina que se complementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El Día 1, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento según el peso de la siguiente manera: Grupo 1: SYN-PKU901 (n = 9); Grupo 2: SYN-PKU-707 (n = 9); Grupo 3: Control de H₂O (n = 9). Se recogieron muestras
- 25 de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina de referencia. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea de 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. 1, 2 y 3 h después de la exposición a Phe, se administraron las bacterias (o agua) a los ratones por sonda oral (3×250 μ l; 1×10^8 l de bacterias totales). Se
- 30 añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Se extrajo sangre de los animales y se recogió la orina de todos los animales hasta 4 horas después de la exposición a Phe. Se extrajo sangre a todos los grupos de tratamiento 4 h después de la exposición a fenilalanina. La sangre se almacenó en hielo para el análisis por LC/MS. Los resultados de la **figura 52** y la **figura 53** muestran que SYN-PKU707 fue eficaz
- 35 para reducir la fenilalanina en sangre y que se puede encontrar hipurato excretado específicamente en las jaulas de ratones tratados con SYN-PKU707, lo que indica que las células son activas *in vivo*.

- La **figura 52** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia; la actividad metabólica total para SYN-PKU707 se calculó como 269 μ mol/h y la reducción total en Δ phe fue = 49 % (P<0,05) con respecto a SYN-PKU901 (P<0,05). La
- 40

figura 53 representa la concentración de hipurato en orina 4 horas después de la inyección de fenilalanina. En la **figura 53**, los niveles de cada jaula (tres ratones por jaula) se muestran por separado y se numeran del 1 al 3 para cada cepa. Estos resultados indican que aproximadamente el 15-20 % de la fenilalanina inyectada se convierte en hipurato. La fenilalanina se convierte en TCA en el intestino delgado, que a continuación se convierte en hipurato en el hígado.

Ejemplo 39. Ácido hipúrico recuperado en la orina después de una dosis única de la cepa de PKU SYN-PKU707

Para determinar cómo el número de células administradas por sonda en una única toma por sonda afecta a la recuperación de ácido hipúrico en la orina, los ratones PKU recibieron por sonda una dosis única de SYN-PKU707 en varias dosis y se controlaron los niveles de ácido hipúrico durante un período de 6 horas después la toma por sonda. La cepa SYN-PKU-707 comprende tres copias de PAL impulsadas por el promotor FNR (insertadas en el cromosoma en los locus *malE/K*, *yicS/nepl* y *dmalP/T*), y dos copias de *pheP* impulsadas por el promotor FNR (insertadas en el cromosoma en los locus *LacZ* y *agal/rsml*), y el FNRS24Y mutante (véase, por ejemplo, la **figura 47A**).

Para preparar las células, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 l), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia y a continuación se indujeron de forma aerobia en presencia de arabinosa al 0,15 % durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron 200 veces y se congelaron (glicerol al 10 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo. A cada ratón se le administraron por sonda 750 μ l en total, a razón de 3×10^{10} , 6×10^6 , $1,2 \times 10^9$ y $2,4 \times 10^8$ ufc/ratón.

Brevemente, comenzando 4 días antes del estudio, los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad) se mantuvieron con agua y comida sin fenilalanina que se complementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El Día 1, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento según el peso en grupos de la siguiente manera: Grupo 1: SYN-PKU-707 ($n = 6$); Grupo 2: Control de H₂O ($n = 6$). Se recogieron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina de referencia. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea de 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. 1, 2 y 3 h después de la exposición a Phe, las bacterias se administraron a los ratones por sonda oral (3×250 μ l) en varias dosis (3×10^{10} , 6×10^9 , $1,2 \times 10^9$ y $2,4 \times 10^8$). Se añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Se recogió orina de todos los animales hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de la exposición a fenilalanina, y las cantidades totales de ácido hipúrico recuperadas en cada punto temporal se determinaron mediante LC/MS. La **figura 55** muestra la cantidad absoluta de ácido hipúrico recuperado en la orina durante el marco de tiempo de 6 horas, según se determina mediante espectroscopia de masas. Se observó un aumento dependiente de la dosis en el hipurato recuperado en la orina de los ratones.

Ejemplo 40. Recuperación de hipurato en la orina: Células vivas frente a la administración por sonda de TCA puro

Para evaluar la duración de la actividad de la cepa y el tiempo de tránsito, se comparó la cinética de recuperación de ácido hipúrico en la orina entre células vivas y TCA puro. El TCA puro administrado por sonda oral se absorbe rápidamente a través del intestino delgado hacia la sangre, se convierte en hipurato en el hígado y se excreta en la orina. Por el contrario, PAL primero debe convertir la fenilalanina en TCA, antes de que pueda absorberse y convertirse en hipurato. Por lo tanto, se espera una acumulación más tardía de

ácido hipúrico y, por lo tanto, esta comparación conjunta puede ser útil para sondear el tiempo de tránsito de las células administradas por sonda nasogástrica. Los ratones PKU recibieron por sonda una sola dosis de agua, TCA o SYN-PKU707 y los niveles de ácido hipúrico se controlaron durante un período de 1,5 horas después de la administración por sonda.

Para preparar las células, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 l), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia y a continuación se indujeron de forma aerobia en presencia de arabinosa al 0,15 % durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron 200 veces y se congelaron (glicerol al 10 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo. A cada ratón se le administraron por sonda 300 ul en total, a razón de 3×10^8 UFC ufc/ratón.

Brevemente, comenzando 4 días antes del estudio, los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad) se mantuvieron con comida y agua normales. El Día 1, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento según el peso en grupos de la siguiente manera: Grupo 1: SYN-PKU-707 (3×10^8 UFC; n = 6); Grupo 2: TCA (0,033 mg/g; n = 6); Grupo 3: Control de H₂O (n = 6). Las bacterias, TCA o H₂O se administraron a los ratones por sonda oral (en 300 ul). Se añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Se recogió orina de todos los animales hasta 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración por sonda, y las cantidades totales de ácido hipúrico recuperadas en cada punto temporal se determinaron mediante LC/MS. La **figura 56** muestra la cantidad absoluta de ácido hipúrico recuperado en la orina en diversos puntos temporales durante el marco de tiempo de 1,5 horas, según se determina mediante espectroscopia de masas. La pendiente de las líneas se puede usar como indicador del tiempo de tránsito de las bacterias. Con TCA puro, se observa una rápida disminución en la recuperación de hipurato en la orina dentro de los primeros 15 minutos después de que comienza la recogida. Para las células modificadas genéticamente, la recuperación de hipurato se mantiene durante al menos los primeros 30 min después de que comienza la recogida y tiene una pendiente descendente decreciente. Estos resultados indican que las células permanecen en el intestino delgado produciendo TCA durante un tiempo útil. Según esta interpretación, se demostró que SYN-PKU-707 conduce a una disminución de la fenilalanina en sangre en otros estudios descritos en esta invención.

Ejemplo 41. Exposición a proteína y los efectos de SYN-PKU707, SYN-PKU711 y SYNPKU712 en los parámetros de sangre y orina y el tránsito gastrointestinal SITZMARKS® en macacos cangrejeros (no GLP)

Se evalúan las respuestas en macacos cangrejeros a la administración de la cepa de PKU con una exposición a proteína después de múltiples dosis (Fase 1) y el tránsito gastrointestinal SITZMARKS®.

Se seleccionan monos Cynomolgus porque esta especie está estrechamente relacionada, tanto filogenética como fisiológicamente, con los seres humanos y es una especie comúnmente usada para evaluaciones de toxicidad no clínica.

Las bacterias manipuladas genéticamente se administran mediante sonda nasogástrica, según la vía de administración propuesta en los seres humanos. Se realiza un seguimiento del bienestar general de los animales (observaciones clínicas), la patología clínica del peso (química sérica, hematología y coagulación). Se realizan mediciones de orina y plasma y se examinan muestras fecales para determinar la carga bacteriana.

Las tres cepas siguientes se comparan en el estudio: 1. SYN-PKU712 (que comprende 3X-

fnrSPAL3, 2X-fnrSpheP con inserción Para-FNRS24Y-deltadapA (auxotrofia DAP); 2. SYN-PKU707 - sin LAAD (3X-fnrSPAL3, 2X-fnrSpheP con inserción Para-FNRS24Y); 3. SYN-PKU711 - con LAAD (3X-fnrSPAL3, 2X-fnrSpheP con inserción Para-FNRS24Y-LAAD (LAAD positiva)).

5

Animales

En el estudio se usan macacos cangrejeros criados específicamente (*Macaca fascicularis*; macho; 12 animales sin tratar, de 3 a 6 kg (en el examen físico inicial); de 3 a 8 años (en el examen físico inicial)). Se usan doce animales, 10 de los cuales se usan para la dosificación. Los animales seleccionados se examinan por el personal veterinario y solo los animales que cumplen con los criterios de salud del establecimiento y que se consideran sanos son aprobados por un veterinario para su uso en el estudio.

Los animales se alojan en un entorno de temperatura y humedad controladas. El intervalo objetivo de temperatura y humedad relativa está entre 18 y 29 °C y entre 30 y 70 %, respectivamente. Un sistema de iluminación automático está configurado para proporcionar un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales se alojan individualmente/en alojamiento compartido/en alojamiento grupal en jaulas que cumplen con la Ley de Bienestar Animal y las recomendaciones establecidas en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council 2011) y los SOPS de SNBL USA. Los animales dentro de una unidad establecida de alojamiento compartido/alojamiento grupal pueden ser presentados a un nuevo compañero social durante el estudio en caso de separación debido a la autopsia o por recomendación veterinaria.

25

Se ofrecen a los animales dos veces al día galletas PMI LabDiet® Fiber-Plus® Monkey Diet 5049. Los animales se mantienen en ayunas según lo requieran los procedimientos específicos (por ejemplo, antes de las extracciones de sangre para química sérica, recogida de orina). La dieta se analiza de forma rutinaria en busca de contaminantes y se encuentra dentro de las especificaciones del fabricante. Se proporciona agua potable fresca a voluntad a todos los animales. El agua se analiza rutinariamente en busca de contaminantes. Los animales reciben frutas, verduras, otros complementos dietéticos y dispositivos de enriquecimiento de jaulas durante el transcurso del estudio.

Se usa un esquema de asignación al azar estratificado que incorpora los pesos corporales para asignar animales a grupos de estudio.

Los animales previamente en cuarentena se aclimatan a la sala de estudio durante un mínimo de 14 días antes del inicio de la dosificación. Se recopilan los datos de la fase de aclimatación de todos los animales, incluidos los de reserva. Según sea necesario, los animales asignados se reemplazan por animales de reserva según los resultados generados durante la fase de aclimatación. Los animales de reserva se retiran del estudio el Día 1 o después.

45 Dosificación, preparación y administración del artículo de prueba

En la Fase 1 del estudio, los animales reciben dosis como se indica en la Tabla 73. Los animales reciben dosis (aproximadamente 10^{12} bacterias por animal por dosis) con un volumen fijo de cada artículo de prueba (10 ml) a través de sonda nasogástrica (NG) y un volumen fijo de exposición a proteína (20 ml). Se administra un volumen fijo (2 ml) de lavado con vehículo de dosis después de cada dosis del artículo de prueba. Se administra un volumen fijo (2 ml) de lavado con agua desionizada después de cada dosis de exposición a proteína. Esta vía de administración es consistente con la vía de administración propuesta

50

en los seres humanos.

Se usa batido de proteínas con sabor a vainilla (MET-Rx RTD51 (MET-Rx), almacenado a temperatura ambiente) para la exposición a proteína. Se usa una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con bicarbonato de sodio 0,36 M y glicerol al 15 % como vehículo para la administración de las cepas. Se prepara una dosis adicional de vehículo combinando PBS con bicarbonato de sodio y glicerol para obtener una solución que contiene bicarbonato de sodio 0,36 M y glicerol al 15 %.

10 Tabla 73. Programa de dosificación

Grupo	Programa de dosis							Vía de dosis	Número de animales
	Día 1 ^{a,b}	Día 4 ^{a,c}	Día 9 ^{a,d}	Día 15 ^{a,e}	Día 19 ^a	Día 24 ^a	Día 29 ^{a,f}		Machos
1	Proteína + SYN-707	SYN-707 + Proteína	Proteína + SYN-PKU-707	SYN-PKU-707 + Proteína	SYN - PKU -707	Vehículo	SYN - PKU -711	NG ^g	5
2							SYN - PKU -1967		5

^a Alimento disponible al menos 6 horas después de que se hayan completado todos los procedimientos de dosificación

^b Administrar Exposición a proteína, esperar al menos 30 minutos, a continuación administrar SYN-PKU707

15 ^c Administrar SYN-PKU707, esperar al menos 30 minutos, a continuación administrar Exposición a proteína

^d Administrar Exposición a proteína, esperar al menos 2 horas, a continuación administrar SYN-PKU707

20 ^e Administrar SYN-PKU707, esperar al menos 2 horas, a continuación administrar Exposición a proteína

^f Los detalles de administración de SYN-PKU711 y SYN-PKU712 a añadir mediante modificación

^g Dosis administradas por sonda nasogástrica (NG)

25 En la Fase 2 del estudio, los animales se asignan a grupos y se tratan como se indica en la Tabla 74. Los animales reciben las dosis mediante sonda oral (OG). Se usan cápsulas SITZMARKS tal como las suministra el fabricante/proveedor para determinar el tiempo de tránsito.

30 i. Tabla 74. Asignaciones de grupo

Grupo	Programa de dosis		Vía de la dosis	Número de animales	Rayos X ^b
	Día 33	Nivel		Machos	
1	SITZMARKS [®]	1 Cápsula	OG ^a	12	0,5, 1, 2, 4, 6 y 12 horas después de la dosis
2					

^a Se administra una cápsula SITZMARKS[®] a través de sonda oral (OG)

^b Se toman radiografías a n = 2 por punto temporal

El Día 1, se administra en primer lugar una exposición a proteína seguida de una dosis de SYN-PKU707 administrada al menos 30 minutos después de la exposición a proteína. El día 4, se administra en primer lugar SYN-PKU707 seguida de una exposición a proteína administrada al menos 30 minutos después de la dosis de SYN-PKU707. El Día 9, se administra en primer lugar una exposición a proteína seguido de una dosis de SYN-PKU707 administrada al menos 2 horas después de la exposición a proteína. El día 15, se administra en primer lugar SYN-PKU707 seguida de una exposición a proteína administrada al menos 2 horas después de la dosis de SYN-PKU707. El día 19, solo se administra SYN-PKU707. El día 24 solo se administra vehículo. El día 29, se administra SYN-PKU711 (Grupo 1) y SYNPKU712 (Grupo 2).

El día 37, se administra una sola cápsula SITZMARKS® una vez a cada animal seguido de una serie de radiografías para rastrear el contenido de la cápsula. Las radiografías son de 2 animales por punto temporal 0,5, 1, 3, 4, 6 y 12 horas después de la dosis.

En cada día de dosis, incluido el día 24, los animales se mantienen en ayunas durante una noche y el alimento vuelve a estar disponible al menos 6 horas después de la dosificación. La frecuencia de administración en la Fase 1 es para evaluar los efectos de una exposición a proteína administrada en diferentes momentos antes y después de la dosis del artículo de prueba. La frecuencia de administración en la Fase 2 es de una vez y evaluará los efectos del tiempo de tránsito en el tracto gastrointestinal posterior a la Fase 1.

Observaciones y exámenes

Observaciones clínicas: Las observaciones clínicas se realizan diariamente a partir del segundo día de aclimatación de cada animal. Se realizan observaciones clínicas adicionales, según sea necesario.

Consumo de alimentos: Se realiza una evaluación cualitativa del consumo de alimentos una vez al día por la mañana antes de la alimentación, para cada animal a partir del segundo día de aclimatación. Se realiza una evaluación del consumo en función del número medio de galletas que quedan de la alimentación anterior. El consumo de alimentos no se evalúa después del ayuno nocturno para los procedimientos programados. Los datos de consumo de alimentos se notifican como normal, bajo, sin consumo o retirado.

Peso corporal: Cada animal se pesa antes del primer día de dosificación y dos veces por semana durante todo el estudio. Se pueden tomar pesos corporales adicionales si es necesario.

Procedimientos de recogida de orina y sangre

La frecuencia de recogida de muestras se describe en la Tabla 75.

Tabla 75. Frecuencia de recogida de especímenes

Punto temporal (semana de estudio)	Orina	Heces	Sangre
Aclimatación (Semana -1)	-	-	-

Aclimatación (Semana -2)	-	-	-
Dosificación de la Fase 1 (Semana 1)	Días 1 y 4 a razón de:	Días 1 y 4 a razón de:	Días 1 y 4 antes de la dosis, 2, 4 y 6 horas después de la dosis
	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	
	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	
	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	
	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	
	12 a 24 horas (después de la dosis) ^b	12 a 24 horas (después de la dosis) ^b	
Dosificación de la Fase 1 (Semana 2)	Día 9 a razón de:	Días 9 a razón de:	Días 9 antes de la dosis, 2, 4 y 6 horas después de la dosis
	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	
	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	
	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	
	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	
	12 a 24 horas (después de la dosis) ^b	12 a 24 horas (después de la dosis) ^b	
Dosificación de la Fase 1 (Semana 3)	Días 15 y 19 a razón de:	Días 15 y 19 a razón de:	Días <u>15 y</u> 19 antes de la dosis, 2, 4 y 6 horas después de la dosis
	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	
	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	
	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	
	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	
	12 a 24 horas (después de la	12 a 24 horas (después de la	

	dosis) ^b	dosis) ^b	
Dosificación de la Fase 1 (Semana 4)	Día 24 a razón de:	Día 24 a razón de:	Día 24 antes de la dosis, 2, 4 y 6 horas después de la dosis
	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	al menos - 12 horas (antes de la dosis)	
	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	0 a 3 horas (después de la dosis) ^a	
	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	3 a 6 horas (después de la dosis) ^a	
	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	6 a 12 horas (después de la dosis) ^b	
	12 a 24 horas (después de la dosis) ^b	12 a 24 horas (después de la dosis) ^b	
Dosificación de la Fase 1 (Semana 5)	-	-	-
Dosificación de la Fase 1 (Semana 6)		Día 36 a razón de:	
	-	Una recogida de 24 horas ^b	-
		del Día 35 al Día 36	
= No aplicable Nota: Todos los tiempos se basan en la dosificación del artículo de prueba ^a Las recogidas son en +/-10 minutos ^b Las recogidas son en +/-30 minutos			

Recogida de orina: La orina se recoge en hielo húmedo de una bandeja de recogida de orina colocada debajo de la jaula del animal o de la vejiga en la autopsia. La orina se recoge, si está disponible, en hielo húmedo o paquetes de gel de una bandeja de recogida de orina colocada debajo de la jaula del animal. Se obtiene una muestra por la mañana antes de la alimentación.

Se determina y se registra el volumen total de cada muestra de orina. Las muestras de orina se almacenan en hielo seco o entre -60 y -86 °C antes del análisis.

Recogida de heces: Las heces se recogen, si están disponibles, a temperatura ambiente de una rejilla colocada sobre la bandeja de recogida de orina debajo de la jaula del animal. Las muestras de heces se recogen en recipientes tarados y se registra el peso total. Las muestras se colocan en hielo húmedo o en paquetes de gel refrigerados después del pesaje. Si no hay muestra presente, se recoge un hisopo fecal.

Las muestras de heces se transfieren a un tubo Falcon de 50 ml que contiene aproximadamente 5 ml de PBS. Si se necesita más de un tubo, las muestras se dividen en muestras aproximadamente iguales. Los hisopos de heces se transfieren a un tubo Falcon de 15 ml que contiene aproximadamente 1 ml de PBS. Las muestras de heces se almacenan entre -15 y -25 °C hasta su análisis.

Extracción de sangre: Se extrae sangre de una vena periférica de animales conscientes e inmovilizados.

- 5 El volumen de muestra mínimo es 0,5 ml de sangre, extraída en tubos K2EDTA MAP de 0,5 ml. Las muestras de sangre se centrifugan a temperatura ambiente después de la extracción para separar el plasma. El plasma se retira y se coloca en un tubo antes del almacenamiento entre -60 y -86 °C. Las muestras se pueden colocar en hielo seco antes del análisis.

- 10 Los resultados de este estudio informan sobre el impacto de la presencia de LAAD en los niveles de hipurato y el efecto de LAAD en el nivel de fenilalanina en plasma. El estudio también muestra el impacto de la auxotrofia dap en la actividad de la cepa. El estudio también informa sobre el momento de la dosificación en relación con la ingesta de alimentos
15 para una conversión óptima de fenilalanina basada en los niveles de hipurato urinario.

Ejemplo 42. Actividad *in vitro* de SYN-PKU709, SYN-PKU707 y SYN-PKU708

- Una retrodilución 1:100 del cultivo nocturno de SYN-PKU709, como se muestra en la **figura**
20 **47C**, se cultivó hasta la fase logarítmica temprana durante 1,5 h antes del traslado a la cámara anaerobia durante 4 horas para la inducción como se describe en esta invención. Para realizar el ensayo de actividad, se resuspendieron 1e8 células y se incubaron en tampón de ensayo (medio M9 con glucosa al 0,5 %, Phe 50 mM y MOPS 50 mM). Se tomaron muestras de sobrenadante en el tiempo y se midió el TCA (el producto de PAL)
25 mediante absorbancia a 290 nm para determinar la tasa de producción de TCA/actividad de PAL.

- Para las cepas que poseen FNRS24Y (SYN-PKU707 y SYN-PKU708): Los cultivos (1:100 retrodiluciones de cultivos nocturnos) se cultivaron hasta una fase logarítmica temprana
30 durante 1,5 h antes de la adición de L-arabinosa a una concentración final del 0,15 % para la inducción. Los cultivos se indujeron durante 4 horas (de forma aerobia). Para realizar el ensayo de actividad, se resuspendieron 1e8 células y se incubaron en tampón de ensayo (medio M9 con glucosa al 0,5 %, Phe 50 mM y MOPS 50 mM). Se tomaron muestras de sobrenadante en el tiempo y se midió el TCA (el producto de PAL) mediante absorbancia a
35 290 nm para determinar la tasa de producción de TCA/actividad de PAL.

Todos los cultivos compartían el mismo nivel de actividad de PAL, 4 umol de TCA producido/h/1e9 células.

- 40 Ejemplo 43. Determinación de la cinética de fenilalanina en el modelo de enterocirculación

Para caracterizar el modelo de enterocirculación de fenilalanina, primero se evaluó la cinética de los niveles en suero de fenilalanina después de la exposición a fenilalanina.

- 45 El Día -6, los ratones PKU (*enu2*) recibieron comida sin fenilalanina y agua (+)Phe (0,5 g/l)

- El Día 1, se extrajo sangre de los animales para obtener T = 0 (antes de la exposición a Phe), y los animales se asignaron al azar a dos grupos en función de los niveles de fenilalanina medidos. El primer grupo de tratamiento (n = 15) incluía ratones para su uso en
50 los puntos temporales de 2, 6 y 24 horas después de la exposición a fenilalanina; el Grupo 2 (n = 15) incluía ratones para los puntos temporales de 4 y 8 horas después de la exposición a fenilalanina.

Los ratones se pesaron previamente para obtener el peso promedio de cada grupo. La fenilalanina se dosificó a una concentración igual al peso promedio del grupo. Los animales recibieron dosis por vía subcutánea de 0,1 mg/g de fenilalanina. En el Grupo 1, se extrajo sangre de los animales 2, 6 y 24 horas después de la exposición a Phe. En el Grupo 2, se extrajo sangre de los animales 4 y 8 h después de la exposición a Phe. Los gráficos de Whisker en la **figura 38A** y la **figura 38B** muestran la distribución de los niveles de fenilalanina en sangre de ratón (tanto los niveles globales de fenilalanina (**figura 38A**) como el cambio en los niveles de fenilalanina desde T0 (**figura 38B**). Los niveles de fenilalanina se elevaron de manera estable durante al menos un período de 6 horas.

A continuación, se realizó una exposición subcutánea a 13C-Phe para determinar el grado de recirculación en estos ratones PKU (*enu2*).

El Día -6, los ratones PKU recibieron comida sin fenilalanina y agua (+)Phe (0,5 g/l). Los animales se pesaron previamente para obtener el peso promedio de cada grupo. El Día 1, se extrajo sangre de los animales para obtener T = 0 (antes de la exposición a Phe). Los animales se asignaron al azar a tres grupos de tratamiento en función de los niveles de fenilalanina medidos. Los grupos (n = 2 por grupo) fueron los siguientes: Grupo 1 = 0 min (sin exposición a Phe); Grupo 2 = punto temporal de 20 min después de la exposición a Phe; Grupo 3 = punto temporal de 2 h después de la exposición a Phe. Los animales recibieron dosis de fenilalanina a una concentración igual al peso promedio del grupo a una dosis subcutánea de 0,1 mg/g de Phe. El grupo 1 (grupo 0 min) no recibió una dosis de fenilalanina. En cada punto temporal después de la exposición a Phe (20 min y 2 h), se extrajo sangre y se sacrificó a los animales, se extirpó el tracto GI y se seccionó en intestino delgado y grueso.

Para el grupo T = 0 min, la extracción de órganos se realiza en ausencia de cualquier exposición a Phe. Las secciones se lavaron abundantemente con ~1 ml de PBS frío, el efluente se recogió en tubos de microcentrífuga de 1 ml, y las muestras se almacenaron en hielo. En consecuencia, todos los efluentes intestinales se diluyeron aproximadamente 2,5 veces en las mediciones debido al lavado intestinal de PBS, lo que indica que los niveles absolutos *in vivo* probablemente sean más altos que los que se muestran).

Como se observa en la **figura 39**, la Phe isotópica inyectada por vía subcutánea (SC) se observa en el intestino delgado en 20 min, y se confirmó que se producía enterorrecirculación de 13C-Phe marcada.

A continuación, se midieron los niveles globales de aminoácidos en sangre, intestino delgado y grueso en ratones de tipo natural y PKU.

El Día 1, los animales se mantuvieron en ayunas durante 1 hora y se les extrajo sangre para obtener T = 0. Se sacrificó a los animales y se extrajeron los órganos de cada animal. El tracto GI se extirpó y se seccionó en intestino delgado y grueso. Las secciones se lavaron abundantemente con ~1 ml de PBS frío y el efluente se recogió en tubos de microcentrífuga de 1 ml. Las muestras se almacenaron en hielo (sangre y efluentes intestinales) hasta el análisis por LC-MS. Como se muestra en la **figura 40**, los niveles de fenilalanina eran altos en sangre *enu2*, pero no se observaron otras diferencias importantes entre los ratones WT y *enu2*.

Ejemplo 44. Eficacia de la cepa probiótica de PKU SYN-PKU305 suspendida en gelatina en agua potable de ratón

Se evaluó la eficacia de SYN-PKU305 suspendida en gelatina en agua potable de ratón. El

día -7, los animales (ratones *Enu* PKU) recibieron comida y agua normales. Los ratones *Enu2* se mantuvieron con comida regular durante todo el experimento. El día 1, los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento y se les extrajo sangre para obtener los niveles de fenilalanina (Phe) en sangre de referencia ($T = 0$). Los ratones se agruparon de la siguiente manera: Grupo 1: H₂O ($n = 12$); Grupo 2: SYN-PKU305 ($n = 12$); para el Grupo 2, el agua potable se cambió a H₂O(+) SYN-PKU305 (5×10^9 células/ml) y gelatina al 0,125 %, sacarosa al 5 % y ATC a razón de 0,02 mg/l; para hacer la mezcla, se mezclaron 20 ml de SYN-PKU305 en 280 ml de H₂O(+) gelatina al 0,125 %, sacarosa al 5 % y se repartieron entre 2 jaulas de animales. El día 3, se cambió la botella de agua que contenía SYN-PKU305. El Día 4, se extrajo sangre de los grupos de tratamiento para $d = 4$ después de la adición de gelatina/agua para el análisis de fenilalanina en sangre. El día 5, se cambió la botella de agua que contenía SYN-PKU305. El Día 8, se extrajo sangre a todos los grupos de tratamiento para $d = 8$ después de la adición de gelatina/agua para el análisis de fenilalanina en sangre.

Para preparar las células para este estudio, las células se diluyeron 1:100 en LB, se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia, a continuación se añadió ATC a los cultivos a una concentración de 100 ng/ml y las células se cultivaron durante 4 horas más. Antes de la administración, las células se concentraron 200 veces y se congelaron (glicerol al 15 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M.

Los resultados se muestran en la **figura 42A** y la **figura 42B**, y muestran que los niveles absolutos de fenilalanina se reducen en ratones tratados con SYN-PKU305 en comparación con los ratones tratados con agua tanto 4 días como 8 días después de la exposición a fenilalanina.

Ejemplo 45. Eficacia de la cepa probiótica de PKU SYN-PKU707 suspendida en gelatina en agua potable de ratón

Se evalúa la eficacia de SYN-PKU707 ($3XP_{fmrS}$ -PAL3; $2XP_{fmrS}pheP$; $P_{ara-fmrS}24Y$) suspendida en gelatina en agua potable de ratón, que se cambia diariamente. El día -7, los animales (ratones *Enu* PKU) reciben comida y agua normales. Los ratones *Enu2* se mantienen con comida regular durante todo el experimento. El día 1, los animales se asignan al azar a grupos de tratamiento y se les extrae sangre para obtener los niveles de fenilalanina (Phe) en sangre de referencia ($T = 0$). Los ratones se agrupan de la siguiente manera: Grupo 1: H₂O ($n = 12$); Grupo 2: SYN-PKU901 ($n = 12$; Nissle resistente a estreptomicina); Grupo 3: SYN-PKU707 ($n = 12$). Para los Grupos 2 y 3, el agua potable se cambia a H₂O con gelatina al 0,125 %, sacarosa al 5 % y SYN-PKU901 (1×10^{10} células/ml) o SYN-PKU707 (1×10^{10} células/ml). Los días 2 y 3, las botellas de agua que contienen SYN-PKU901 y SYN-PKU707 se reemplazan por botellas nuevas que contienen mezclas recién preparadas de las cepas bacterianas. El día 3, los ratones se trasladan a jaulas metabólicas (4 jaulas por grupo, 3 ratones por jaula). El Día 4, se extrae sangre a los grupos de tratamiento para $d = 4$ después de la adición de gelatina/agua para el análisis de fenilalanina en sangre y se recoge orina para el análisis de ácido hipúrico. Los sedimentos fecales se recogen para determinar el recuento bacteriano fecal.

Para preparar las células para este estudio, las células se cultivan en medios de fermentación hasta una DO de 0,2 y a continuación se inducen durante 4 horas más en presencia de arabinosa a una concentración final del 0,15 % antes de que las células se concentren y se congelen (glicerol al 15 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelan en hielo y se mezclan 9:1 en bicarbonato 1 M.

Se realiza un segundo estudio esencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto que los ratones Enu2 se mantienen con un alimento bajo en Phe durante todo el estudio, comenzando el día -7.

5 Ejemplo 46. Modelo dietético rápido de PKU

La eficacia de SYN-PKU305 se evaluó en un modelo dietético rápido de PKU. En este modelo, los ratones Enu2 se mantuvieron con comida regular hasta el momento de la dosificación. La comida se retira en T0. Los ratones recibieron dosis según el régimen
10 descrito a continuación.

Para preparar las células para este estudio, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 l), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia y a continuación se trasladaron a la cámara anaerobia durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron
15 200 veces y se congelaron (glicerol al 15 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M.

El Día -5, los animales recibieron comida y agua normales. El día 1, los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento según los pesos promedio similares entre los
20 grupos de la siguiente manera: Grupo 1: Control de H₂O (n = 12); Grupo 2: SYN-PKU901-200 ul (n = 12); Grupo 3: SYN-PKU305-200 ul (n = 12). Los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se les extrajo sangre para obtener los niveles de fenilalanina en sangre de referencia (T = 0 después del ayuno). Cada grupo recibió una dosis por sonda oral 0,5 y 1,5 y 2,5 horas después del ayuno. A cada ratón se le administraron por sonda
25 600 ul en total, o 1x10¹ 1 UFC. Se extrajo sangre a todos los grupos de tratamiento 2 y 4 horas después del ayuno. Después de la última extracción de sangre, los animales recibieron comida libre de Phe y H₂O(+) con 0,5 g/l de Phe.

Para preparar las células para este estudio, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 l), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia y a continuación se trasladaron a la cámara anaerobia durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron
30 200 veces y se congelaron (glicerol al 15 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M. Los resultados en la **figura 41A** y la **figura 41B** muestran que los ratones tratados con SYN-PKU305 muestran una
35 disminución más rápida de la Phe en suero.

Ejemplo 47. Recuperación de hipurato en ratones administrados por sonda con fenilalanina marcada

40 Se evaluó la recuperación de hipurato en ratones inyectados con fenilalanina marcada y que recibieron por sonda tres veces SYN-PKU305.

Para preparar las células para este estudio, las células se diluyeron 1:100 en LB (2 l), se cultivaron durante 1,5 h de forma aerobia y a continuación se indujeron de forma aerobia en presencia de arabinosa al 0,15 % durante 4 horas. Antes de la administración, las células se concentraron 200 veces y se congelaron (glicerol al 10 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las
45 células se descongelaron en hielo.

Comenzando 4 días antes del estudio, los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad)
50 se mantuvieron con agua y comida sin fenilalanina que se complementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El Día 1, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento según el peso en grupos de la siguiente manera: Grupo 1: SYN-PKU-707 (n = 6 (3XP_{fmrS}-PAL3; 2XP_{fmrS}pheP; P_{ara}-fmrS24Y)); Grupo 2: SYN-PKU901 (n = 6; (Nissle resistente a

estreptomicina)); Grupo 3: Control de H₂O (n = 6). Se recogieron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina de referencia. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina radiomarcada mediante inyección subcutánea de 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. 1, 2 y 3 h después de la exposición a Phe, las bacterias se administraron a los ratones por sonda oral (3x250 ul) a razón de 3 dosis de 3x10¹⁰. Se añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Se recogió orina de todos los animales hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de la exposición a fenilalanina, y las cantidades de ácido hipúrico no marcado y radiomarcado recuperados en cada punto temporal se determinaron mediante LC/MS. La **figura 54A** y la **figura 54B** muestran la cantidad de ácido hipúrico marcado y no marcado recuperado en la orina durante el marco de tiempo de 6 horas, según se determina mediante espectroscopia de masas. Se observó un aumento en el hipurato recuperado en la orina de los ratones. ~4,5 % del hipurato recuperado en la orina era pesado, lo que sugiere que la mayoría de la fenilalanina degradada en este estudio es preexistente en el SI y no es la que se inyecta SC.

Ejemplo 48. Administración *in vivo* y eficacia de SYN-PKU708 en varias dosis

Se evaluó la capacidad de la cepa probiótica manipulada SYN-PKU-708 para cambiar los niveles de fenilalanina después de la inyección SC y para convertir la fenilalanina en hipurato a varias dosis. La cepa SYN-PKU-707 comprende tres copias de PAL impulsadas por el promotor FNR (insertadas en el cromosoma en los locus *malE/K*, *yicS/nepl* y *dmalP/T*), y dos copias de *pheP* impulsadas por el promotor FNR (insertadas en el cromosoma en los locus *LacZ* y *agal/rsml*), y el FNRS24Y-LAAD mutante insertado en el operón de arabinosa, que se transcribe como un mensaje bicistrónico (véase, por ejemplo, la **figura 47B**).

Los cultivos (1:100 retrodiluciones de cultivos nocturnos) se cultivaron hasta una fase logarítmica temprana durante 1,5 h antes de la adición de L-arabinosa a una concentración final del 0,15 % para la inducción. Los cultivos se indujeron durante 4 horas (de forma aerobia). Antes de la administración, las células se concentraron 200 veces y se congelaron (glicerol al 10 %, 2 g/l de glucosa, en PBS). Las células se descongelaron en hielo y se mezclaron 9:1 en bicarbonato 1 M. A cada ratón se le administraron por sonda 750 ul en total, o 5,3x10¹¹, 1,8x10¹¹, 6x10¹¹, 2x10⁹ ufc/ratón.

Comenzando 4 días antes del estudio (es decir, los Días -4-1), los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad) se mantuvieron con agua y comida sin fenilalanina que se complementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El Día 1, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento según el peso de la siguiente manera: Grupo 1: SYN-PKU-708 (n = 9; dosificación con 5,3x10¹¹ UFC); Grupo 2: SYN-PKU-708 (n = 6; dosificación con 1,8x10¹¹ UFC); Grupo 3: SYN-PKU-708 (n = 6; dosificación con 6x10¹¹ UFC); Grupo 4: SYN-PKU-708 (n = 6; dosificación con 2x10⁹ UFC); Grupo 5: Control de H₂O (n = 6).

Los animales se transfirieron a jaulas metabólicas (3 ratones por jaula, 3 jaulas por grupo) y se extrajeron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina de referencia. A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea de 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. 1, 2 y 3 h después de la exposición a Phe, las bacterias (o agua) se administraron a los ratones por sonda oral (3x250 ul; 5,3x10¹¹, 1,8x10¹¹, 6x10¹¹, 2x10⁹ ufc/ratón). Se añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Se extrajo sangre de los animales y se recogió la orina de todos los animales hasta 4 horas después de la exposición a Phe. Se extrajo sangre a todos los grupos de tratamiento 4 h después de la exposición a fenilalanina.

La sangre y la orina se almacenaron en hielo para el análisis por LC/MS.

La **figura 57A** representa las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia; y la reducción total en Δ phe se enumera en la Tabla 76.

5

Tabla 76. Disminución en delta[Phe] (%)

Dosis	Disminución en delta[Phe] (%)
SYN1967 5,3e10	37
SYN1967 1,8e10	46
SYN1967 6e9	24
SYN1967 2e9	26

La **figura 57B** representa la concentración de hipurato en orina 4 horas después de la inyección de fenilalanina. Los resultados de la **figura 57** muestran que SYN-PKU708 fue eficaz para reducir la fenilalanina en sangre y que el hipurato se excretó de forma dependiente de la dosis en las jaulas de ratones tratados con SYN-PKU708, lo que indica que las células estaban activas *in vivo*.

10

Ejemplo 48. Tiempo de tránsito de las bacterias (SYN-PKU707) después de una única administración por sonda de $\sim 3 \times 10^9$ ufc

15

Se evaluaron la localización y el tiempo de residencia intestinal de SYN-UCD707 (3XP_{fmrS}-PAL3; 2XP_{fmrSpheP}; P_{ara}-fmrS24Y, **figura 47A**). Los ratones se administraron por sonda, se sacrificaron en diversos momentos y se recogieron los efluentes del intestino delgado superior, medio e inferior.

20

Los cultivos bacterianos se cultivaron durante una noche y se sedimentaron. Los sedimentos se resuspendieron en PBS. Los ratones (C57BL6/J, 10-12 semanas) recibieron por sonda una vez 100 μ l de bacterias (aproximadamente 3×10^{10} UFC). El agua de bebida de los ratones se cambió para que contuviera 0,1 mg/ml de anhidrotetraciclina (ATC) y sacarosa al 5 % para mejor palatabilidad. En cada punto temporal (15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración por sonda), los animales se sacrificaron y el intestino se extirpó. El intestino delgado se cortó en tres partes iguales. Cada sección se lavó abundantemente con 0,5 ml de PBS frío y se recogió en tubos separados de 1,5 ml. Los efluentes intestinales se colocaron en hielo para la siembra de dilución en serie.

25

30

Para determinar las UFC de bacterias en cada efluente, el efluente se diluyó en serie y se sembró en placas LB que contenían kanamicina. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y se contaron las colonias. La cantidad de bacterias y el tiempo de residencia de SYN-UCD707 visto en cada compartimento se muestran en la **figura 58**.

35

Ejemplo 50. Actividad de la cepa SYN-PKU707 que expresa FNRS24Y inducible cultivada en condiciones aerobias

Se evaluó la actividad de SYN-PKU707 (3XP_{fmrS}-PAL3; 2XP_{fmrSpheP}; P_{ara}-fmr^{S24Y}), una cepa que expresa FNRS24Y bajo el control del promotor de arabinosa, en condiciones de crecimiento aerobias y se comparó con la actividad lograda en condiciones anaerobias.

40

Los cultivos nocturnos de SYN-PKU707, que comprendían 3XP_{fmrS}-PAL3; 2XP_{fmrSpheP}; P_{ara}-fmr^{S24Y} se diluyeron 1:100, y se cultivaron hasta la fase logarítmica temprana durante 1,5 h. Las células se cultivaron de forma aerobia durante 4 horas más en presencia o ausencia del inductor arabinosa a una concentración final del 0,15 % en matraces de 10 ml, 20 ml o

45

30 ml. Paralelamente, en muestras separadas, la cepa también se indujo de forma anaerobia durante 4 horas en presencia o ausencia de arabinosa. Para realizar el ensayo de actividad, se resuspendieron 1×10^9 células y se incubaron en tampón de ensayo (medio M9 con glucosa al 0,5 %, Phe 50 mM y MOPS 50 mM). Se tomaron muestras de sobrenadante en el tiempo y se midió el TCA (el producto de PAL) mediante absorbancia a 290 nm para determinar la tasa de producción de TCA/actividad de PAL. Como se observa en la **figura 51**, la expresión de *fnrS24Y* inducida por arabinosa da como resultado una actividad de alto nivel en condiciones aerobias en matraces de 10 ml, 20 ml o 30 ml. Además, se mantiene la activación en ausencia de arabinosa en condiciones anaerobias. Esto indica que esta cepa se preinduce eficazmente en condiciones aerobias antes de la administración *in vivo*. Estos resultados también proporcionan una indicación de que la activación anaerobia sin arabinosa, y la activación "*in vivo*" probablemente se conserva en esta cepa.

Ejemplo 51. Comparación de actividad de SYN2619 frente a SYN1967 en el modelo de PKU aguda inducible

Se comparó la actividad *in vivo* de dos cepas, SYN-PKU710 (como se muestra en la **figura 47D** y SYN-PKU708 (como se muestra en la **figura 47A**) en el modelo de ratón Pah ENU2/2 PKU. SYN-PKU708, comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*)) y dos copias cromosómicas de *pheP* (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*)). SYN-PKU708 comprende además una copia insertada del factor de transcripción FNR mutado FNRS24Y (Para::*FNRS24Y*) y una copia de la LAAD insertada en el mismo sitio de inserción (el operón de arabinosa), que se transcribe como un mensaje bicistrónico a partir del promotor de arabinosa endógeno. SYN-PKU708 comprende además un *deltadapA* (auxotrofia *dapA*). SYN-PKU710 comprende tres inserciones cromosómicas de PAL3 (3X *fnrS*-PAL (*malP/T*, *yicS/nepl*, *malE/K*)) y dos copias cromosómicas de *pheP* (2X*fnrS*-*pheP* (*lacZ*, *agal/rsml*)). SYN-PKU710 comprende además dos copias de PAL impulsadas por el promotor Lac inducible por IPTG (2X*lac*-PAL (*exo/cea* y *rhtC/rhtB*)) y una copia de la LAAD insertada en el operón de arabinosa con la expresión impulsada por el promotor Para nativo (Para::*LAAD*). SYN-PKU710 es una auxotrofia *dapA*.

Comenzando 4 días antes del estudio (es decir, los Días -4-1), los ratones Pah ENU2/2 (~11-15 semanas de edad) se mantuvieron con agua y comida sin fenilalanina que se complementó con 0,5 gramos/l de fenilalanina. El día 1, se pesaron los ratones para determinar el peso promedio de cada grupo y se asignaron al azar en grupos de tratamiento según el peso de la siguiente manera: Grupo 1: Control de H₂O (n = 12); Grupo 2: SYN-PKU-710 (n = 12); Grupo 3: SYN-PKU-708 (n = 12). Se recogieron muestras de sangre mediante punción cutánea submandibular para determinar los niveles de fenilalanina de referencia.

A continuación, se administró a los ratones una dosis única de fenilalanina mediante inyección subcutánea de 0,1 mg por gramo de peso corporal, según el peso promedio del grupo. 1, 2 y 3 h después de la exposición a Phe, las bacterias (o agua) se administraron a los ratones por sonda oral (300 μ l/dosis, total de 3×10^{10} ufc/ratón administrados en tres dosis). Se añadió bicarbonato de sodio a una concentración final de 100 mM para ambas cepas. Se recogió la orina de todos los animales hasta 4 horas después de la exposición a Phe. Se extrajo sangre a todos los grupos de tratamiento 4 h después de la exposición a fenilalanina. La sangre y la orina se almacenaron en hielo para el análisis por LC/MS. Las concentraciones de fenilalanina en sangre con respecto al valor de referencia 4 horas después de la inyección SC de fenilalanina se muestran en la **figura 59A**. Se calculó que la disminución porcentual en dPhe SYN-PKU710 y SYN-PKU708 era del 29 % y el 40 %, respectivamente. El hipurato total recuperado en la orina se muestra en la **figura 59B**. Se recuperó una cantidad insignificante de hipurato en ratones tratados con dH₂O.

Las células para este estudio se prepararon en un fermentador de la siguiente manera. Para SYN-PKU708, se descongeló un vial de congelador y se usó para inocular un cultivo en matraz de medio de fermentación compuesto por glicerol, extracto de levadura, soja, tampón y DAP (SYN-PKU708 es deltaDapA). El matraz se cultivó durante una noche y se usó para inocular un tanque de fermentación que contenía el mismo medio a 37 °C, pH 7 y oxígeno disuelto al 60 %. Después de una breve fase de crecimiento inicial, se indujo el cultivo con arabinosa 0,6 mM para activar la expresión de FNRS24Y para inducir la expresión de PAL y PheP impulsada por FNR. Las células se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron en un tampón de formulación que comprendía glicerol, sacarosa y tampón para proteger las células durante la congelación a <-60 °C.

Para SYN-PKU710, se usó un vial de congelador y se descongeló para inocular un cultivo en matraz de medio de fermentación compuesto por glicerol, extracto de levadura, soja, tampón y DAP (SYN-PKU708 es deltaDapA). El matraz se cultivó durante una noche y se usó para inocular un tanque de fermentación que contenía el mismo medio a 37 °C, pH 7 y oxígeno disuelto al 30 %. Después de una breve fase inicial de crecimiento, se indujo el cultivo con IPTG 1 mM para activar la expresión de los promotores Plac que controlaban la expresión de PAL. La expresión de LAAD no se indujo en este estudio. Después de 5 horas, de activación, las células se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron en un tampón de formulación que comprendía glicerol, sacarosa y tampón para proteger las células durante la congelación a <-60 °C.

Ejemplo 52. Evaluación de la actividad *in vitro* e *in vivo* de la cepa que contiene el sistema de bioseguridad

Se ensayó la actividad de las siguientes cepas:

SYN-PKU1001 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; dapA:: prom1 constitutivo (BBA _J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL)

SYN-PKU1002 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1003 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA:: prom1 constitutivo (BBA _J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1004 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA:: prom1 constitutivo (BBA _J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa

comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1005 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL)

SYN-PKU1006 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1007 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1008 comprende dos copias cromosómicas de pheP (lacZ::PfnrS-pheP, agal/rsml::PfnrS-pheP) y una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1009 una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL)

SYN-PKU1010 una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1011 comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1012 una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; dapA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61A**, excepto que el gen bla se reemplaza por la

construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1013 comprende una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL)

SYN-PKU1014 comprende una construcción mostrada en la **figura 61C** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de bajo número de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1015 comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus dapA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65B** (LacI Fnrs-Ptac-PAL-PAL).

SYN-PKU1016 comprende una construcción mostrada en la **figura 61D** insertada en el locus thyA en el cromosoma bacteriano (RBS de número medio de copias; thyA::prom1 constitutivo (BBA_J26100)-Pi(R6K)-promotor constitutivo 2(P1)-antitoxina Kis). La cepa comprende además un plásmido mostrado en la **figura 61B**, excepto que el gen bla se reemplaza por la construcción de la **figura 65D** (lacI -Ptac-PAL-PAL).

Las células se cultivan durante una noche en LB y se diluyen 1:100. Después de 1,5 horas de crecimiento, las células se cultivan durante 4 horas en presencia de IPTG 1 mM para activar la expresión de los promotores Plac que controlan la expresión de PAL (y en algunos casos PheP). Las bacterias se centrifugan y se resuspenden en tampón de ensayo que contiene fenilalanina 50 mM. Se extraen alícuotas de los ensayos celulares cada 20 min durante 1,5 horas para la cuantificación de trans-cinamato por absorbancia a 290 nm. En otro estudio, se emplean las mismas construcciones usadas anteriormente, y la cepa comprende además Para-LAAD integrado cromosómicamente, que se induce en paralelo con PLacI. En otro estudio, se emplean las mismas construcciones que anteriormente, excepto que las cepas comprenden además Para-FNRS24Y integrado cromosómicamente. En otro estudio, se emplean las mismas construcciones que anteriormente, excepto que las cepas comprenden además Para-FNRS24Y-LAAD integrado cromosómicamente.

Las secuencias para la construcción de estas construcciones se muestran en la Tabla 77, Tabla 78 y Tabla 79. En algunas realizaciones, el PAL3 usado en las cepas anteriores está optimizado por codones. En otras realizaciones, la secuencia PAL3 original de *Photorhabdus chemiluminescens* como se describe en esta invención se usa en cualquiera de las construcciones descritas anteriormente y en la **figura 65**.

Los estudios *in vivo* se realizan como se describe en el Ejemplo 51, el Ejemplo 44 y en otras partes de esta invención.

Tabla 77. Construcciones del sistema de bioseguridad y componentes de la secuencia

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Componente del		81

sistema plasmídico de bioseguridad - Secuencias del vector del sistema plasmídico de bioseguridad dap A, que comprende dapA, toxina Kid y R6K minimal ori, y elementos promotores que impulsan la expresión de estos componentes, como se muestra en la figura 61A	ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAG GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGAATTAAAAAA AAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTACTACCTAGGCCG CGGCCGCGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATC CTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCGG CCGCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGACTAGTC TTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAG AACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCC GCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAGGGGTCC CCAATAATTACGATTTAAATCACAGCAAACACCAC GTCGGCCCTATCAGCTGCGTGCTTTCTATGAGTCGT TGCTGCATAACTTGACAATTAACATCCGGCTCGTAG GGTTTGTGGAGGGCCCAAGTTCACCTAAAAAGGAG ATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCT TAATCATGCTGGGGAGGGTTTCTAATGTTACGGGA AGTATTGTCGCGATTGTTACTCCGATGGATGAAAAA GGTAATGTCTGTCGGGCTAGCTTGAAAAAACTGATT GATTATCATGTCGCCAGCGGTACTTCGGCGATCGTT TCTGTTGGCACCCTGGCGAGTCCGCTACCTTAAAT	

	CATGACGAACATGCTGATGTGGTGATGATGACGCT GGATCTGGCTGATGGGCGCATTCCGGTAATTGCCGG GACCGGCGCTAACGCTACTGCGGAAGCCATTAGCC TGACGCAGCGCTTCAATGACAGTGGTATCGTCGGCT GCCTGACGTAACCCCTTACTACAATCGTCCGTCGC AAGAAGGTTTGTATCAGCATTTCAAAGCCATCGCTG AGCATACTGACCTGCCGCAAATTCTGTATAATGTGC CGTCCCGTACTGGCTGCGATCTGCTCCCGGAAACGG TGGGCCGTCTGGCGAAAGTAAAAAATATTATCGGA ATCAAAGAGGCAACAGGGAACCTAACGCGTGTA CCAGATCAAAGAGCTGGTTTCAGATGATTTTGTCT GCTGAGCGGCGATGATGCGAGCGCGCTGGACTTCA TGCAATTGGGCGGTCATGGGGTTATTTCCGTTACGG CTAACGTCGCAGCGCGTGATATGGCCCAGATGTGC AAACTGGCAGCAGAAGGGCATTGTGCCGAGGCACG CGTTATTAATCAGCGTCTGATGCCATTACACAACAA ACTATTTGTGGAACCCAATCCAATCCCGGTGAAATG GGCATGTAAGGAACCTGGGTCTTGTGGCGACCGATA CGCTGCGCCTGCCAATGACACCAATCACCGACAGT GGCCGTGAGACGGTCAGAGCGGCGCTTAAACATGC CGGTTTGCTGTAAGACTTTTGTGAGGTTCCCTACTGT GACGACTACCACCGATAGACTGGAGTGTTGCTGCG AAAAAACCCCGCCGAAGCGGGGTTTTTGTGAGAA GTCACCACGATTGTGCTTTACACGGAGTAGTCGGCA GTTCCTTAAGTCAGAATAGTGGACAGGCGGCCAAG AACTTCGTTTCATGATAGTCTCCGGAACCCGTTGAG TCGTTTTCCGCCCGTGCTTTTCATATCAATTGTCCGG GGTTGATCGCAACGTACAACACCTGTGGTACGTATG CCAACACCATCCAACGACACCGCAAAGCCGGCAGT GCGGGCAAAATTGCCTCCGCTGGTTACGGGCAACA CAACAGGCAGGCGGGTCACGCGATTAAAGGCCGCC GGTGTGACAATCAGCACCGGCGCGTTCCCTGCTGC TCATGACCTGCGGTAGGATCAAGCGAGACAAGCCA GATTTCCCTCTTTCCATCTAGTATAACTATTGTTTC TCTAGTAACATTTATTGTACAACACGAGCCCATTTT TGTCAAATAAAATTTAAATTATATCAACGTTAATAA GACGTTGTCAATAAAATTATTTGACAAAATTGGCC GGCCGGCGCGCCGATCTGAAGATCAGCAGTTCAAC CTGTTGATAGTACGTACTAAGCTCTCATGTTTCACG TACTAAGCTCTCATGTTAACGTACTAAGCTCTCAT GTTTAACGAATAAACCCCTCATGGCTAACGTACTAA GCTCTCATGGCTAACGTACTAAGCTCTCATGTTTCA CGTACTAAGCTCTCATGTTTGAACAATAAAATTAAT ATAAATCAGCAACTTAAATAGCCTCTAAGGTTTTAA GTTTTATAAGAAAAAAAAGAATATATAAGGCTTTT AAAGCCTTTAAGGTTTAAACGTTGTGGACAACAAG CCAGGGATGTAACGCACTGAGAAGCCCTTAGAGCC TCTCAAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTA ACGGCTGACATGGGGCGCGCCCAGCTGTCTAGGGC	
	GGCGGATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGAC AAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTTGA CTGAGCCTTTGCTTTTATTTGATGCCT	
Componente del sistema plasmídico de bioseguridad - Secuencias del		82

vector del sistema plasmídico de bioseguridad ThyA, que comprende ThyA, toxina Kid y R6K minimal ori, y elementos promotores que impulsan la expresión de estos componentes, como se muestra en la figura 61B	ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAG GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGAATTAAAAAA AAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTACTACCTAGGCCG CGGCCGCGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATC CTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCGG CCGCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGACTAGTC TTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAG AACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCC GCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAGGGGTCC CCAATAATTACGATTTAAATCACAGCAAACACCAC GTCGGCCCTATCAGCTGCGTGCTTTCTATGAGTCGT TGCTGCATAACTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTA GGGTTTGTGGAGGGGCCAAGTTCACTTAAAAAGGA GATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAAGTAAACAT CTTAATCATGCTGGGGAGGGTTTCTAATGAAACAGT ATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCTCGACGAAGGC ACACAGAAAAACGACCGTACCGGAACCGGAACGCT TTCCATTTTTGGTCATCAGATGCGTTTTAACCTGCA AGATGGATTCCCGCTGGTGACAATAAACGTTGCC ACCTGCGTTCCATCATCCATGAACTGCTGTGGTTTC TTCAGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAA ACAATGTCACCATCTGGGACGAATGGGCCGATGAA AACGGCGACCTCGGGCCAGTGTATGGTAAACAGTG GCGTGCCCTGGCCAACGCCAGATGGTCGTCATATTGA CCAGATCACTACGGTACTGAACCAGCTGAAAAACG ACCCGGATTTCGCGCCGCATTATTGTTTCAGCGTGGA ACGTAGGCGAACTGGATAAAATGGCGCTGGCACCG TGCCATGCATTCTTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGC AAACTCTCTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCCTGTGAC GTCTTCCTCGGCCTGCCGTTCAACATTGCCAGCTAC GCGTTATTGGTGATATGATGGCGCAGCAGTGCGAT CTGGAAGTGCGTGATTTTGTCTGGACCGGTGGCGAC ACGCATCTGTACAGCAACCATATGGATCAAACATCAT CTGCAATTAAGCCGCGAACC GCGTCCGCTGCCGAA GTTGATTATCAAACGTAAACCCGAATCCATCTTCGA CTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGA TCCGCATCCGGGCATTAAGCGCCGGTGGCTATCTA AGACTTTTGTGAGGTTCTACTGTGACGACTACCAC CGATAGACTGGAGTGTTGCTGCGAAAAAACCCCGC CGAAGCGGGGTTTTTTGCGAGAAGTCACCACGATT GTGCTTTACACGGAGTAGTCGGCAGTTCCTTAAGTC AGAATAGTGACAGGCGGCCAAGAACTTCGTTTCAT GATAGTCTCCGGAACCCGTTTCGAGTCGTTTTCCGCC CCGTGCTTTTCATATCAATTGTCCGGGGTTGATCGCA ACGTACAACACCTGTGGTACGTATGCCAACACCATC	

	CAACGACACCGCAAAGCCGGCAGTGCGGGCAAAT TGCCTCCGCTGGTTACGGGCACAACAACAGGCAGG CGGGTCACGCGATTAAAGGCCGCCGGTGTGACAAT CAGCACCGGCCGCGTTCCCTGCTGCTCATGACCTGC GGTAGGATCAAGCGAGACAAGCCAGATTTCCCCTC TTTCCATCTAGTATAACTATTGTTTCTCTAGTAACAT TTATTGTACAACACGAGCCCATTTTTGTCAAATAAA TTTTAAATTATATCAACGTTAATAAGACGTTGTCAA TAAAATTATTTTGACAAAATTGGCCGGCCGGCGCGC CGATCTGAAGATCAGCAGTTCAACCTGTTGATAGTA CGTACTAAGCTCTCATGTTTCACGTAAGCTCTC ATGTTTAACGTAAGCTCTCATGTTTAACGAAC AAACCCTCATGGCTAACGTAAGCTCTCATGGCT AACGTAAGCTCTCATGTTTCACGTAAGCTC TCATGTTTGAACAATAAAATTAATATAAATCAGCAA CTTAAATAGCCTCTAAGGTTTTAAGTTTTATAAGAA AAAAAGAATATATAAGGCTTTTAAAGCCTTTAAG GTTTAACGGTTGTGGACAACAAGCCAGGGATGTAA CGCACTGAGAAGCCCTTAGAGCCTCTCAAAGCAAT TTTGAGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGACATG GGGCGCGCCAGCTGTCTAGGGCGGCGGATTTGTC CTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGAT AAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCG TTTTATTGATGCCT	
Toxina (orientación inversa)	Kid TTAAGTCAGAATAGTGGACAGGCGGCCAAGAAGCTT CGTTCATGATAGTCTCCGGAACCCGTTTCGAGTCGTT TTCCGCCCCGTGCTTTCATATCAATTGTCCGGGGT GATCGCAACGTACAACACCTGTGGTACGTATGCCA ACACCATCCAACGACACCGCAAAGCCGGCAGTGCG GGCAAAATTGCCTCCGCTGGTTACGGGCACAACA CAGGCAGGCGGGTACGCGATTAAAGGCCGCCGGT GTGACAATCAGCACCGGCCGCGTTCCCTGCTGCTCA TGACCTGCGGTAGGATCAAGCGAGACAAGCCAGAT TTCCCCTCTTCCAT	83
dapA	ATGTTACGCGGAAGTATTGTCGCGATTGTTACTCCG ATGGATGAAAAAGGTAATGTCTGTCGGGCTAGCTT GAAAAAACTGATTGATTATCATGTGCCAGCGGTA CTTCGGCGATCGTTTCTGTTGGCACCCTGGCGAGT CCGCTACCTTAAATCATGACGAACATGCTGATGTGG TGATGATGACGCTGGATCTGGCTGATGGGCGCATTC CGGTAATTGCCGGGACCGGCGCTAACGCTACTGCG GAAGCCATTAGCCTGACGCAGCGCTTCAATGACAG TGGTATCGTCGGCTGCCTGACGGTAACCCCTTACTA CAATCGTCCGTCGCAAGAAGGTTTGTATCAGCATTT CAAAGCCATCGCTGAGCATACTGACCTGCCGCAA TTCTGTATAATGTGCCGTCCCGTACTGGCTGCGATC TGCTCCCGGAAACGGTGGGCGCTCTGGCGAAAGTA AAAAATATTATCGGAATCAAAGAGGCAACAGGGAA CTTAACGCGTGTAACCCAGATCAAAGAGCTGGTTTC	84

	AGATGATTTTGTCTGCTGAGCGGCGATGATGCGAG CGCGCTGGACTTCATGCAATTGGGCGGTCATGGGGT TATTTCCGTTACGGCTAACGTCGCAGCGCGTGATAT GGCCCAGATGTGCAAACTGGCAGCAGAAGGGCATT TTGCCGAGGCACGCGTTATTAATCAGCGTCTGATGC CATTACACAACAACTATTTGTCGAACCCAATCCAA TCCCGGTGAAATGGGCATGTAAGGAACTGGGTCTT GTGGCGACCGATACGCTGCGCCTGCCAATGACACC AATCACCGACAGTGGCCGTGAGACGGTCAGAGCGG CGCTTAAACATGCCGGTTTGCTGTAA	
thyA	ATGAAACAGTATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCT CGACGAAGGCACACAGAAAAACGACCGTACCGGA ACCGGAACGCTTTCCATTTTGGTCATCAGATGCGT TTTAACCTGCAAGATGGATTCCCGCTGGTGACAACT AAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGAACTG CTGTGGTTTCTTCAGGGCGACACTAACATTGCTTAT CTACACGAAAACAATGTCACCATCTGGGACGAATG GGCCGATGAAAACGGCGACCTCGGGCCAGTGTATG GTAAACAGTGGCGTGCCTGGCCAACGCCAGATGGT CGTCATATTGACCAGATCACTACGGTACTGAACCAG CTGAAAAACGACCCGGATTTCGCGCCGCATTATTGTT TCAGCGTGGAACGTAGGCGAACTGGATAAAATGGC GCTGGCACCGTGCCATGCATTCTTCCAGTTCTATGT GGCAGACGGCAAACCTCTCTGCGCCTGCCGTTCAACAT CTCCTGTGACGTCTTCTCGGCCTGCCGTTCAACAT TGCCAGCTACGCGTTATTGGTGCATATGATGGCGCA GCAGTGCATCTGGAAGTGGGTGATTTGTCTGGAC CGGTGGCGACACGCATCTGTACAGCAACCATATGG ATCAAACCTCATCTGCAATTAAGCCGCGAACC CGCTC CGCTGCCGAAGTTGATTATCAAACGTAAACCCGAA TCCATCTTCGACTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATT GAAGGCTACGATCCGCATCCGGGCATTAAAGCGCC GGTGGCTATCTAA	85
Polipéptido de toxina Kid	MERGEIWLVS LDPTAGHEQQGTRPVLIVTPAAFNRVT RLPVVVPVTS GGNFARTAGFAVSLDGVGIRTTGVVRC DQPRITDMKARGGKRLERVPETIMNEVLGRLSTILT*	86
Polipéptido dapA	MFTGSIVAIVTPMDEKGNVCRASLKKLIDYHVASGTS AIVSVGTTGESATLNHDEHADVMMTLDLADGRIPVI AGTGANATAEAI SLTQRFND SGIVGCLTVTPYYNRPS QEGLYQHFK AIAEHTDLPQILYNVPSRTGCDLLPETVG RLAKVKNIIGIKEATGNL TRVNQIKELVSDDFVLLSGD DASALDFMQLGGHGVISVTANVAARDMAQMCKLAA EGHFAEARVINQRLMPLHNKLFVEPNPIVKWACKEL GLVATDTLRLPMTPTD SGRET VRAALKHAGLL	87
Polipéptido ThyA	MKQYLELMQKVLDEGTQKNDRGTGTLSIFGHQMRF NLQDGFPLVTTKRCHLRSIIHELLWFLQGDTNIAYLHE NNVTIWDEWADENGDLGPVYGKQWRAWPTPDGRHI DQITTVLNQLKNDPDSRRIIVSAWNVGELDKMALAPC HAFFQFYVADGKLSCQLYQRSCDVFLGLPFNIA SYAL	88

	LVHMQCQCDLEVGDFVWTGGDTHLYSNHMDQTH LQLSREPRPLPKLIKRKPESIFDYRFEDFEIEGYDPPHG IKAPVAI*	

Tabla 78. Construcciones del sistema de bioseguridad insertadas cromosómicamente

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Construcción cromosómica de bioseguridad - bajo número de copias de Rep (Pi) y antitoxina Kis (como se muestra en la figura 61C)	TTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCGGAT CTGCTGGAACAGGTGGTGAGACTCAAGGTCATGATGGA CGTGAACAAAAAACGAAAATTCGCCACCGAAACGAGC TAAATCACACCCTGGCTCAACTTCCTTTGCCCGCAAAGC GAGTGATGTATATGGCGCTTGCTCCCATTGATAGCAAAG AACCTCTTGAACGAGGGCGAGTTTTCAAATTAGGGGCTG AAGACCTTGCAGCGCTCGCCAAAATCACCCCATCGCTTG CTTATCGACAATTAAAAGAGGGTGGTAAATTACTTGGTG CCAGCAAAATTCGCTAAGAGGGGATGATATCATTGCTT TAGCTAAAGAGCTTAACCTGCTCTTTACTGCTAAAACT CCCCTGAAGAGTTAGACCTTAACATTATTGAGTGGATAG CTTATTCAAATGATGAAGGATACTTGTCTTTAAATTC CCAGAACCATAGAACCATATATCTCTAGCCTTATTGGGA AAAAAATAAATTCACAACGCAATTGTAAACGGCAAGC TTACGCTTAAGTAGCCAGTATTCATCTTCTCTTTATCAAC TTATCAGGAAGCATTACTCTAATTTTAAAGAAAGAAAAAT ATTTTATTATTTCCGTTGATGAGTTAAAGGAAGAGTTAA TAGCTTATACTTTTGATAAAGATGGAAATATTGAGTACA AATACCCTGACTTTCCTATTTTTTAAAGGGATGTGTAA ATAAAGCCATTGCTGAAATTTAAAGAAACAGAAATA TCGTTTGTGGCTTCACTGTTTCATGAAAAAGAAGGAAGA AAAATTAGTAAGCTGAAGTTCGAATTTGTCGTTGATGAA GATGAATTTTCTGGCGATAAAGATGATGAAGCTTTTTTT ATGAATTTATCTGAAGCTGATGCAGCTTTTCTCAAGGTA TTTGATGAAACCGTACCTCCCAAAAAGCTAAGGGGTGA GGATCTCCAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCG AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGTGA ACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTG GGCCTTTCTGCGTTTATACCCGGGAAAAAGAGTATTGAC TtaaagttaacatataggTATAATGTGTGGAGACCAGAGGTAAGG AGGTAACAACCATGCGAGTGTTGAAGAAACATCTTAATC ATGCTAAGGAGGTTTCTAATGCATACCACCCGACTGAA GAGGGTTGGCGGCTCAGTTATGCTGACCGTCCCACCGGC ACTGCTGAATGCGCTGTCTCTGGGCACAGATAATGAAGT TGGCATGGTCATTGATAATGGCCGGCTGATTGTTGAGCC GTACAGACGCCCGCAATATTCAGTGGCTGAGCTACTGGC ACAGTGTGATCCGAATGCTGAAATATCAGCTGAAGAAC GAGAATGGCTGGATGCACCGGCGACTGGTCAGGAGGAA ATCTGA	89
Construcción cromosómica de bioseguridad		90

- número de medio de copias de Rep (Pi) y antitoxina Kis (como se muestra en la figura 61D)	TTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCGGAT CTTCCGGAAGACTAGGTGAGACTCAAGGTCATGATGGAC GTGAACAAAAAACGAAAATTCGCCACCGAAACGAGCT AAATCACACCCTGGCTCAACTTCCTTTGCCCGCAAAGCG AGTGATGTATATGGCGCTTGCTCCCATGATAGCAAAGA ACCTCTTGAACGAGGGCGAGTTTTCAAAATTAGGGCTGA AGACCTTGCAGCGCTCGCCAAAATCACCCCATCGCTTGC TTATCGACAATTAAGAGAGGGTGGTAAATTACTTGGTGC CAGCAAAATTTTCGCTAAGAGGGGATGATATCATTGCTTT AGCTAAAGAGCTTAACCTGCTCTTTACTGCTAAAACTC CCCTGAAGAGTTAGACCTTAACATTATTGAGTGGATAGC TTATTCAAATGATGAAGGATACTTGTCTTTAAATTCAC CAGAACCATAGAACCATATATCTCTAGCCTTATTGGGAA AAAAAATAAATTCACAACGCAATTGTAAACGGCAAGCTT ACGCTTAAGTAGCCAGTATTCATCTTCTCTTTATCAACTT ATCAGGAAGCATTACTCTAATTTTAAGAAGAAAAATTAT TTTATTATTTCCGTTGATGAGTTAAAGGAAGAGTTAATA GCTTATACTTTTGATAAAGATGGAAATATTGAGTACAAA TACCCTGACTTTTCTATTTTTTAAAAGGGATGTGTTAAATA AAGCCATTGCTGAAATTAAGAAAGAAAACAGAAATATCG TTTGTGGCTTCACTGTTTCATGAAAAAGAAAGGAAGAAAA ATTAGTAAGCTGAAGTTCGAATTTGTCGTTGATGAAGAT GAATTTTCTGGCGATAAAGATGATGAAGCTTTTTTTATG AATTTATCTGAAGCTGATGCAGCTTTTCTCAAGGTATTTG ATGAAACCGTACCTCCCAAAAAAGCTAAGGGGTGAGGA TCTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAA GACTGGGCCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACG CTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGC CTTTCTGCGTTTATACCCGGGAAAAAGAGTATTGACT^{taaa} gtctaaccataggTATAATGTGTGGAGACCAGAGGTAAGGAGG TAACAACCATGCGAGTGTTGAAGAAACATCTTAATCATG CTAAGGAGGTTTTCTAATGCATACCACCCGACTGAAGAG GGTTGGCGGCTCAGTTATGCTGACCGTCCCACCGGCACT GCTGAATGCGCTGTCTCTGGGCACAGATAATGAAGTTGG CATGGTCATTGATAATGGCCGGCTGATTGTTGAGCCGTA CAGACGCCCCGAATATTCAGTGGCTGAGCTACTGGCACA GTGTGATCCGAATGCTGAAATATCAGCTGAAGAACGAG AATGGCTGGATGCACCGGCGACTGGTCAGGAGGAAATC TGA	
Rep (Pi)	TGAGACTCAAGGTCATGATGGACGTGAACAAAAAACG AAAATTCGCCACCGAAACGAGCTAAATCACACCCTGGCT CAACTTCCTTTGCCCGCAAAGCGAGTGATGTATATGGCG CTTGCTCCCATGATAGCAAAGAACCTCTTGAACGAGGG CGAGTTTTCAAAATTAGGGCTGAAGACCTTGCAGCGCTC GCCAAAATCACCCCATCGCTTGCTTATCGACAATTAAG GAGGGTGGTAAATTACTTGGTGCCAGCAAAATTCGCTA AGAGGGGATGATATCATTGCTTTAGCTAAAGAGCTTAAC CTGCTCTTTACTGCTAAAACTCCCCTGAAGAGTTAGAC CTTAACATTATTGAGTGGATAGCTTATTCAAATGATGAA	91

	GGATACTTGTCTTTAAATTCACCAGAACCATAGAACCA TATATCTCTAGCCTTATTGGGAAAAAAATAAATTCACA ACGCAATTGTTAACGGCAAGCTTACGCTTAAGTAGCCAG TATTCATCTTCTCTTTATCAACTTATCAGGAAGCATTACT CTAATTTTAAGAAGAAAAATTATTTTATTATTTCCGTTGA TGAGTTAAAGGAAGAGTTAATAGCTTATACTTTTGATAA AGATGGAAATATTGAGTACAAATACCCTGACTTTCCTAT TTTTAAAAGGGATGTGTAAATAAAGCCATTGCTGAAAT TAAAAAGAAAACAGAAATATCGTTTGTGGCTTCACTGT TCATGAAAAAGAAGGAAGAAAAATTAGTAAGCTGAAGT TCGAATTTGTCGTTGATGAAGATGAATTTTCTGGCGATA AAGATGATGAAGCTTTTTTTATGAATTTATCTGAAGCTG ATGCAGCTTTTCTCAAGGTATTTGATGAAACCGTACCTC CCAAAAAGCTAAGGGGTGA	
Antitoxina Kis	CATACCACCCGACTGAAGAGGGTTGGCGGCTCAGTTATG CTGACCGTCCCACCGGCACTGCTGAATGCGCTGTCTCTG GGCACAGATAATGAAGTTGGCATGGTCATTGATAATGGC CGGCTGATTGTTGAGCCGTACAGACGCCCGCAATATTCA CTGGCTGAGCTACTGGCACAGTGTGATCCGAATGCTGAA ATATCAGCTGAAGAACGAGAATGGCTGGATGCACCGGC GACTGGTCAGGAGGAAATCTGA	92
RBS (bajo número de copias)	GCTGGAACAGGTGG	93
RBS (número medio de copias)	TCCGGAAGACTAGG	94

Tabla 79. Construcciones PAL inducibles

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Construcciones inducibles por IPTG y bajo contenido de oxígeno como se muestra en la figura 65A , que comprenden <i>LacI</i> en orientación inversa, subrayado), una región que comprende un promotor (<i>cursiva</i>), <i>LacO</i> (<i>cursiva en negrita</i>) y un sitio de unión a FNR (<i>cursiva subrayado</i>), y dos marcos de lectura abiertos que	<u>TC</u> ACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC <u>AG</u> CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAG <u>G</u> CGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTT <u>C</u> ACCAGTGAGACTGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACC <u>GC</u> CTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACG <u>CT</u> GGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGG <u>TG</u> GTAAACGGCGGGATATAACATGAGCTATCTTCGGT <u>AT</u> CGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACG <u>CG</u> CAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCC <u>AG</u> CGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGG <u>GA</u> ACGATGCCCTCATTGAGCATTGTCATGGTTTGTG <u>AAA</u> ACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCC <u>G</u> CTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTAT <u>G</u> CCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAAC <u>TT</u> AATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACC <u>CA</u> ATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCG <u>TC</u> CTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCT <u>GG</u> TCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAG	95

codifican PAL3 (secuencia alterada de codones no nativos 1		
y secuencia alterada de codones no nativos 2, ambas en negrita) y tercer marco de lectura abierto que codifica PheP; las secuencias de RBS están subrayadas, en cursiva y en negrita; esta construcción se puede transcribir como un mensaje tricistrónico.	<u>TGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATC</u> <u>CAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGC</u> <u>GCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA</u> <u>CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGC</u> <u>ACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACA</u> <u>ATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTG</u> <u>GCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTT</u> <u>GTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGC</u> <u>CATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAA</u> <u>CGTGGCTGGCCTGGTTCCACCACGCGGGAACCGTCTG</u> <u>ATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAA</u> <u>CGTTACTGGTTTCATATTCACCACCCCTGAATTGACTCTC</u> <u>TTCCGGGCGCTATCATGCCATAACCGCGAAAGGTTTTGCG</u> <u>CCATTCGATGGTGTCGTATACAAAAACGCCGTAAAGTTT</u> <u>GAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTGAGGGCAATAT</u> <u>CTCTCTTCGTCAGGCCACATAGCTTTCTTGTCTGATCGG</u> <u>AACGATCGTTGGCTGTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGT</u> <u>ATAATGTGTGGAATTGTGAGCGCTCACAATTAGCTGTCA</u> <u>CCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGA</u> <u>AACAGCCTCTACAAATAATTTGTGTTAAACACACCCACT</u> <u>AAGATAACTCTAGAAATAATTTGTGTTAACTTTAAGAAG</u> <u>GAGATATACATATGAAAGCAAAAGATGTTTCAGCCA</u> <u>ACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTG</u> <u>GAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAGAAAAA</u> <u>AGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAGCTTTTGA</u> <u>CGCATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAAAT</u> <u>TCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGATT</u> <u>TGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAGA</u> <u>AGATTGCAGAGCACCAGCAAAACCTGTTAACTTTT</u> <u>CTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAGCC</u> <u>TTGTATTAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTC</u> <u>TGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTG</u> <u>TCGCTCAGGCGATTGTTGATCATATTAACCATGAC</u> <u>ATTGTTCCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCAGTGGG</u> <u>TGCATCGGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTG</u> <u>CACGCGCTTTATGTGGTATCGGCAAGTTTATTAT</u> <u>ATGGGTGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTA</u> <u>AGCGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAAGCC</u> <u>AAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGG</u> <u>TAATGTCAGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAAA</u> <u>CTGGAAAACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGAT</u> <u>TGCCCTTGCTGTGGAAGCATTACTTGCGTCTCACG</u> <u>AACATTATGATGCCCGGATTCAACAAGTTAAGAAC</u> <u>CATCTGGTCAGAATGCGGTGGCATCAGCATTGC</u> <u>GTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTA</u> <u>CTGTCTGGGGTTAAAGAGCAGGCGAATAAAGCTT</u> <u>GTGTCATCAGGAGATTACCCAATCAATGATACC</u> <u>TTACAGGAAGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACA</u> <u>GGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACTG</u>	

	CTCGGAAGATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCT AATGATAATCCATTGATAGATCCAGAGAATGGCGA TGTGCTACACGGTGGAACTTTATGGGGCAATATG TCGCCCCGAACAATGGATGCATTA AAACTGGATATT GCTTTGATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGC TCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTAC CTAATTCAGTCCGACACCCGGCATGTACCAA GGTTTTAAAGGCGTCCAACTTTCTCAAACGGCTTT AGTTGCAGCGATTTCGCCATGATTGTGCTGCATCAG GTATTCATACCCTCGCAACAGAACAGTACAATCAG GATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGA TGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTG TTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCATT CATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGA AACTGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCA GTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGGATGAA GATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGA TCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGAAT <u>GACCCAGATAAAAACGCAAGGAGGTTCT</u> ATGAAGGCC AAAGATGTACAGCCGACCATCATCATTAAACAAAA CGTTTGATTAGCCTGGAAGACATCTATGATATCG CCATTAAAGCAGAAAAAGGTTGAAATCTCCACGGAA ATTACAGAACTGTTGACTCACGGTCGCGAAAAACT GGAGGAAAAACTGAACAGCGGTGAAGTTATTTAC GGTATCAACACTGGCTTTGGTGGTAACGCTAACCT TGTTGTGCCGTTGAAAAAGATTGCCGAACACCAGC AGAACCTGCTCACCTTCCTGTCTGCGGGTACAGGC GACTATATGTCCAAACCGTGTATCAAAGCGTCTCA GTTTACAATGCTGCTGTCTGTGTGCAAAGGTTGGT CCGCCACGCGGCCTATTGTAGCGCAAGCAATCGT CGATCACATCAACCATGATATCGTTCCGCTGGTGC CTCGTTACGGCAGCGTGCGGCATCTGGTGATCT GATCCCGCTGTCGTACATTGCTCGCGCTCTGTGCG GTATTGGCAAGGTGTACTACATGGGCGCGGAAAT CGACGCCGCCGAGGCAATCAAACGTGCGGGCCTG ACTCCGTTATCTCTGAAAGCGAAGGAAGGTCTGG CTCTGATCAACGGCACGCGTGTAATGTCTGGCATC TCCGCCATTACCGTGATTAAACTGGAAAAACTGTT CAAAGCTTCCATCTCCGCGATCGCATTGGCGGTG AGGCGTTGCTGGCATCCACGAACACTACGATGC CCGCATTCAACAGGTTAAAAACCATCCGGGTCAGA ACGCGGTTGCATCCGCACTTCGCAACTTGCTGGC GGGTTCTACTCAGGTGAATCTGCTGTCAGGTGTTA AGGAACAGGCAAACAAGCGTGTCGTCACCAGGA AATCACTCAGCTGAACGACACCCTGCAGGAAGTAT ACTCCATCCGTTGCGCACCGCAAGTGCTGGGCATT GTACCGGAAAGCCTGGCAACCGCACGTAAATCC TGGAACGTGAGGTAATTCGGCCAACGATAATCC GTTGATCGATCCAGAGAATGGCGACGTACTGCAC	

	GGCGGGAAC TTTATGGGCCAGTACGTTGCTCGCA CTATGGACGCGCTGAAACTCGATATTGCTCTGATT GCCAACCATCTCCACGCGATCGTTGCACTGATGAT GGACAATCGTTTCAGTCGCGGTCTGCCGAACAGC CTGTCCCCGACTCCGGGTATGTATCAGGGCTTTAA AGGTGTGCAGCTGTCCCAAACGGCTCTGGTTGCG GCGATTTCGTATGATTGCGCCGCGAGCGGCATCC ATACCTTAGCGACTGAACAGTATAACCAGGACATC GTTAGCCTGGGTTTGCATGCGGCGCAGGACGTTT TAGAAATGGAACAGAAACTGCGTAACATCGTATCC ATGACTATTCTGGTTGTTTGGCAGGCAATCCACCT GCGCGGCAACATCAGTGAAATCGCGCCAGAAACC GCGAAATTCTACCACGCGGTTTCGTGAAATTTCTC ACCGCTGATCACCAGTCGTGCTCTTGACGAAGATA TCATCCGCATCGCGGATGCGATCATTAAATGACCAG CTGCCGCTGCCGGAATATGCTGGAAGAGTAAAC <u>CCTAAGGTATTTACTAAACCGAAGGAGTACAATATGA</u> AAAACGCGTCAACCGTATCGGAAGATACTGCGTC GAATCAAGAGCCGACGCTTCATCGCGGATTACATA ACCGTCATATTCAACTGATTGCGTTGGGTGGCGCA ATTGGTACTGGTCTGTTTCTTGGCATTGGCCCCGC GATTCAGATGGCGGGTCCGGCTGTATTGCTGGGC TACGGCGTCGCCGGGATCATCGCTTTCCTGATTAT GCGCCAGCTTGGCGAAATGGTGGTTGAGGAGCCG GTATCCGGTTCATTTGCCCACTTTGCCTATAAATA CTGGGGACCGTTTGGCGGGCTTCTCTCTGGCTGG AACTACTGGGTAATGTTTCGTGCTGGTGGGAATGG CAGAGCTGACCGCTGCGGGCATCTATATGCAGTA CTGGTTCCCGGATGTTCCAACGTGGATTGTTGGGCTG CCGCCTTCTTTATTATCATCAACGCCGTTAACCTG GTGAACGTGCGCTTATATGGCGAAACCGAGTTCT GGTTTGGCGTTGATTAAAGTGCTGGCAATCATCGGT ATGATCGGCTTTGGCCTGTGGCTGCTGTTTTCTGG TCACGGCGGCGAGAAAGCCAGTATCGACAACCTC TGGCGCTACGGTGGTTTCTTCGCCACCGGCTGGA ATGGGCTGATTTTGTGCTGGCGGTAATTATGTTT TCCTTCGGCGGTCTGGAGCTGATTGGGATTACTGC CGCTGAAGCGCGCGATCCGGAAAAAAGCATTCCA AAAGCGGTAAATCAGGTGGTGTATCGCATCCTGCT GTTTTACATCGGTTCACTGGTGGTTTTACTGGCGC TCTATCCGTGGGTGGAAGTGAAATCCAACAGTAG CCCGTTTGTGATGATTTTCCATAATCTCGACAGCA ACGTGGTAGCTTCTGCGCTGAACTTCGTCAATTCTG GTAGCATCGCTGTCAAGTGTATAACAGCGGGGTTTA CTCTAACAGCCGCATGCTGTTTGGCCTTCTGTGC AGGGTAATGCGCCGAAGTTTTTGAATCGCGTCAG CCGTGCGGGTGTGCCGATTAACCTCGCTGATGCTTT CCGGAGCGATCACTTCGCTGGTGGTGTAAATCAAC TATCTGCTGCCGAAAAAGCGTTTGGTCTGCTGAT	
	GGCGCTGGTGGTAGCAACGCTGCTGTTGAACTGG ATTATGATCTGTCTGGCGCATCTGCGTTTTTCGTGC AGCGATGCGACGTCAGGGGCGTGAAACACAGTTT AAGGCGCTGCTCTATCCGTTCCGGCAACTATCTCTG CATTGCCTTCCTCGGCATGATTTTGTGCTGATGT GCACGATGGATGATATGCGCTTGTGAGCGATCCT GCTGCCGGTGTGGATTGTATTCTGTTTATGGCAT TTAAAACGCTGCGTCGGAAAtaa	

Construcciones inducibles por IPTG como se muestra en la figura 65C, que comprenden <i>LacI</i> en orientación inversa, subrayado), una región que comprende un promotor (<i>cursiva</i>), <i>LacO</i> (<i>cursiva en negrita</i>) y dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3 (secuencia alterada de codones no nativos 1 y secuencia alterada de codones no nativos 2, ambas en negrita) y tercer marco de lectura abierto que codifica PheP; las secuencias de RBS están subrayadas, en <i>cursiva</i> y en negrita; esta construcción se puede transcribir como un mensaje tricistrónico.	<u>TC</u>ACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC <u>AGCTGC</u>ATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAG <u>GCGGTTT</u>GCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTT <u>CACCAGT</u>GAGACTGGCAACAGCTGATTGCCCTTACC <u>GCCTGGCCCT</u>GAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACG <u>CTGGTTTGCCCC</u>AGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGG <u>TGGTTAACG</u>GCGGGATATAACATGAGCTATCTTCGGT <u>ATCGT</u>CGTATCCCCTACCAGATATCCGCACCAACG <u>CGCAGCCCG</u>GAAGCTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCC <u>AGCGCCATCT</u>GATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGG <u>GAACGAT</u>GCCCTCATTGAGCATTGTCATGGTTTGTG <u>AAAACCG</u>GACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCC <u>GCTATCG</u>GCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTAT <u>GCCAGCC</u>AGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAAC <u>TTAATGGG</u>CCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACC <u>CAATGCG</u>ACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCG <u>TCCTCAT</u>GGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCT <u>GGTCAG</u>AGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAG <u>TGCAGG</u>CAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATC <u>CAGCGG</u>ATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGC <u>GCGAGA</u>AAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA <u>CGCCGCT</u>TCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGC <u>ACCCAGT</u>TGATCGGCGCGAGATTAAATCGCCGCGACA <u>ATTTGCG</u>ACGGCGCGTGCAGGGGCCAGACTGGAGGTG <u>GCAACGC</u>CAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTT <u>GTTGTGC</u>CACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGC <u>CATCGCC</u>GCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAA <u>CGTGGC</u>TGGCCTGGTTCAACACGCGGGAACGGTCTG <u>ATAAG</u>AGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAA <u>CGTTACT</u>GGTTTCATATTCACCACCCCTGAATTGACTCTC <u>TTCCGGG</u>CGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCG <u>CCATT</u>CGATGGCGCGCCGCTTCGTCAGGCCACATAGCT <u>TTCTTG</u>TCTGATCGGAACGATCGTTGGCTGTGTTGACA <u>ATTAAT</u>CATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGC <u>TCACA</u>ATTAGTGTACCCGGATGTGCTTTCCGGTCTGAT <u>GAGTCC</u>GTGAGGACGAAACAGCCCTCTACAAATAATTTGT <u>TTAAACA</u>CACCCACTAAGATAACTTAGAAATAATTTT <u>GTTTAACTTTA</u>AGAAGGAGATATACATATGAAAGCAA <u>AAGATG</u>TTTCAGCCAACCATTATTATTAATAAAAAT <u>GGCCTT</u>ATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATTGC <u>GATAAA</u>CAGAAAAAAGTAGAAATATCAACGGAG	96

	ATCACTGAGCTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAATT AGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATG GAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTA GTTGTGCCATTTGAGAAGATTGCAGAGCACCAGC AAAACCTGTAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGG GACTATATGTCCAAGCCTTGTATTAAGCGTCACA ATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGT CTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAGGCGATTGTT GATCATATTAACCATGACATTGTTTCCTCTGGTTCC TCGCTATGGCTCAGTGGGTGCATCGGGTGATTAA TTCCTTTATCTTATATTGCACGCGCTTTATGTGGT ATCGGCAAAAGTTTATTATATGGGTGCAGAAATTGA CGCTGCTGAAGCAATTAAGCGTGCAGGGTTGACA CCATTATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCT GATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGAATCAGT GCAATCACCGTCATTAAACTGGAAAACTATTTAA AGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTGGAAG CATTACTTGCGTCTCACGAACATTATGATGCCCGG ATTCAACAAGTTAAGAACCATCCTGGTCAGAATGC GGTGGCATCAGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTT CAACGCAGGTTAATCTACTGTCTGGGGTTAAAGAG CAGGCGAATAAAGCTTGTCGTCATCAGGAGATTAC CCAACTCAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAA TTCGCTGTGCACCACAGGTATTAGGTATAGTGCCA GAATCTTTAGCTACTGCTCGGAAGATATTGGAACG GGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAG ATCCAGAGAATGGCGATGTGCTACACGGTGGA CTTTATGGGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATG CATTAAAACCTGGATATTGCTTTGATTGCCAATCAT CTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCG TTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTGGTCCGA CACCCGGCATGTACCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAA CTTTCTCAAACGGCTTTAGTTGCAGCGATTTCGCCA TGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCAA CAGAACAGTACAATCAGGATATTGTCAGTTTAGGT CTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCA GAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGG TAGTTTGTGTCAGGCCATTTCATCTTCGCGGCAATATT AGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTACCA TGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTG ATCGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTGCG GATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGA AATCATGCTGGAAGAATGACCCAGATAAAACGCAAG GAGGTTCTATGAAGGCCAAAGATGTACAGCCGACC ATCATCATTAACAAAAACGGTTTGATTAGCCTGGA AGACATCTATGATATCGCCATTAAGCAGAAAAAGG TTGAAATCTCCACGGAATTACAGAACTGTTGACT CACGGTCGCGAAAAACTGGAGGAAAAACTGAACA GCGGTGAAGTTATTTACGGTATCAACACTGGCTTT	

	GGTGGTAACGCTAACCTTGTTGTGCCGTTTCGAAAA GATTGCCGAACACCAGCAGAACCTGCTCACCTTCC TGTCTGCGGGTACAGGCGACTATATGTCCAAACC GTGTATCAAAGCGTCTCAGTTTACAATGCTGCTGT CTGTGTGCAAAGGTTGGTCCGCCACGCGGCCTAT TGTAAGCGCAAGCAATCGTTCGATCATCAACCATG ATATCGTTCCGCTGGTGCCTCGTTACGGCAGCGTG GGCGCATCTGGTGATCTGATCCCGCTGTCTGACAT TGCTCGCGCTCTGTGCGGTATTGGCAAGGTGTACT ACATGGGCGCGGAAATCGACGCCCGCGAGGCAAT CAAACGTGCGGGCCTGACTCCGTTATCTCTGAAAG CGAAGGAAGGTCTGGCTCTGATCAACGGCACGCG TGTAATGTCTGGCATCTCCGCCATTACCGTGATTA AACTGGAAAACTGTTCAAAGCTTCCATCTCCGCG ATCGCATTGGCGGTGAGGCGTTGCTGGCATCCC ACGAACACTACGATGCCCCGATTCAACAGGTTAAA AACCATCCGGGTGAGAACGCGGTTGCATCCGCAC TTCGCAACTTGCTGGCGGGTTCTACTCAGGTGAAT CTGCTGTCAGGTGTTAAGGAACAGGCAACAAAG CGTGTCGTCAACAGGAAATCACTCAGCTGAACGA CACCTGCGAGGAAGTATACTCCATCCGTTGCGCAC CGCAAGTGCTGGGCATTGTACCGGAAAGCCTGGC AACCGCACGTAAAATCCTGGAACGTGAGGTAATTT CGGCCAACGATAATCCGTTGATCGATCCAGAGAAT GGCGACGTACTGCACGGCGGGAACTTTATGGGCC AGTACGTTGCTCGCACTATGGACGCGCTGAAACTC GATATTGCTCTGATTGCCAACCATCTCCACGCGAT CGTTGCACTGATGATGGACAATCGTTTCAGTCGCG GTCTGCCGAACAGCCTGTCCCCGACTCCGGGTAT GTATCAGGGCTTTAAAGGTGTGCAGCTGTCCCAA CGGCTCTGGTTGCGGCGATTTCGTCATGATTGCGC CGCGAGCGGCATCCATACCTTAGCGACTGAACGA TATAACCAGGACATCGTTAGCCTGGGTTTGCATGC GGCGCAGGACGTTCTAGAAATGGAACAGAACTG CGTAACATCGTATCCATGACTATTCTGGTTGTTTG CCAGGCAATCCACCTGCGCGGCAACATCAGTGAA ATCGCGCCAGAAACCGCGAAATTCTACCACGCGG TTCGTGAAATTTCTCACCCTGATCACCAGATCGT GCTCTTGACGAAGATATCATCCGCATCGCGGATGC GATCATTAATGACCAGCTGCCGCTGCCGGAATTA TGCTGGAAGAGTAAACCCCTAAGGTATTTACTAAAC CGAAGGAGTACAATATGAAAAACGCGTCAACCGT ATCGGAAGATACTGCGTCGAATCAAGAGCCGACG CTTCATCGCGGATTACATAACCGTCATATTCAACT GATTGCGTTGGGTGGCGCAATTGGTACTGGTCTG TTTCTTGGCATTTGGCCCGGCGATTGAGATGGCGG GTCCGGCTGTATTGCTGGGCTACGGCGTCCGCCG GATCATCGCTTTCTGATTATGCGCCAGCTTGGCG AAATGGTGGTTGAGGAGCCGGTATCCGGTTCATTT	

	GCCCCACTTTGCCTATAAATACTGGGGACCGTTTGC GGGCTTCCTCTCTGGCTGGAATACTGGGTAATGT TCGTGCTGGTGGGAATGGCAGAGCTGACCGCTGC GGGCATCTATATGCAGTACTGGTTCCCGGATGTTT CAACGTGGATTTGGGCTGCCGCCTTCTTTATTATC ATCAACGCCGTTAACCTGGTGAACGTGCGCTTATA TGGCGAAACCGAGTTCTGGTTTTCGCTTGATTAAAG TGCTGGCAATCATCGGTATGATCGGCTTTGGCCTG TGGCTGCTGTTTTCTGGTCACGGCGGCGAGAAAG CCAGTATCGACAACCTCTGGCGCTACGGTGGTTTC TTCGCCACCGGCTGGAATGGGCTGATTTTGTGCT GGCGGTAATTATGTTCTCCTTCGGCGGTCTGGAGC TGATTGGGATTACTGCCGCTGAAGCGCGCGATCC GGAAAAAAGCATTCCAAAAGCGGTAAATCAGGTG GTGTATCGCATCCTGCTGTTTTACATCGGTTCACT GGTGGTTTTACTGGCGCTCTATCCGTGGGTGGAA GTGAAATCCAACAGTAGCCCGTTTGTGATGATTTT CCATAATCTCGACAGCAACGTGGTAGCTTCTGCGC TGAACCTTCGTCACTTCTGGTAGCATCGCTGTCAGTG TATAACAGCGGGGTTTACTCTAACAGCCGCATGCT GTTTGGCCTTTCTGTGCAGGGTAATGCGCCGAAGT TTTTGACTCGCGTCAGCCGTCGCGGTGTGCCGATT AACTCGCTGATGCTTTCGGAGCGATCACTTCGCT GGTGGTGTTAATCAACTATCTGCTGCCGCAAAAAG CGTTTGGTCTGCTGATGGCGCTGGTGGTAGCAAC GCTGCTGTTGAACTGGATTATGATCTGTCTGGCGC ATCTGCGTTTTCTGTCAGCGATGCGACGTCAGG GCGTGAAACACAGTTTAAGGCGCTGCTCTATCCGT TCGGCAACTATCTCTGCATTGCCTTCCTCGGCATG ATTTTGCTGCTGATGTGCACGATGGATGATATGCG CTTGTCAGCGATCCTGCTGCCGGTGTGGATTGTAT TCCTGTTTATGGCATTATAAACGCTGCGTCGGAAA TAA	
Construcciones inducibles por IPTG y bajo contenido de oxígeno como se muestra en la figura 65B, que comprenden <i>LacI</i> en orientación inversa, subrayado), una región que comprende un promotor (<i>cursiva</i>), <i>LacO</i> (<i>cursiva en negrita</i>) y un sitio de unión a FNR (<i>cursiva subrayado</i>), y dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3 (<i>secuencia alterada de codones no</i>	<u>TC</u><u>ACTG</u><u>CCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC</u> <u>AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAG</u> <u>GCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTCTTTT</u> <u>CACCAGTGAGACTGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACC</u> <u>GCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACG</u> <u>CTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGG</u> <u>TGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTATCTTCGGT</u> <u>ATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACG</u> <u>CGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCC</u> <u>AGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGG</u> <u>GAACGATGCCCTCATTGAGCATTTGCATGGTTTGTG</u> <u>AAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCC</u> <u>GCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTAT</u> <u>GCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAAC</u> <u>TTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACC</u> <u>CAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCG</u>	97

nativos 1		
y secuencia alterada de codones no nativos 2, ambas en negrita); las secuencias de RBS están subrayadas, en cursiva y en negrita; esta construcción se puede transcribir como un mensaje bicistrónico.	TCCTCATGGGAGAAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCT GGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAG TGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATC CAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGC GCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGC ACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACA ATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTG GCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTT GTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGC CATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTCGCAGAAA CGTGGCTGGCCTGGTTCCACCACGCGGGAAACGGTCTG ATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAA CGTTACTGGTTTCATATTCACCACCCCTGAATTGACTCTC TTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCG CCATTCGATGGTGTCTGTATACAAAACGCCGTAAAGTTT GAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTACAGGCAATAT CTCTCTTCGTCAGGCCACATAGCTTTCTTGTCTGATCG GAACGATCGTTGGCTGTGTTGACAATTAATCATCGGCTC GTATAATGTGTGAATTGTGAGCGCTCACAATTAGCTGTC ACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACG AAACAGCCTCTACAAATAATTTGTTTAAACAACACCCAC TAAGATAACTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAA GGAGATATACATATGAAAGCAAAAGATGTTACGCC AACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTT GGAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAGAAAA AAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAGCTTTTG ACGCATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAAA TTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGAT TTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAG AAGATTGCAGAGCACCAGCAAAACCTGTAACTTT TCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAGC CTTGATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTT CTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATT GTCGCTCAGGCGATTGTTGATCATATTAACCATGA CATTGTTCCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCAGTGG GTGCATCGGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATT GCACGCGCTTTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTA TATGGGTGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTA AGCGTGCAAGGTTGACACCATTAATCGTTAAAAGCC AAAGAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGG TAATGTCAGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTA CTGGAAAACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGAT TGCCCTTGCTGTGGAAGCATTACTTGCGTCTCAG AACATTATGATGCCCGGATTCAACAAGTTAAGA CATCCTGGTCAGAATGCGGTGGCATCAGCATTGC GTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTA CTGTCTGGGGTTAAAGAGCAGGCGAATAAAGCTT GTCGTCATCAGGAGATTACCCAACCTCAATGATACC	

	TTACAGGAAGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACA GGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCTTTAGCTACTG CTCGGAAGATATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCT AATGATAATCCATTGATAGATCCAGAGAATGGCGA TGTGCTACACGGTGGAAACTTTATGGGGCAATATG TCGCCCCGAACAATGGATGCATTAAAACTGGATATT GCTTTGATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGC TCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTAC CTAATTCACTGAGTCCGACACCCGGCATGTACCAA GGTTTTAAAGGCGTCCAACCTTTCTCAAACGGCTTT AGTTGCAGCGATTTCGCCATGATTGTGCTGCATCAG GTATTCATACCCTCGCAACAGAACAGTACAATCAG GATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGA TGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAATATTG TTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGTCAGGCCATT CATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGA AACTGCTAAATTTIACCATGCAGTACGCGAAATCA GTTCTCCTTTGATCACTGATCGTTCGTTGGATGAA GATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGA TCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGAAT <u>GACCCAGATAAAAACGCAAGGAGGTTCT</u>ATGAAGGCC AAAGATGTACAGCCGACCATCATCATTAAACAAAA CGGTTTGATTAGCCTGGAAGACATCTATGATATCG CCATTAAGCAGAAAAAGGTTGAAATCTCCACGGAA ATTACAGAACTGTTGACTCACGGTCGCGAAAAACT GGAGGAAAAACTGAACAGCGGTGAAGTTATTTAC GGTATCAACACTGGCTTTGGTGGTAACGCTAACCT TGTTGTGCCGTTTCGAAAAGATTGCCGAACACCAGC AGAACCTGCTCACCTTCCTGTCTGCGGGTACAGGC GACTATATGTCCAAACCGTGTATCAAAGCGTCTCA GTTTACAATGCTGCTGTCTGTGTGCAAAGGTTGGT CCGCCACGCGCCTATTGTAGCGCAAGCAATCGT CGATCACATCAACCATGATATCGTTCCGCTGGTGC CTCGTTACGGCAGCGTGGGCGCATCTGGTGATCT GATCCCGCTGTCTGATACATTGCTCGCGCTCTGTGCG GTATTGGCAAGGTGTACTACATGGGCGCGGAAAT CGACGCCGCCGAGGCAATCAAACGTGCGGGCCTG ACTCCGTTATCTCTGAAAGCGAAGGAAGGTCTGG CTCTGATCAACGGCACGCGTGTAATGTCTGGCATC TCCGCCATTACCGTGATTAAACTGGAAAACTGTT CAAAGCTTCCATCTCCGCGATCGCATTGGCGGTTCG AGGCGTTGCTGGCATCCACGAACACTACGATGC CCGCATTCAACAGGTTAAAAACCATCCGGGTCAGA ACGCGGTTGCATCCGCACTTCGCAACTTGCTGGC GGGTTCTACTCAGGTGAATCTGCTGTCAGGTGTTA AGGAACAGGCAAACAAAGCGTGTCGTCACCAGGA AATCACTCAGCTGAACGACACCCTGCAGGAAGTAT ACTCCATCCGTTGCGCACCGCAAGTGCTGGGCATT GTACCGGAAAGCCTGGCAACCGCACGTAAAATCC	

	TGGAACGTGAGGTAATTTTCGGCCAACGATAATCC GTTGATCGATCCAGAGAATGGCGACGTACTGCAC GGCGGGAACCTTTATGGGCCAGTACGTTGCTCGCA CTATGGACGCGCTGAAACTCGATATTGCTCTGATT GCCAACCATCTCCACGCGATCGTTGCACTGATGAT GGACAATCGTTTCAGTCGCGGTCTGCCGAACAGC CTGTCCCCGACTCCGGGTATGTATCAGGGCTTTAA AGGTGTGCAGCTGTCCCAAACGGCTCTGGTTGCG GCGATTCTGTCATGATTGCGCCGCGAGCGGCATCC ATACCTTAGCGACTGAACAGTATAACCAGGACATC GTTAGCCTGGGTTTGCATGCGGCGCAGGACGTTT TAGAAATGGAACAGAAACTGCGTAACATCGTATCC ATGACTATTCTGGTTGTTTGCCAGGCAATCCACCT GCGCGGCAACATCAGTGAAATCGCGCCAGAAACC GCGAAATTCTACCACGCGGTTCTGTAAATTTCTC ACCGCTGATCACCGATCGTGCTCTTGACGAAGATA TCATCCGCATCGCGGATGCGATCATTAAATGACCAG CTGCCGCTGCCGGAATTATGCTGGAAGAGTAA	
Construcciones inducibles por IPTG como se muestra en la figura 65D, que comprenden LacI en orientación inversa, subrayado), una región que comprende un promotor (<i>cursiva</i>), LacO (<i>cursiva en negrita</i>) y dos marcos de lectura abiertos que codifican PAL3 (secuencia alterada de codones no nativos 1 y secuencia alterada de codones no nativos 2, ambas en negrita); las secuencias de RBS están subrayadas, en <i>cursiva</i> y en negrita; esta construcción se puede transcribir como un mensaje bicistrónico.	<u>TC</u>ACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC <u>AG</u>CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAG <u>G</u>CGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTCTTTT <u>C</u>ACCAGTGAGACTGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACC <u>G</u>CCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACG <u>CT</u>GGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAAATCCTGTTTGATGG <u>T</u>GGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTATCTTCGGT <u>AT</u>CGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACG <u>C</u>GCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCC <u>AG</u>CGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGG <u>GA</u>ACGATGCCCTCATTTCAGCATTTGCATGGTTTGTG <u>AAA</u>ACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCC <u>G</u>CTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTAT <u>G</u>CCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAAC <u>TT</u>AATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTGTGCTGGTGACC <u>CA</u>ATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACC <u>TC</u>CTCATGGGAGAAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCT <u>GG</u>TCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAG <u>TG</u>CAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATC <u>C</u>AGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGC <u>G</u>CGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA <u>CG</u>CCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGC <u>AC</u>CCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACA <u>AT</u>TTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTG <u>G</u>CAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTT <u>G</u>TTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGC <u>C</u>ATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAA <u>CG</u>TGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGAAACGGTCTG <u>AT</u>AAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAA <u>CG</u>TTACTGGTTTCATATTACCAACCTGAATTGACTCTC <u>TT</u>CCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCG	98

	<i>CCATTTCGATGGCGCGCCGCTTCGTCAGGCCACATAGCTT</i> <i>TCTTGTTCGTGATCGGAACGATCGTTGGCTGTGTGACAAI</i> <i>TAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGCT</i> <i>CACAATTAGCTGTCACCGGATGTGCTTCCGGTCTGATG</i> <i>AGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTGTT</i> <i>TAAAACAACACCCACTAAGATAA</i><u><i>CTCTAGAAATAATTT</i></u> <u><i>GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGCAA</i></u> <i>AAGATGTTTCAGCCAACCATTTATTATTAATAAAAAAT</i> <i>GGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATTGC</i> <i>GATAAAACAGAAAAAAGTAGAAATATCAACGGAG</i> <i>ATCACTGAGCTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAAATT</i> <i>AGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATG</i> <i>GAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTA</i> <i>GTTGTGCCATTTGAGAAGATTGCAGAGCACCAGC</i> <i>AAAACCTGTAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGG</i> <i>GACTATATGTCCAAGCCTTGTATTAAAGCGTCACA</i> <i>ATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGT</i> <i>CTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAGGCGATTGTT</i> <i>GATCATATTAACCATGACATTGTTCTCTGTTCC</i> <i>TCGCTATGGCTCAGTGGGTGCATCGGGTGATTTAA</i> <i>TTCTTTATCTTATATTGCACGCGCTTTATGTGGT</i> <i>ATCGGCAAAGTTTATTATATGGGTGCAGAAATTGA</i> <i>CGCTGCTGAAGCAATTAAGCGTGCAGGGTTGACA</i> <i>CCATTATCGTTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCT</i> <i>GATTAACGGCACC CGGTAATGTCAGGAATCAGT</i> <i>GCAATCACCGTCATTAAACTGGAAAACTATTTAA</i> <i>AGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTGGAAG</i> <i>CATTACTTGCGTCTCACGAACATTATGATGCCCGG</i> <i>ATTCAACAAGTTAAGAACCATCCTGGTCAGAATGC</i> <i>GGTGGCATCAGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTT</i> <i>CAACGCAGGTTAATCTACTGTCTGGGGTTAAAGAG</i> <i>CAGGCGAATAAAGCTTGTGTCATCAGGAGATTAC</i> <i>CCAACCTCAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAA</i> <i>TTGCTGTGCACCACAGGTATTAGGTATAGTGCCA</i> <i>GAATCTTTAGCTACTGCTCGGAAGATATTGGAACG</i> <i>GGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAG</i> <i>ATCCAGAGAATGGCGATGTGCTACACGGTGGA</i> <i>CTTTATGGGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATG</i> <i>CATTA AAACTGGATATTGCTTTGATTGCCAATCAT</i> <i>CTTCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCG</i> <i>TTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTCCGA</i> <i>CACCCGGCATGTACCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAA</i> <i>CTTTCTCAAACGGCTTTAGTTGCAGCGATTGCGCA</i> <i>TGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCAA</i> <i>CAGAACAGTACAATCAGGATATTGTCAGTTTAGGT</i> <i>CTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCA</i> <i>GAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGG</i> <i>TAGTTTGTGAGGCCATTTCATCTTCGCGGCAATATT</i> <i>AGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTTACCA</i>	

	TGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTG ATCGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTGCG GATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGA AATCATGCTGGAAGAATGACCCAGATAAAACGCAAG <u>GAGGTTCT</u>ATGAAGGCCAAAGATGTACAGCCGACC ATCATCATTAACAAAAACGGTTTGATTAGCCTGGA AGACATCTATGATATCGCCATTAAGCAGAAAAAGG TTGAAATCTCCACGGAAATTACAGAACTGTTGACT CACGGTCGCGAAAAACTGGAGGAAAAACTGAACA GCGGTGAAGTTATTTACGGTATCAACACTGGCTTT GGTGGTAACGCTAACCTTGTTGTGCCGTTGAAAA GATTGCCGAACACCAGCAGAACCTGCTCACCTTCC TGTCTGCGGGTACAGGCGACTATATGTCCAAACC GTGTATCAAAGCGTCTCAGTTTACAATGCTGCTGT CTGTGTGCAAAGGTTGGTCCGCCACGCGGCCTAT TGTAAGCGCAAGCAATCGTCGATCACATCAACCATG ATATCGTTCCGCTGGTGCCCTCGTTACGGCAGCGTG GGCGCATCTGGTGATCTGATCCCGCTGTCGTACAT TGCTCGCGCTCTGTGCGGTATTGGCAAGGTGTACT ACATGGGCGCGGAAATCGACGCCGCCGAGGCAAT CAAACGTGCGGGCCTGACTCCGTTATCTCTGAAAG CGAAGGAAGGTCTGGCTCTGATCAACGGCACGCG TGTAATGTCTGGCATCTCCGCCATTACCGTGATTA AACTGGAAAACTGTTCAAAGCTTCCATCTCCGCG ATCGCATTGGCGGTGAGGCGTTGCTGGCATCCC ACGAACACTACGATGCCCGCATTC AACAGGTTAAA AACCATCCGGGTGAGAACGCGGTTGCATCCGCAC TTCGCAACTTGCTGGCGGGTTCTACTCAGGTGAAT CTGCTGTCAGGTGTTAAGGAACAGGCAAAACAAAG CGTGTCGTACCAGGAAATCACTCAGCTGAACGA CACCCTGCAGGAAGTATACTCCATCCGTTGCGCAC CGCAAGTGCTGGGCATTGTACCGGAAAGCCTGGC AACCGCACGTAAAAATCCTGGAACGTGAGGTAATTT CGGCCAACGATAATCCGTTGATCGATCCAGAGAAT GGCGACGTACTGCACGGCGGGAACTTTATGGGCC AGTACGTTGCTCGCACTATGGACGCGCTGAAACTC GATATTGCTCTGATTGCCAACCATCTCCACGCGAT CGTTGCACTGATGATGGACAATCGTTTCAGTCGCG GTCTGCCGAACAGCCTGTCCCCGACTCCGGGTAT GTATCAGGGCTTTAAAGGTGTGCAGCTGTCCCAA CGGCTCTGGTTGCGGCGATTGTCATGATTGCGC CGCGAGCGGCATCCATACCTTAGCGACTGAACAG TATAACCAGGACATCGTTAGCCTGGGTTTGCATGC GGCGCAGGACGTTCTAGAAATGGAACAGAAACTG CGTAACATCGTATCCATGACTATTCTGGTTGTTTG CCAGGCAATCCACCTGCGCGGCAACATCAGTGAA ATCGCGCCAGAAACCGCGAAATTCTACCACGCGG TTCGTGAAATTCCTCACCCTGATCACCGATCGT GCTCTTGACGAAGATATCATCCGCATCGCGGATGC	
	GATCATTAATGACCAGCTGCCGCTGCCGGAATTA TGCTGGAAGAGTAA	
Secuencia de PAL3 1 optimizada por codones		99

	ATGAAAGCAAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATTA ATAAAAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGA CATTGCGATAAAACAGAAAAAAGTAGAAATATCAAC GGAGATCACTGAGCTTTTGACGCATGGTCGTGAAAA ATTAGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATA TGGAATCAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTT AGTTGTGCCATTTGAGAAGATTGCAGAGCACCAGCA AAACCTGTAACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACT ATATGTCCAAGCCTTGTATTAAAGCGTCACAATTTAC TATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACC AGACCAATTGTCGCTCAGGCGATTGTTGATCATATTA ACCATGACATTGTTCCCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCA GTGGGTGCATCGGGTGATTAAATTCCTTTATCTTATAT TGCACGCGCTTTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTAT ATGGGTGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAG CGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAGCCAAA GAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGT CAGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAAACTGGAAA AACTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCT GTGGAAGCATTACTTGCGTCTCACGAACATTATGATG CCCGGATTCAACAAGTTAAGAACCATCCTGGTCAGA ATGCGGTGGCATCAGCATTGCGTAATTTATTGGCAGG TTCAACGCAGGTAAATCTACTGTCTGGGGTTAAAGAG CAGGCGAATAAAGCTTGTCGTCATCAGGAGATTACCC AACTCAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCAATTTCG CTGTGCACCACAGGTATTAGGTATAGTGCCAGAATCT TTAGCTACTGCTCGGAAGATATTGGAACGGGAAGTTA TCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGATCCAGAGAA TGGCGATGTGCTACACGGTGGAACTTTATGGGGCA ATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAACAACTGGAT ATTGCTTTGATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGC TCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTA ATTCAGTGAGTCCGACACCCGGCATGTACCAAGGTTT TAAAGGCGTCCAACCTTTCTCAAACGGCTTTAGTTGCA GCGATTGCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATA CCCTCGCAACAGAACAGTACAATCAGGATATTGTCA GTTTAGGTCTGCATGCCGCTCAAGATGTTTTAGAGAT GGAGCAGAAATTACGCAATATTGTTTCAATGACAATT CTGGTAGTTTGTGTCAGGCCATTCATCTTCGCGGCAATA TTAGTGAAATTGCGCCTGAACTGCTAAATTTTACCA TGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGAT CGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTGCGGATG CAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCAT GCTGGAAGAATGA	
Secuencia de PAL3 2 optimizada por codones	ATGAAGGCCAAAGATGTACAGCCGACCATCATCATT AACAAAAACGGTTTGATTAGCCTGGAAGACATCTAT GATATCGCCATTAAGCAGAAAAAGGTTGAAATCTCC	100

	ACGGAAATTACAGAACTGTTGACTCACGGTCGCGAA AAACTGGAGGAAAACTGAACAGCGGTGAAGTTATT TACGGTATCAACACTGGCTTTGGTGGTAACGCTAACC TTGTTGTGCCGTTTCGAAAAGATTGCCGAACACCAGCA GAACCTGCTCACCTTCCTGTCTGCGGGTACAGGCGAC TATATGTCCAAACCGTGTATCAAAGCGTCTCAGTTTA CAATGCTGCTGTCTGTGTGCAAAGGTTGGTCCGCCAC GCGGCCTATTGTAGCGCAAGCAATCGTCGATCACATC AACCATGATATCGTTCCGCTGGTGCCTCGTTACGGCA GCGTGGGCGCATCTGGTGATCTGATCCCGCTGTCTGTA CATTGCTCGCGCTCTGTGCGGTATTGGCAAGGTGTAC TACATGGGCGCGGAAATCGACGCCGCCGAGGCAATC AAACGTGCGGGCCTGACTCCGTTATCTCTGAAAGCGA AGGAAGGTCTGGCTCTGATCAACGGCACGCGTGTA TGTCTGGCATCTCCGCCATTACCGTGATTAACTGGA AAAACGTGTTCAAAGCTTCCATCTCCGCGATCGCATTG GCGGTTCGAGGCGTTGCTGGCATCCACGAACACTAC GATGCCCCGATTCAACAGGTTAAAAACCATCCGGGTG AGAACGCGGTTGCATCCGCACTTCGCAACTTGCTGGC GGGTTCTACTCAGGTGAATCTGCTGTCAGGTGTTAAG GAACAGGCAAACAAAGCGTGTCGTCACCAGGAAATC ACTCAGCTGAACGACACCCTGCAGGAAGTATACTCC ATCCGTTGCGCACCGCAAGTGCTGGGCATTGTACCGG AAAGCCTGGCAACCGCACGTAAATCCTGGAACGTG AGGTAATTTTCGGCCAACGATAATCCGTTGATCGATCC AGAGAATGGCGACGTACTGCACGGCGGGAACCTTAT GGGCCAGTACGTTGCTCGCACTATGGACGCGCTGAA ACTCGATATTGCTCTGATTGCCAACCATCTCCACGCG ATCGTTGCACTGATGATGGACAATCGTTTCAGTCGCG GTCTGCCGAACAGCCTGTCCCCGACTCCGGGTATGTA TCAGGGCTTTAAAGGTGTGCAGCTGTCCCAAACGGCT CTGGTTGCGGCGATTCTGTCATGATTGCGCCGCGAGCG GCATCCATACCTTAGCGACTGAACAGTATAACCAGG ACATCGTTAGCCTGGGTTTGCATGCGGCGCAGGACGT TCTAGAAATGGAACAGAACTGCGTAACATCGTATC CATGACTATTCTGGTTGTTTGCCAGGCAATCCACCTG CGCGGCAACATCAGTGAAATCGCGCCAGAAACCGCG AAATTCTACCACGCGGTTCTGTGAAATTTCTCACCGC TGATCACCGATCGTGCTCTTGACGAAGATATCATCCG CATCGCGGATGCGATCATTAAATGACCAGCTGCCGCTG CCGGAAATTATGCTGGAAGAGTAA	

Ejemplo 53. Comparación de la actividad PAL *in vitro* de varios promotores inducibles

- La actividad de PAL *in vitro* en cepas en las que la expresión de PAL está bajo el control de diversos promotores inducibles (arabinosa, IPTG(Lacl), ramnosa, Tet, temperatura (Ci857)) se mide por la tasa de acumulación de TCA. En este estudio, SYN-PKU707 se muestra como control de referencia. Las cepas se indujeron con arabinosa al 0,1 %, IPTG 1 mM o ramnosa, o tetraciclina como se describe en esta invención. Ci857 se indujo a 37 °C y 42 °C. Las células se resuspendieron en tampón de ensayo y los niveles de TCA se midieron en diversos puntos temporales para determinar la actividad como se describe en esta invención. Los resultados se muestran en la **figura 60**. Las construcciones usadas en este estudio se describen en la Tabla 80, la Tabla 81 y la Tabla 82. Lacl-PAL y Tet-PAL se muestran en otras partes de esta invención (por ejemplo, Tabla 72). Las construcciones se muestran en la **figura 49**, la **figura 62A**, la **figura 62B** y la **figura 62C**.

Tabla 80. Construcción para la expresión de PAL bajo el control de promotores sensibles al represor cl857 mutante

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
Construcción de promotor sensible a la temperatura que comprende el represor cl857 mutante (orientación inversa, en negrita subrayado) y región que comprende el promotor inducible por CI857 (en cursiva subrayado) que impulsa la expresión de PAL3 (fuente normal); RBS y región líder en cursiva con subrayado y en negrita (véase la figura 62A)	<u>TCAGCCAAACGTCTCTTCAGGCCACTGAC</u> <u>TAGCGATAACTTTCCCCACAACGGAACAA</u> <u>CTCTCATTGCATGGGATCATTGGGTACTG</u> <u>TGGGTTTAGTGGTTGTAAAAACACCTGAC</u> <u>CGCTATCCCTGATCAGTTTCTTGAAGGTA</u> <u>AACTCATCACCCCCAAGTCTGGCTATGCA</u> <u>GAAATCACCTGGCTCAACAGCCTGCTCAG</u> <u>GGTCAACGAGAATTAACATTCCGTCAGGA</u> <u>AAGCTTGGCTTGGAGCCTGTTGGTGCGGT</u> <u>CATGGAATTACCTTCAACCTCAAGCCAGA</u> <u>ATGCAGAATCACTGGCTTTTTTGGTTGTG</u> <u>CTTACCCATCTCTCCGCATCACCTTTGGT</u> <u>AAAGGTTCTAAGCTTAGGTGAGAACATCC</u> <u>CTGCCTGAACATGAGAAAAACAGGGTAC</u> <u>TCATACTCACTTCTAAGTGACGGCTGCAT</u> <u>ACTAACCGCTTCATACATCTCGTAGATTT</u> <u>CTCTGGCGATTGAAGGGCTAAATTCTTCA</u> <u>ACGCTAACTTTGAGAATTTTGTAAAGCAA</u> <u>TGCGGCGTTATAAGCATTTAATGCATTGA</u> <u>TGCCATTAAATAAAGCACCAACGCCTGAC</u> <u>TGCCCCATCCCCATCTTGTCTGCGACAGA</u> <u>TTCCTGGGATAAGCCAAGTTCATTTTTCT</u> <u>TTTTTTCATAAATTGCTTTAAGGCGACGT</u> <u>GCGTCCTCAAGCTGCTCTTGTGTTAATGG</u> <u>TTTCTTTTTTGTGCTCATACGTTAAATCTATC</u> <u>ACCGCAAGGGATAAATATCTAACACCGTGCGTG</u> <u>TTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTT</u> <u>GCATAGCTGTCACCGGATGTGCTTCCGGTCT</u> <u>GATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACA</u> <u>AATAATTTTGTTTAAAAACAACCCCCTAAGATA</u>	101

	<u>ACTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAA</u> <u>GGAGATATACAT</u>ATGAAAGCTAAAGATG TTC AGCCAACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCT TATCTCTTTGGAAGATATCTATGACATTGCG ATAAAACAAAAAAAAGTAGAAATATCAACG GAGATCACTGAACTTTGTACGCATGGTCGTG AAAAATTAGAGGAAAAATTAATTCAGGAG AGGTTATATATGGAATCAATACAGGATTTGG AGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAG AAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTTA ACTTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATAT GTCCAAACCTTGTATTAAGCGTCACAATTT ACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAGGTTGGT CTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCAAT TGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTCTC TGGTTCCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAG CGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCAC GAGCATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTA TATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGC AATTAAACGTGCAGGGTTGACACCATTATCG TTAAAAGCCAAAGAAGGTCTTGCTCTGATTA ACGGCACCCGGTAATGTCAGGAATCAGTG CAATCACCGTCATTAAACTGGAAAACTATT TAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCT GTTGAAGCATTACTTGCATCTCATGAACATT ATGATGCCCCGATTCAACAAGTAAAAAATC ATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCATT GCGTAATTTATTGGCAGGTTC AACGCAGGTT AATCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCA ATAAAGCTTGTCGTCATCAAGAAATTACCCA ACTAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATTCA ATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAG TGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAAT ATTGGAACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGAT AATCCATTGATAGATCCAGAAAATGGCGAT GTTCTACACGGTGGAATTTTATGGGGCAAT ATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTA AAAT GGATATTGCTTTAATTGCCAATCATCTTCAC GCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTT TCTCTCGTGGATTACCTAATTCAGTGAGTCC GACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGC GTCCAACCTTCTCAAACCGCTTAGTTGCTG CAATTCGCCATGATTGTGCTGCATCAGGTAT TCATACCCTCGCCACAGAACAATACAATCAA GATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCCGCTC AAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTAC GCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGT TTGTCAGGCCATTATCTTCGCGGCAATATT AGTGAAATTGCGCCTGAAACTGCTAAATTTT	
	ACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTT GATCACTGATCGTGCGTTGGATGAAGATATA ATCCGCATTGCGGATGCAATTATTAATGATC AACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAGA ATAA	
Represor mutante	cl857	102

	TCAGCCAAACGTCTCTTCAGGCCACTGACTA GCGATAACTTTCCCCACAACGGAACAACTCT CATTGCATGGGATCATTGGGTACTGTGGGTT TAGTGGTTGTAAAAACACCTGACCGCTATCC CTGATCAGTTTCTTGAAGGTAAACTCATCAC CCCCAAGTCTGGCTATGCAGAAATCACCTGG CTCAACAGCCTGCTCAGGGTCAACGAGAATT AACATTCCGTCAGGAAAGCTTGGCTTGGAGC CTGTTGGTGCGGTCATGGAATTACCTTCAAC CTCAAGCCAGAATGCAGAATCACTGGCTTTT TTGGTTGTGCTTACCCATCTCTCCGCATCACC TTTGGTAAAGGTTCTAAGCTTAGGTGAGAAC ATCCCTGCCTGAACATGAGAAAAAACAGGG TACTCATACTCACTTCTAAGTGACGGCTGCA TACTAACCGCTTCATACATCTCGTAGATTTC TCTGGCGATTGAAGGGCTAAATTCTTCAACG CTAACTTTGAGAATTTTGTAAAGCAATGCGG CGTTATAAGCATTTAATGCATTGATGCCATT AAATAAAGCACCAACGCCTGACTGCCCCAT CCCCATCTTGTCTGCGACAGATTCTGGGAT AAGCCAAGTTCATTTTCTTTTTTTCATAAAT TGCTTTAAGGCGACGTGCGTCCTCAAGCTGC TCTTGTGTTAATGGTTTCTTTTTTGTGCTCAT	
Región que comprende un promotor sensible a la temperatura	ACGTTAAATCTATCACCGCAAGGGATAAAT ATCTAACACCGTGCGTGTGACTATTTTACC TCTGGCGGTGATAATGGTTGCATAGCTGTCA CCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGT GAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTT GTTTAAACAACACCCACTAAGATAACTCTA GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA TATACAT	103
RBS y región líder	CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAA GGAGATATACAT	104
Secuencia polipeptídica del represor cl857 mutante	MSTKKKPLTQELEDARRLKAIYEKKKKNELGL SQESVADKMGMGQSGVGALFNGINALNAYN AALLTKILKVSVEEFSPSIAREIYEMYEA VSMQ PSLRSEYEYPVFSHVQAGMFSPKLRTFTKGDA ERWVSTTKASDSAFWLEVEGNSMTAPTGSK PSFPDGM LILVDPEQAVEPGDFCIARLGGDEFT FKKLIRDSGQVFLQPLNPQYPMIPCNESCSVVG KVIASQWPEETFG	105

Tabla 81. Construcción para la expresión de PAL bajo el control de promotores sensibles a ramnosa

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
PAL3 impulsado por un promotor sensible a		106

ramnosa (en cursiva); los sitios de unión a CRP-cAMP están subrayados y en cursiva; los sitios de unión a Rha S están en negrita y en cursiva; RBS y región líder está en negrita, cursiva y con subrayado (figura 62B)	<i>CGGTGAGCATCACATCACCACAATTCAGCAAATTGTGA ACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAATGGCC CATTTTCCTGTCAGTAACGAGAAGGTCGCGAATCAGG CGCTTTTACTGACTGGTCGTAATGAAATTCAGCTGTCACC GGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGA AACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAAAAACAACACCCA CTAAGATAACTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG AAGGAGATATACATATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGC CAACCATTATTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTT TGGAAGATATCTATGACATTGCGATAAAACAAAAA AAAGTAGAAATATCAACGGAGATCACTGAACTTTT GACGCATGGTCGTGAAAAATTAGAGGAAAAATTAA ATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAATACAGGA TTTGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTGAG AAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTAACTTTT CTTTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAACCT TGTATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCT GTTTGCAAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTC GCTCAAGCAATTGTTGATCATATTAATCATGACATT GTTCTCTGGTTCCTCGCTATGGCTCAGTGGGTGCA AGCGGTGATTTAATTCCTTTATCTTATATTGCACGA GCATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTATTATATGGGC GCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAACGTGC AGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAGCCAAAGAAG GTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAG GAATCAGTGCAATCACCGTCATTAAGCTGGAAAAA CTATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCT GTTGAAGCATTACTTGCATCTCATGAACATTATGAT GCCCCGATTCAACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCA AAACGCGGTGGCAAGTGCATTGCGTAATTTATTGGC AGGTTCAACGCAGGTTAATCTATTATCTGGGGTTAA AGAACAAGCCAATAAAGCTTGTCGTCATCAAGAAA TTACCCAATAAATGATACCTTACAGGAAGTTTATT CAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGTGC CAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAAATATTGGAAC GGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAG ATCCAGAAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAAT TTTATGGGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGC ATTAAACTGGATATTGCTTTAATTGCCAATCATCT TCACGCCATTGTGGCTCTTATGATGGATAACCGTTT CTCTCGTGGATTACCTAATCACTGAGTCCGACACC CGGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGCGTCCAACCTTC TCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCCATGATTG TGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGAACA</i>	
	ATACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGC CGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTAC GCAATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTC AGGCCATTCATCTTCGCGCAATATTAGTGAAATTG CGCCTGAACTGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCG AAATCAGTTCTCCTTTGATCACTGATCGTGCGTTGG ATGAAGATATAATCCGCATTGCGGATGCAATTATTA ATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAATCATGCTGGAAG AATAA	
Región que		107

comprende un promotor inducible ramnosa por	CGGTGAGCATCACATCACCACAATTCAGCAAATTGT GAACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAAT GGCCCATTTTCTGTGTCAGTAACGAGAAGGTCGCGA ATCAGGCGCTTTTACTGAGTGGTCGTAATGAAATTCA GCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCC GTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGT AAAACAACACCCACTAAGATAACTCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT	
RBS y región líder	CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA TATACAT	108
Sitios de unión a CRP-cAMP 1	GTCAGTAACGAGAAGGT	109
Sitios de unión a CRP-cAMP 2	AATTGTGAACATCATCACGTT	110
Sitio de unión a RhaS 1	ATCTTTCCCTGGTTGCC	111
Sitio de unión a RhaS 2	GTCAGTAACGAGAAGGT	112

Tabla 82. Construcciones PAL3 inducibles por arabinosa y promotor PssB

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
Construcción PAL3 inducible por arabinosa que comprende AraC (en orientación inversa, subrayado), una región que comprende un promotor inducible por arabinosa (en cursiva), y PAL3. RBS y región líder en	<u>TTATTCACAACCTGCCCTAAACTCGCTCGGACTCGCCCCG</u> <u>GTGCATTTTTTAAATACTCGCGAGAAATAGAGTTGATCGT</u> <u>CAAAACCGACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCC</u> <u>GGGTGGTGCTCAAAGCAGCTTCGCCTGACTGATGCGCT</u> <u>GGTCCTCGCGCCAGCTTAATACGCTAATCCCTAACTGCTG</u> <u>GCGGAACAAATGCGACAGACGCGACGGCGACAGGCAGA</u> <u>CATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAATTACTGTCTGC</u> <u>CAGGTGATCGCTGATGTAAGCAAGCCTCGCGTACCCG</u> <u>ATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCC</u> <u>ATGCGCCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCC</u> <u>AGCAATTCCGAATAGCGCCCTTCCCTTGTCCGGCATTAA</u> <u>TGATTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCG</u> <u>CTTCATCCGGGCGAAAGAAACCGGTATTGGCAAATATCG</u> <u>ACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGCGGAC</u> <u>GAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTCTGTGAGCCTCCG</u> <u>GATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCAGGCGGGAACA</u>	113
cursiva y con subrayado (figura 62C)		

	<u>GCAAAATATCACCCGGTCGGCAGACAAATTCTCGTCCCT</u> <u>GATTTTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAG</u> <u>AATATAACCTTTCATTCCCAGCGGTTCGGTCGATAAAAAA</u> <u>ATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGC</u> <u>CACCAGATGGGCGTTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGG</u> <u>ATCATTGTCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCAT</u> <u>TCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCAT</u> <u>CAGACATTGCCGTCACCTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCGCTA</u> <u>ACCCAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAAACAA</u> <u>GCGGGACCAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGCT</u> <u>ATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTGACGGCGT</u> <u>CACACTTTGCTATGCCATAGCATTATCCATAAGATTAGCG</u> <u>GATCCAGCCTGACGCTTTTTTCGCAACTCTCTACTGTTCTC</u> <u>CATACCCTAGAAAATAATTTGTTTAACTTAAAGAAGGAGAT</u> <u>ACATATGAAAGCTAAAGATGTTTCAGCCAACCATTATTATT</u> <u>AATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTATGACA</u> <u>TGCGGATAAAACAAAAAAAGTAGAAATATCAACGGAG</u> <u>ATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAATTAGAG</u> <u>GAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAATCAAT</u> <u>ACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCCATTTG</u> <u>AGAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTAACTTTTCT</u> <u>TTCTGCTGGTACTGGGGACTATATGTCCAAACCTTGATT</u> <u>AAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGCAAAG</u> <u>GTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCAATTGT</u> <u>TGATCATATTAATCATGACATTGTTCTCTGGTTCCTCGCT</u> <u>ATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCTTTATC</u> <u>TTATATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAAAGTTTAT</u> <u>TATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAATTAAG</u> <u>CGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAGCCAAAGAA</u> <u>GGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTCAGGA</u> <u>ATCAGTGCAATCACCGTCATTAACTGGAAAACTATTTA</u> <u>AAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAAGCATT</u> <u>ACTTGCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTCAACAA</u> <u>GTAAAAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAAGTGCA</u> <u>TTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTTAATCTAT</u> <u>TATCTGGGGTTAAAGAACAAAGCCAATAAAGCTTGTCGTC</u> <u>ATCAAGAAATTACCCAATAAATGATACCTTACAGGAAG</u> <u>TTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTATAGT</u> <u>GCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAATATTGGAACG</u> <u>GGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGATCCA</u> <u>GAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAATTTTATGGGG</u> <u>CAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAACCTGGAT</u> <u>ATTGCTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGGCTCT</u> <u>TATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTAATTCA</u> <u>CTGAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAAAGGC</u> <u>GTCCAACTTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTCGCC</u> <u>ATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCACAGA</u> <u>ACAATACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCATGCC</u> <u>GCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGCAAT</u>	
	ATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGTCAGGCCATTC ATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAACTGC TAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCTTTG ATCACTGATCGTGCGTTGGATGAAGATATAATCCGCATTG CGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGAAAT CATGCTGGAAGAATAA	
Construcción PAL3		114

inducible por arabinosa que comprende AraC (optimizado por codones en orientación inversa, subrayado), una región que comprende un promotor inducible por arabinosa (en cursiva), y PAL3. RBS y región líder con subrayado y en cursiva; sitios de unión a araC en cursiva y en negrita, sitio de unión a CRP en minúsculas, cursiva y negrita	<u>TTACTCGCAACCCGCACGGA</u><u>ACTCGGATGGGGACGCGCC</u> <u>CGTGCATTTTTTGAAAA</u><u>CGCGGGAGAAGTACAGCTGGTC</u> <u>ATCGAAGCCAACGTTACGACCGACGGTCGCGATCGGCAT</u> <u>GCGGGTGGTAGACAGCAGCAGCTTAGCCTGGCTGATGCG</u> <u>CTGGTCTTCACGCCAAGACAGCAGCTAATACCAAGCTG</u> <u>CTGACGGAACAGGTGGGACAGACGGCTCGGACTCAGGCA</u> <u>CACGTGCTGTGCAACAGACGCAATATCAAAGTTGCTATC</u> <u>CGCCAGATGGTCGCTGATGTACTGGCAAGCCTCGCGCAC</u> <u>GCGGTTGTCCATCGGTGGGTGGAGACTTTCGTTGATCGCT</u> <u>TCCATACGACGCAGCAGCAGCTGTTCCAGCAGGTTGATC</u> <u>GCCAGCAGTTCGCTGTAGCGGCCTTCACCCTGACCGGCAT</u> <u>TGATAATCTGACCGAACAGATCGCTGAAGTGCGGCTGGT</u> <u>GAGCTTCATCCGGGCGGAAAAAACAGTGTGTTGCAAAGA</u> <u>TAGACGGCCAGTTCAGCCACTCATGCCAGTAAGCACGAG</u> <u>GGCGGAAGTATACCCACTGGTGATACCATTTCATGCGCCTC</u> <u>CGGATGACGGCCGTA</u><u>GTGATGGATTTACCCGGCGGAAA</u> <u>TAACAGAATATCACCAGGACGACAAACGAATTCGCGACC</u> <u>CTGGTTTTTTCACAACACCCTGGCCGCGAATAGTCAGGTTG</u> <u>AGAATGTAACCTTTCATACCCAGTGGACGGTCGATGAAG</u> <u>AAATCCAGGTAGCCGTTAGCCTCGATCGGGGTCAGACCC</u> <u>GCCACAAGGTGTGCATTGAAGGAATAGCCCGGCAGCAGC</u> <u>GGATCGTTCTGTGCTTCTGCCATCTTAGTAAGTCTTTTTTC</u> <u>CTTAGTGTCTCCTGCTAGCACAAATCCCTAGGACTGAGCTAG</u> <u>CTGTCAAAGAAAAAGAAAAAACACCCGTTAGGGTGTTTTAGTT</u> <u>AGATCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATT</u> <u>GCCGTC</u><u>ACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCCAAC</u> <u>CGGTAACCCCGCTTATTA</u><u>AAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGA</u> <u>CCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGCTATAATC</u> <u>ACGGCAGAAAAGTCCACATTG</u><u>AttatttgcacggcgacacattTGCTAT</u> <u>GCCATAGCATT</u><u>TTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCAGCCTG</u> <u>ACGCTTTTTTTCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGAGC</u> <u>TGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGAC</u> <u>GAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAAACAAACCCCACT</u> <u>AAGATAA</u><u>CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA</u> <u>GATATACAT</u><u>ATGAAAGCTAAAGATGTT</u><u>CAGCCAACCATTA</u> <u>TTATTAATAAAAAATGGCCTTATCTCTTTGGAAGATATCTA</u> <u>TGACATTGCGATAAAACAAAAAAAAGTAGAAATATCAAC</u> <u>GGAGATCACTGAACTTTTGACGCATGGTCGTGAAAAATT</u> <u>AGAGGAAAAATTAAATTCAGGAGAGGTTATATATGGAAT</u> <u>CAATACAGGATTTGGAGGGAATGCCAATTTAGTTGTGCC</u> <u>ATTTGAGAAAAATCGCAGAGCATCAGCAAAATCTGTTAAC</u> <u>TTTTCTTTCTGCTGGTACTGGGACTATATGTCCAAACCTT</u>	

	GTATTAAAGCGTCACAATTTACTATGTTACTTTCTGTTTGC AAAGGTTGGTCTGCAACCAGACCAATTGTCGCTCAAGCA ATTGTTGATCATATTAATCATGACATTGTTCCCTCTGGTTCC TCGCTATGGCTCAGTGGGTGCAAGCGGTGATTTAATTCCT TTATCTTATATTGCACGAGCATTATGTGGTATCGGCAAAG TTTATTATATGGGCGCAGAAATTGACGCTGCTGAAGCAAT TAAACGTGCAGGGTTGACACCATTATCGTTAAAAGCCAA AGAAGGTCTTGCTCTGATTAACGGCACCCGGGTAATGTC AGGAATCAGTGCAATCACCGTCATTAACTGGAAAACT ATTTAAAGCCTCAATTTCTGCGATTGCCCTTGCTGTTGAA GCATTACTTGTCATCTCATGAACATTATGATGCCCGGATTC AACAAGTAAAAAATCATCCTGGTCAAAACGCGGTGGCAA GTGCATTGCGTAATTTATTGGCAGGTTCAACGCAGGTAA TCTATTATCTGGGGTTAAAGAACAAGCCAATAAAGCTTGT CGTCATCAAGAAATTACCCAATAAATGATACCTTACAG GAAGTTTATTCAATTCGCTGTGCACCACAAGTATTAGGTA TAGTGCCAGAATCTTTAGCTACCGCTCGGAAAATATTGGA ACGGGAAGTTATCTCAGCTAATGATAATCCATTGATAGAT CCAGAAAATGGCGATGTTCTACACGGTGGAAATTTTATG GGGCAATATGTCGCCCCGAACAATGGATGCATTAAACTG GATATTGCTTTAATTGCCAATCATCTTCACGCCATTGTGG CTCTTATGATGGATAACCGTTTCTCTCGTGGATTACCTAA TTCCTGAGTCCGACACCCGGCATGTATCAAGGTTTTAAA GGCGTCCAACCTTTCTCAAACCGCTTTAGTTGCTGCAATTC GCCATGATTGTGCTGCATCAGGTATTCATACCCTCGCCAC AGAACAATACAATCAAGATATTGTCAGTTTAGGTCTGCAT GCCGCTCAAGATGTTTTAGAGATGGAGCAGAAATTACGC AATATTGTTTCAATGACAATTCTGGTAGTTTGTGAGGCCA TTCATCTTCGCGGCAATATTAGTGAAATTGCGCCTGAAAC TGCTAAATTTTACCATGCAGTACGCGAAATCAGTTCTCCT TTGATCACTGATCGTGCCTGGATGAAGATATAATCCGCA TTGCGGATGCAATTATTAATGATCAACTTCCTCTGCCAGA AATCATGCTGGAAGAATAA	
AraC optimizado por codones (orientación inversa)	TTACTCGCAACCCGCACGGAACCTCGGATGGGGACGCGCC CGTGCAATTTTTGAAAACGCGGGAGAAGTACAGCTGGTC ATCGAAGCCAACGTTACGACCGACGGTCGCGATCGGCAT GCGGGTGGTAGACAGCAGCAGCTTAGCCTGGCTGATGCG CTGGTCTTCACGCCAAGACAGCAGCTAATACCAAGCTG CTGACGGAACAGGTGGGACAGACGGCTCGGACTCAGGCA CACGTGCTGTGCAACAGACGCAATATCAAAGTTGCTATC CGCCAGATGGTCGCTGATGTACTGGCAAGCCTCGCGCAC GCGGTTGTCCATCGGTGGGTGGAGACTTTCGTTGATCGCT TCCATACGACGCAGCAGCAGCTGTTCCAGCAGGTTGATC GCCAGCAGTTCGCTGTAGCGGCCTTACCCTGACCGGCAT TGATAATCTGACCGAACAGATCGCTGAAGTGCGGCTGGT GAGCTTCATCCGGGCGGAAAAAACAGTGTTTGCAAAGA TAGACGGCCAGTTCAGCCACTCATGCCAGTAAGCACGAG GGCGGAAGTATACCACTGGTGATAACATTCATGCGCCTC CGGATGACGGCCGTAGTGATGGATTTACCCGGCGGAAA	115

	TAACAGAATATCACCAGGACGACAAACGAATTCGCGACC CTGGTTTTTTCACAACACCCTGGCCGCGAATAGTCAGGTTG AGAATGTAACTTTTCATACCCAGTGGACGGTCGATGAAG AAATCCAGGTAGCCGTTAGCCTCGATCGGGGTCAGACCC GCCACAAGGTGTGCATTGAAGGAATAGCCCGGCAGCAGC GGATCGTTCTGTGCTTCTGCCAT	
Promotor inducible por arabinosa	CTTAGTAAGCTCCTTTTTCTTAGTGTCTCCTGCTAGCAC AATCCCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAAGAAAAGAAAA ACACCCGTTAGGGTGTTTTTAGTTAGATCAGAGAAGAAA CCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCAGTGCCT CTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCCAACCGGTAACCCCG CTTATTAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACCAAAGCC ATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGC AGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTT GCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCC AGCCTGACGCTTTTTTTCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCAT ACCCGAGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGT CCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAA AACAACACCCACTAAGATAA	116
Promotor PssB	TCACCTTTCCCGGATTAAACGCTTTTTTGGCCGGTGGCAT GGTGCTACCGGCGATCACAAACGGTTAATTATGACACAA ATTGACCTGAATGAATATACAGTATTGGAATGCATTACCC GGAGTGTTGTGTAACAATGTCTGGCCAGGTTTGTTCCTCG GAACCGAGGTCACAACATAGTAAAAGCGCTATTGGTAAT GGTACAATCGCGCGTTTACACTTATTC	117

Ejemplo 54. Actividad de las cepas

La actividad de SYN-707, SYN-PKU710 y SYN-PKU708 se midió *in vitro*. Los resultados se informan en la Tabla 83.

Para SYN-PKU710, las células se cultivaron hasta una DO de 0,2 en medios de fermentación y se indujeron mediante la adición de IPTG 1 mM durante una hora. A continuación, se añadió arabinosa al 0,009 % de concentración final. Las células se indujeron durante otras 4 horas. Para SYN-PKU708 y SYN-PKU707, las células se cultivaron hasta una DO de 0,2 en medios de fermentación y se indujeron mediante la adición de arabinosa a una concentración final del 0,15 % durante 4 horas. En presencia de oxígeno (agitación), se observan altos niveles de actividad que no están limitados por oxígeno, glucosa, pH o sustrato. En condiciones microaerobias (incubación estática), la actividad de LAAD depende del oxígeno. Los resultados se informan en la Tabla 83.

Tabla 83. Tabla de actividad de las cepas

	Actividad de PAL (umol/he/1e9 ufc)		Actividad de LAAD (umol/he/1e9 ufc)		Degradación total de Phe (umol/he/1e9 ufc)	
	estática (micro)	+O2	estática (micro)	+O2	estática (micro)	+O2
SYN- PKU707	4,09 ± 0,53	4,37 ± 0,69	0	0	4,1	4,4
SYN- PKU710	1,83 ± 0,13	2,41 ± 0,24	7,56 ± 0,93	31,23 ± 4,94	9,9	33,7

SYN- PKU708	NT	3,67 0,27	+	8,11 1,22	±	47,81 3,41	±	NT	51,5

Ejemplo 55. clbA de tipo natural y desactivación de clbA

Tabla 84. clbA de tipo natural y desactivación de clbA

clbA de tipo natural (SEQ ID NO: 118)	caaatatcacataatcttaacatatcaataaacacagtaaagtttcatgtgaaaaacatcaaacataaaata caagctcggaaacgaatcacgctatacacattgctaacaggaatgagattatctaaatgaggattgatat attaatggacatactagttttttcatcaaaccagtagagataaacttccttactatctcaatgaggaagaaa taaaacgctatgatcagtttcatgttgagtgataaagaactctatatttaagccgtatcctgctcaaaaca gcactaaaaagatatcaacctgatgtctcattacaatcatggcaatttagtacgtgcaaatatggcaaac atttatagttttctcagttggcaaaaaagattttttaacctttccatactatagatacagtagccgttgc attagtctcactgcgagcttggtgctgatattgaacaaataagagatttagacaactcttctgaatatca gtcagcattttttactccacaggaagctactaacatagtttacttctcgttatgaaggtaactactttttg gaaaatgtggacgctcaaagaagcttacatcaaatatcgaggtaaaggcctatctttaggactggattgt attgaatttcatttaacaaataaaaaacttaactcaaaatatagaggttcacctgtttatttctctcaatggaaa atatgtaactcatttctgcattagccttccactcatcacccctaaaataactattgagctatttctatgca gtcccaactttatcaccagactatcagctaattcattcgtcaaatgggcagaattgaatcgccacggata atctagacacttctgagccgtcgataatattgattttcatattccgtcgggtggtgaagtatccgcataatc gtgccattcacatttag
Desactivación de clbA (SEQ ID NO: 119)	ggatgggggaaacatggataagttcaagaaaaaaacccgttatctctcgtgaaagacaagtattgc gcatgctggcacaaggtgatgagtactctcaaatatcacataatcttaacatatcaataaacacagtaaag tttcatgtgaaaaacatcaaacataaaatacaagctcggaaacgaatcacgctatacacattgctaacag gaatgagattatctaaatgaggattgaTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTT CCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCG GAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGtcgtcaaatgggcagaattgaa tcgccacggataatctagacacttctgagccgtcgataatattgattttcatattccgtcgggtg

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria manipulada genéticamente que comprende:
 - 5 (a) uno o más genes que codifican una fenilalanina amonio liasa (PAL), donde el gen o genes que codifican la PAL están unidos de manera operativa a (i) un promotor termorregulado que no está asociado con el gen PAL en la naturaleza, o (ii) un promotor inducible por isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG);
 - 10 (b) uno o más genes que codifican un transportador de fenilalanina capaz de transportar fenilalanina a células bacterianas, donde el gen o genes que codifican el transportador de fenilalanina están unidos de manera operativa a un promotor inducible que no está asociado con el gen transportador de fenilalanina en la naturaleza.
- 15 2. La bacteria manipulada genéticamente de la reivindicación 1, que comprende además uno o más genes que codifican una L-aminoácido desaminasa (LAAD), donde el gen o genes que codifican LAAD están unidos de manera operativa a un promotor inducible que no está asociado con el gen LAAD en la naturaleza.
- 20 3. La bacteria manipulada genéticamente de la reivindicación 1 o 2, donde
 - (a) el promotor unido de manera operativa al gen o genes que codifican la PAL y el promotor unido de manera operativa al gen o genes que codifican el transportador de fenilalanina son copias separadas del mismo promotor; o
 - 25 (b) el gen o genes que codifican la PAL y el gen o genes que codifican el transportador de fenilalanina están unidos de manera operativa a la misma copia del mismo promotor.
- 30 4. La bacteria manipulada genéticamente de la reivindicación 2 o 3, donde:
 - (a) cada uno del gen o genes de PAL y el gen o genes de LAAD está unido de manera operativa a diferentes promotores; y/o
 - (b) el transportador de fenilalanina está unido de manera operativa a un promotor que es diferente del promotor que controla la expresión del gen o genes PAL y/o LAAD.
 - 35
- 40 5. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el promotor unido de manera operativa al gen o genes que codifican la PAL es un promotor termorregulado que no está asociado con el gen PAL en la naturaleza.
6. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el promotor unido de manera operativa al gen o genes que codifican la PAL es un promotor inducible por IPTG.
- 45 7. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el promotor unido de manera operativa al gen o genes que codifican el transportador de fenilalanina se selecciona de un promotor que se induce en condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias, un promotor termorregulado, y un promotor que se induce por arabinosa, IPTG, tetraciclina o ramnosa.
- 50 8. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, donde el promotor unido de manera operativa al gen o genes que codifican la LAAD se selecciona de un promotor que se induce en condiciones de bajo contenido de oxígeno o anaerobias, un promotor termorregulado, y un promotor que se induce por

arabinosa, IPTG, tetraciclina o ramnosa.

9. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7-8, donde el promotor termorregulado se induce a una temperatura entre 37 °C y 42 °C.
10. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7-9, donde el promotor termorregulado es un promotor inducible por lambda CI.
11. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, donde el gen o genes que codifican el transportador de fenilalanina y/o el gen o genes que codifican la LAAD están bajo el control de un promotor que se induce por arabinosa, IPTG, tetraciclina o ramnosa.
12. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, donde el gen o genes que codifican el transportador de fenilalanina y/o el gen o genes que codifican la LAAD están bajo el control de un promotor sensible al regulador de fumarato y nitrato reductasa (FNR) seleccionado de:
 - (a) un promotor seleccionado de *fnrS*, *nirB*, *ydfZ*, *pdhR*, *focA*, *ndH*, *hlyE*, *narK*, *narX*, *narG*, *yfiD*, *tdcD*;
 - (b) un promotor que comprende cualquiera de las SEQ ID NO 9 a 19 o un fragmento funcional de las mismas; o
 - (c) un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO 9 a 19.
13. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el gen o genes que codifican un transportador de fenilalanina, el gen o genes que codifican una PAL, y/o el gen o genes que codifican LAAD;
 - (a) se encuentran en un cromosoma en la bacteria; o
 - (b) se encuentran en un plásmido en la bacteria.
14. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la PAL procede de *Anabaena variabilis* (PAL1) o de *Photorhabdus luminescens* (PAL3).
15. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el transportador de fenilalanina es PheP.
16. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*.
17. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 donde la bacteria es la cepa Nissle de *Escherichia coli*.
18. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde la bacteria es un auxótrofo en ácido diaminopimélico o en timidina.
19. La bacteria manipulada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones

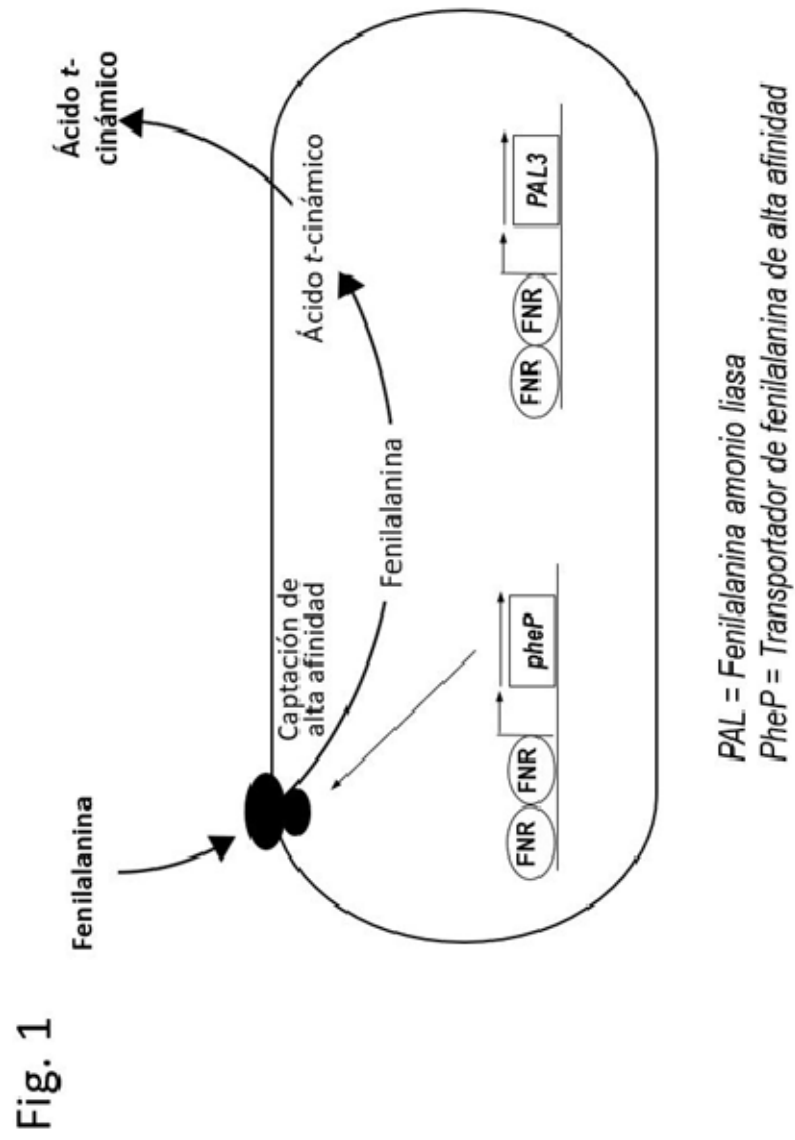
1-18, donde la bacteria se manipula además para albergar un gen que codifica una sustancia tóxica para la bacteria, donde el gen está bajo el control de un promotor inducible.

- 5 20. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende la bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1-19; y un portador farmacéuticamente aceptable.

21. La composición de la reivindicación 20 formulada para administración oral.

- 10 22. La composición de la reivindicación 20 o 21 para su uso en un procedimiento para reducir la hiperfenilalaninemia o tratar una enfermedad asociada con la hiperfenilalaninemia.

- 15 23. La composición para su uso según la reivindicación 22, donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: fenilcetonuria, fenilcetonuria clásica o típica, fenilcetonuria atípica, hiperfenilalaninemia leve permanente, hiperfenilalaninemia no fenilcetonúrica, deficiencia de fenilalanina hidroxilasa, deficiencia de cofactor, deficiencia de dihidropteridina reductasa, deficiencia de tetrahidropterina sintasa, enfermedad de Segawa y enfermedad hepática.



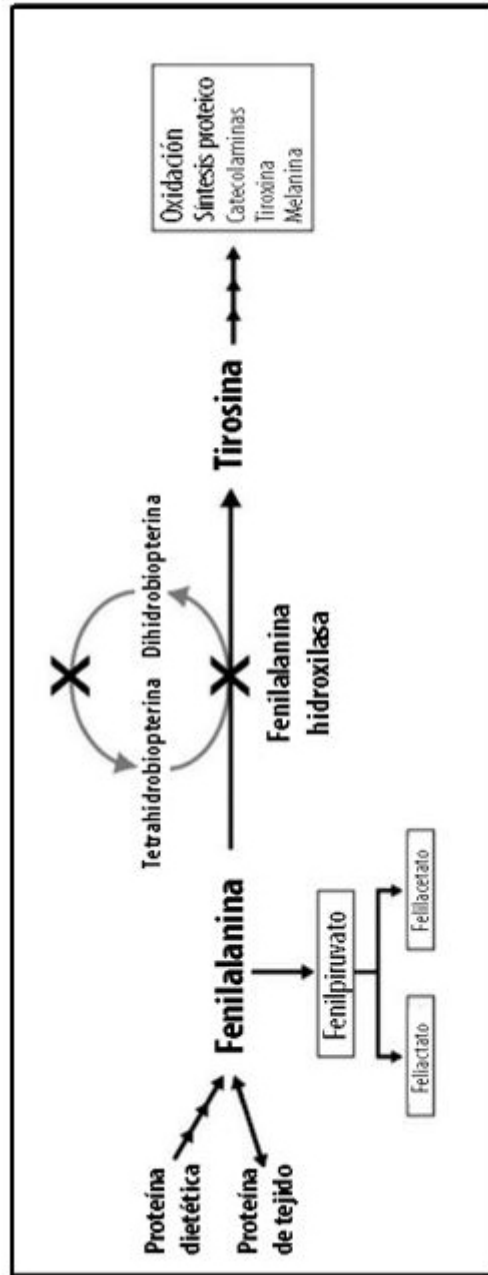


Fig. 2A

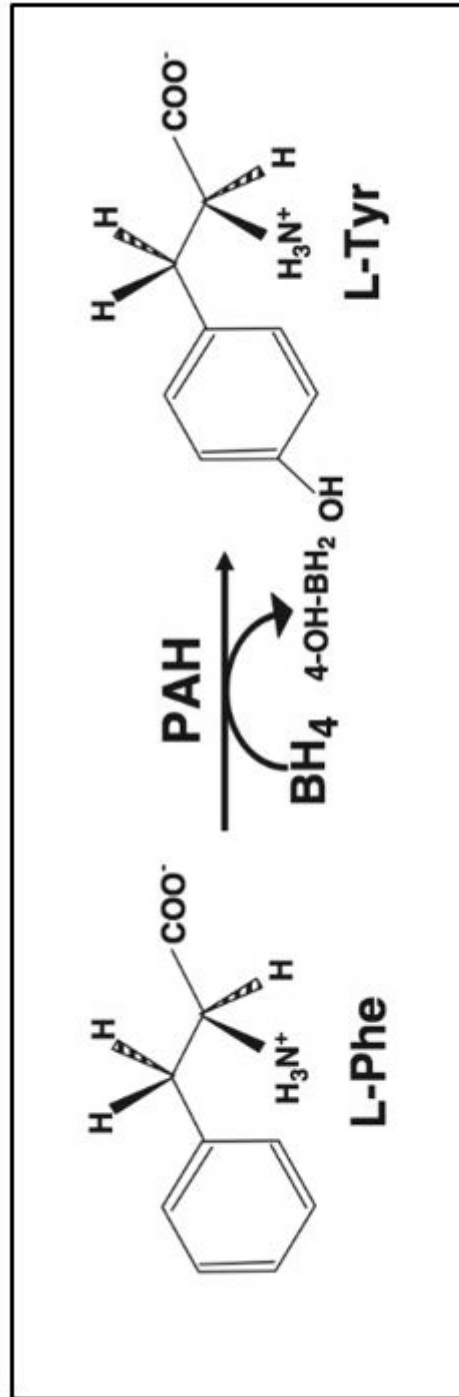


Fig. 2B

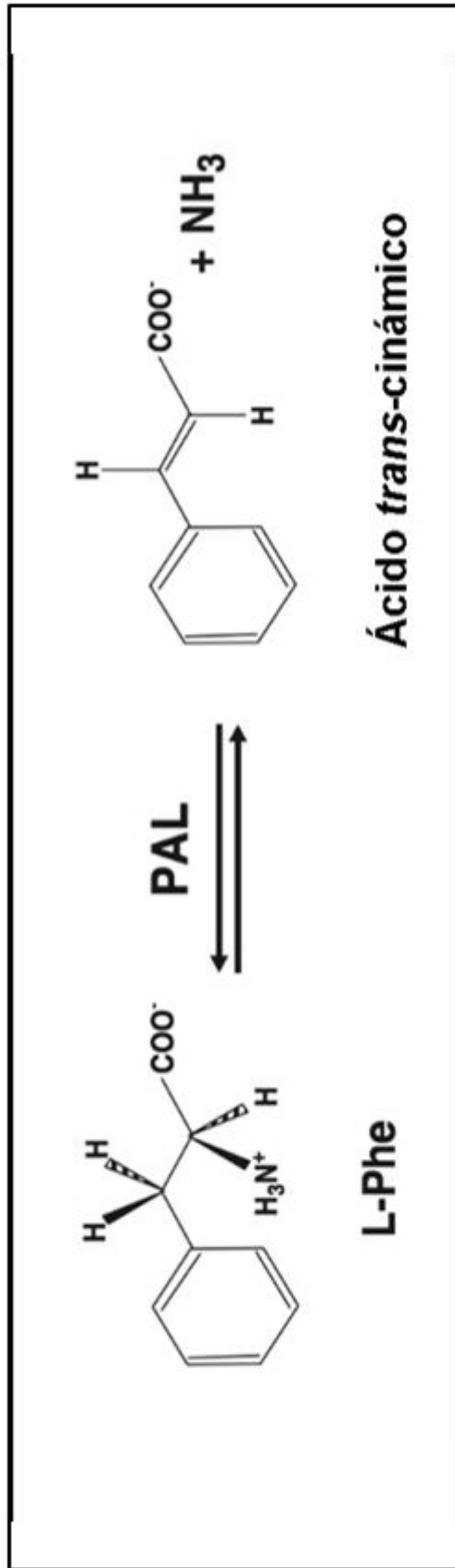


Fig. 2C

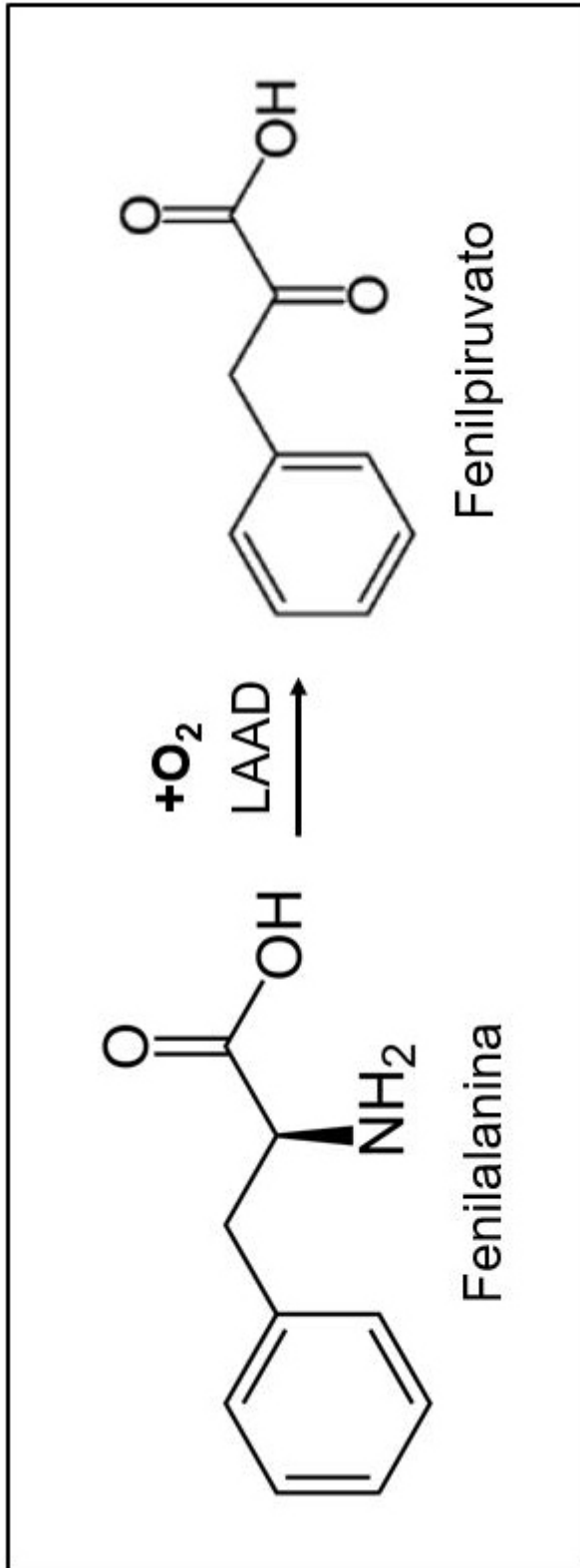


Fig. 2D

Fig. 4

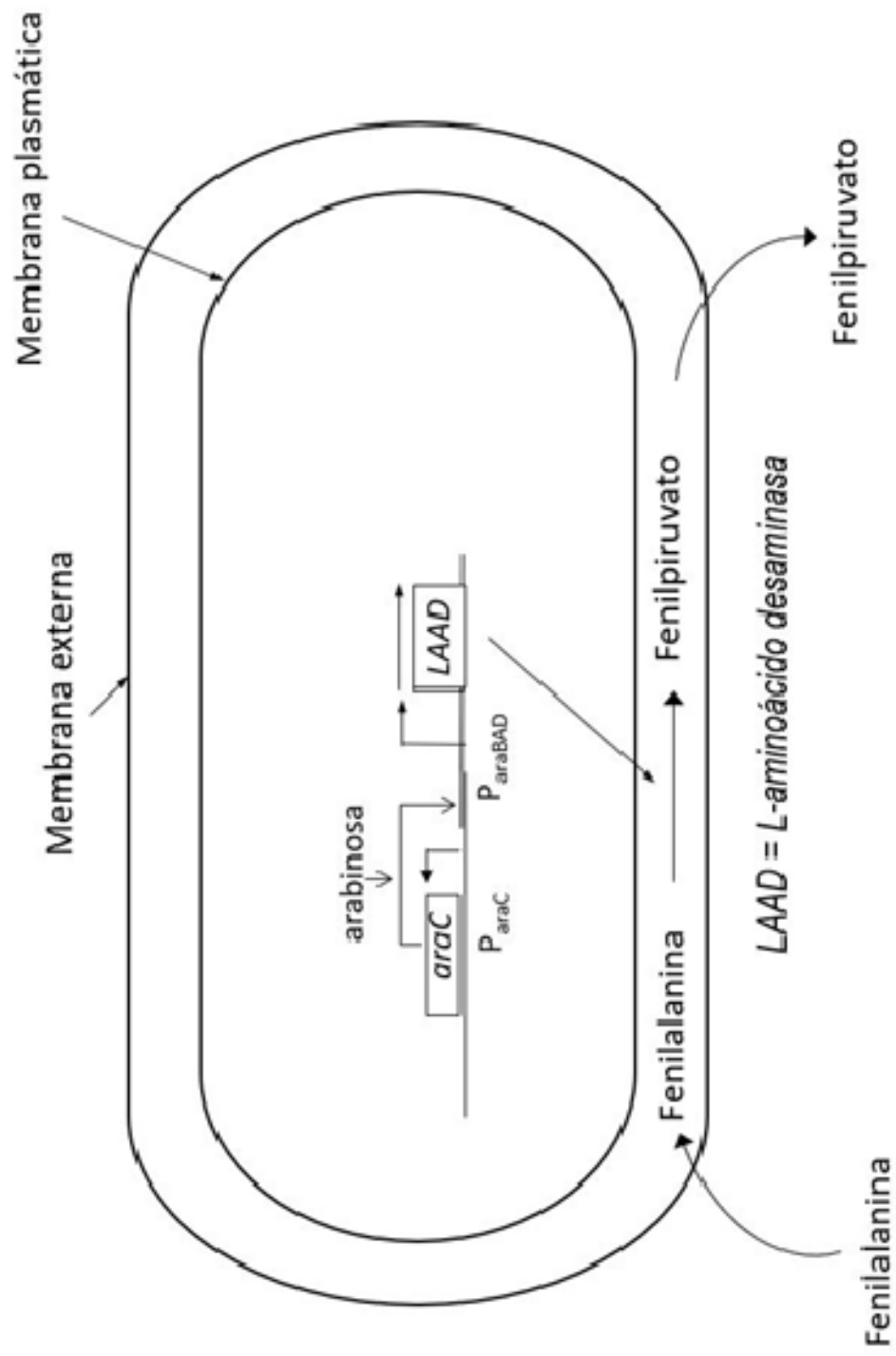


Fig. 5

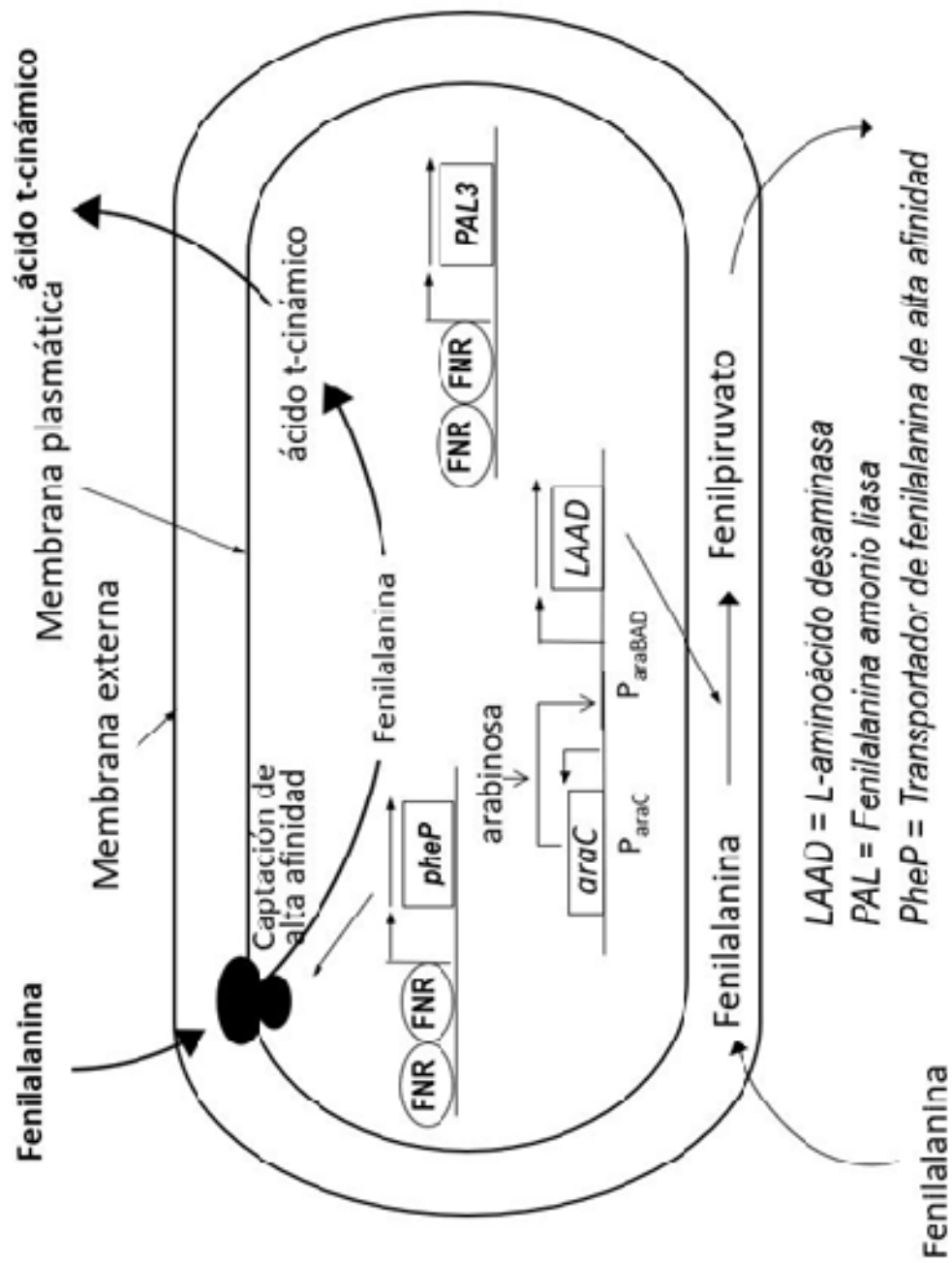
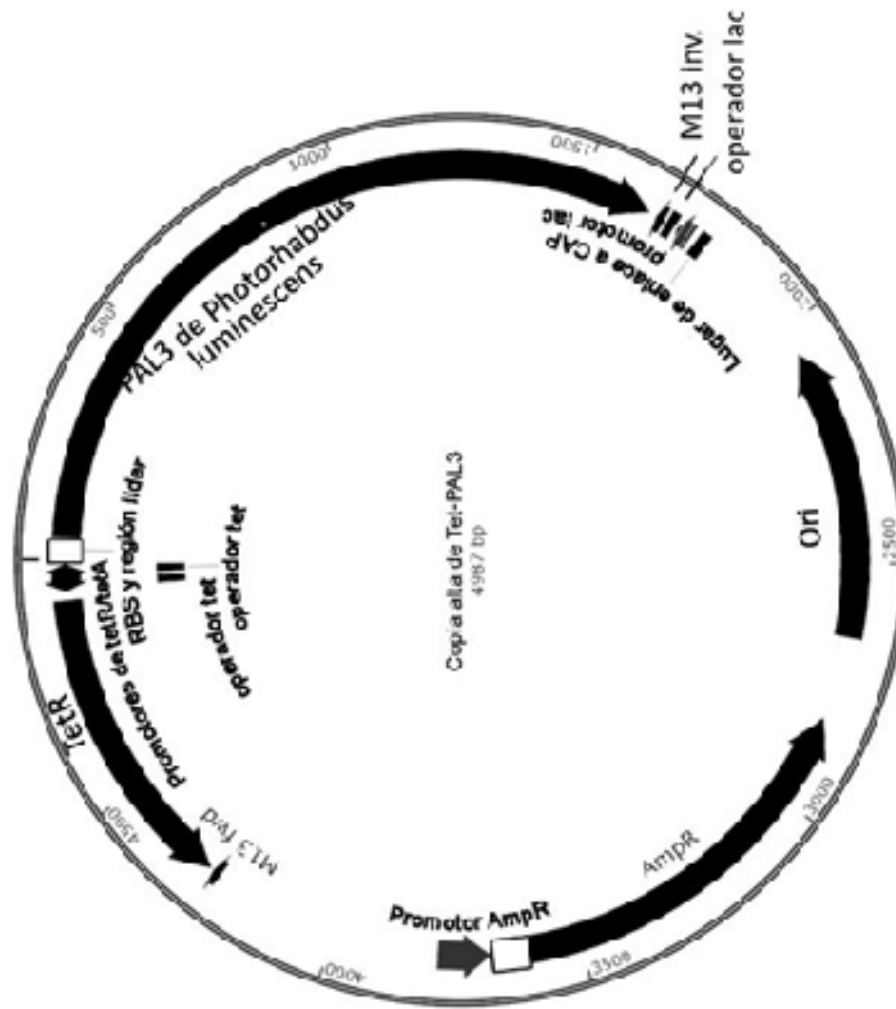


Fig. 6



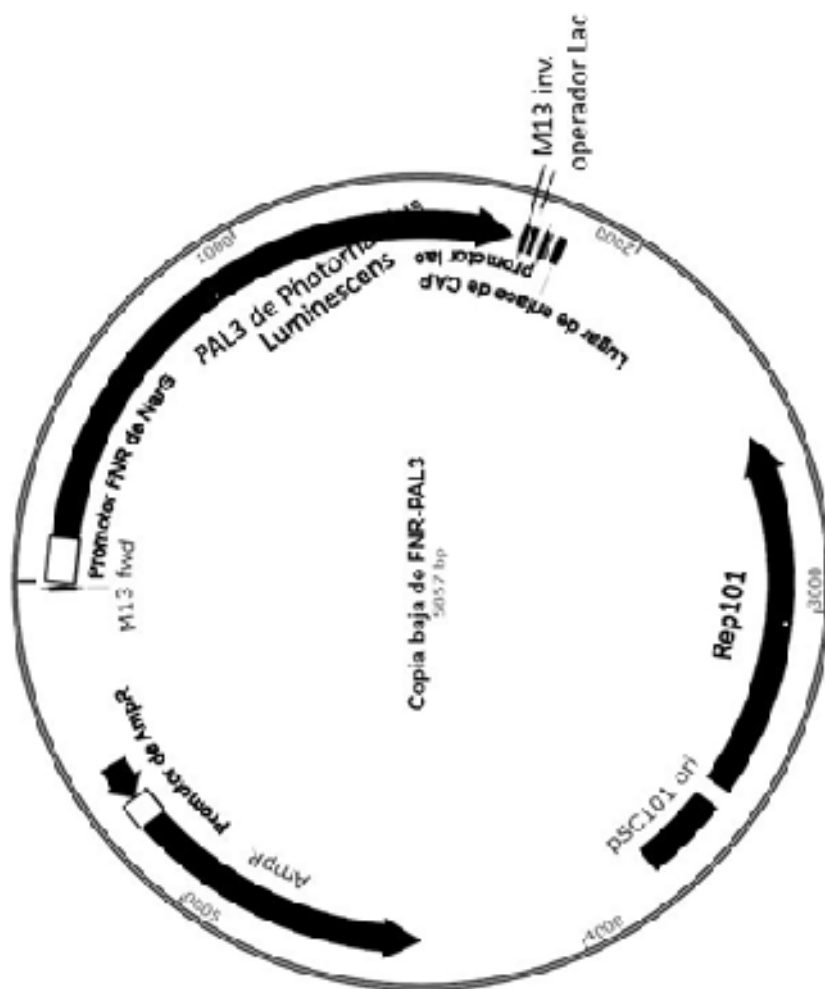


Fig. 7

Fig. 8

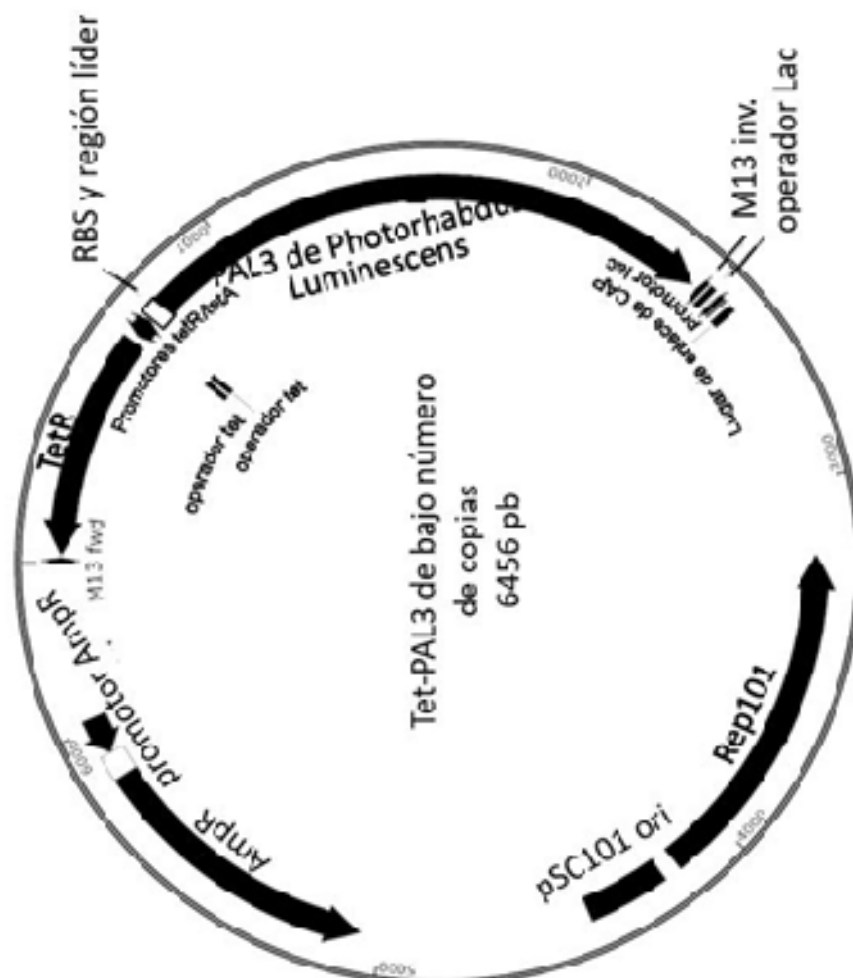


Fig. 9

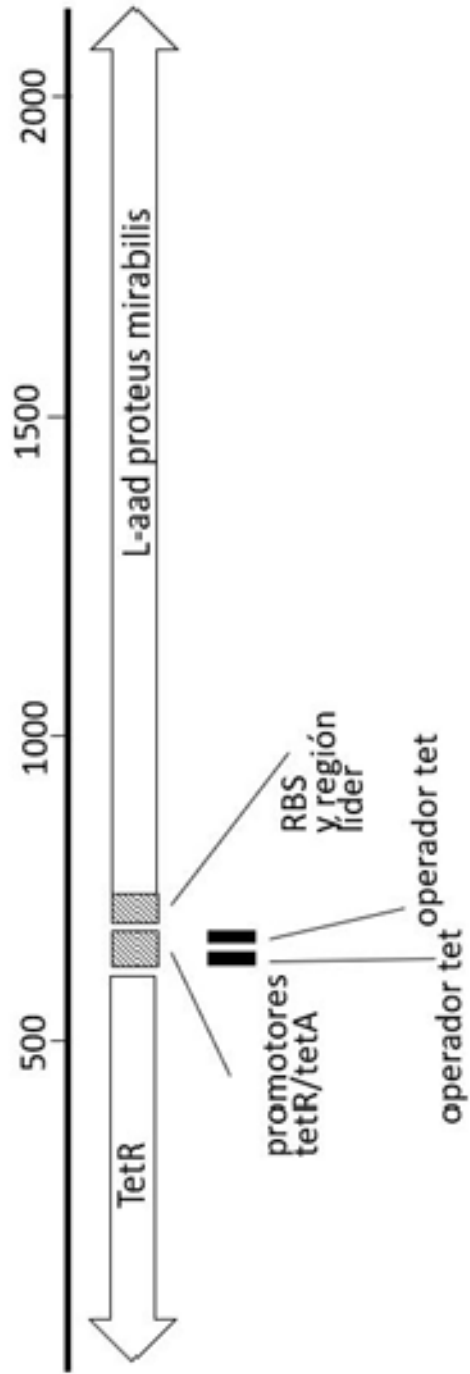


Fig. 10

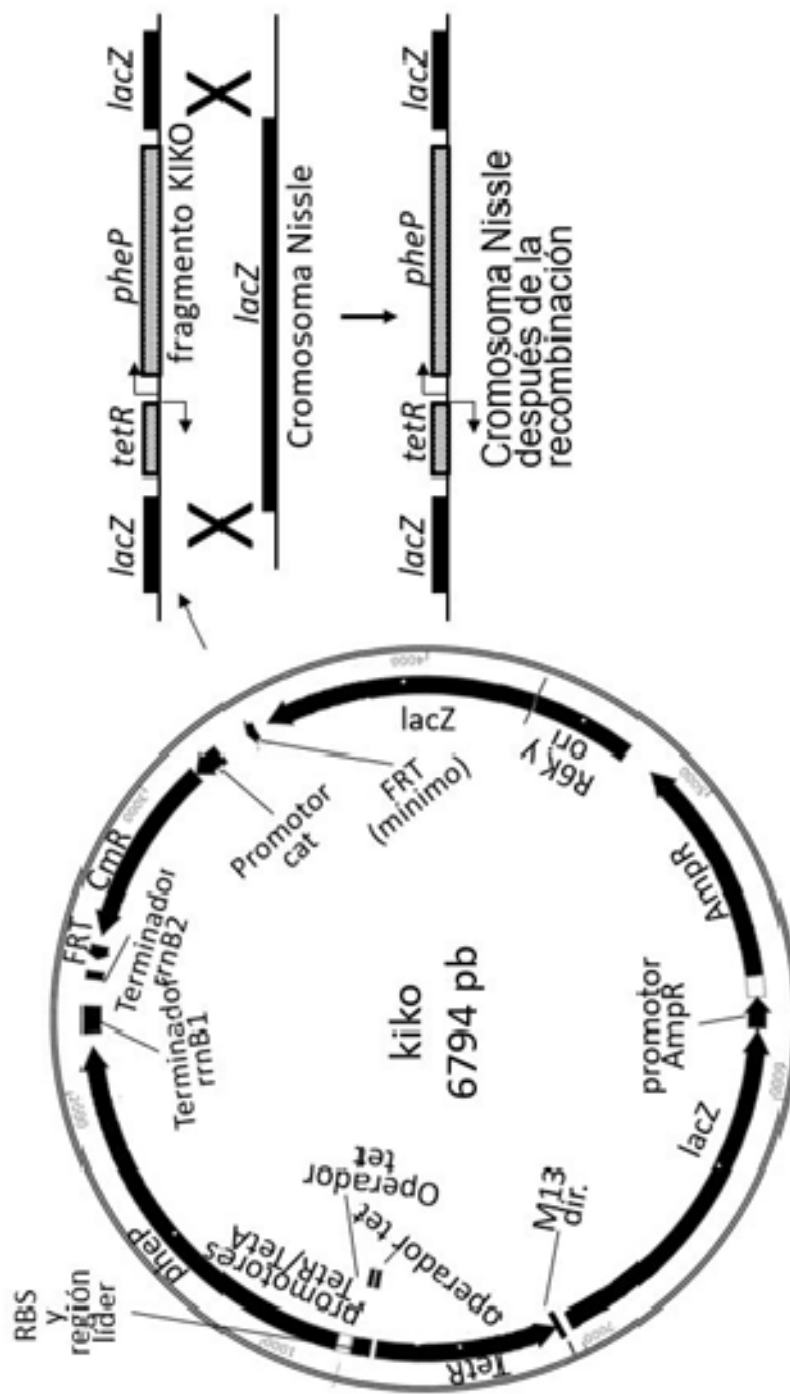
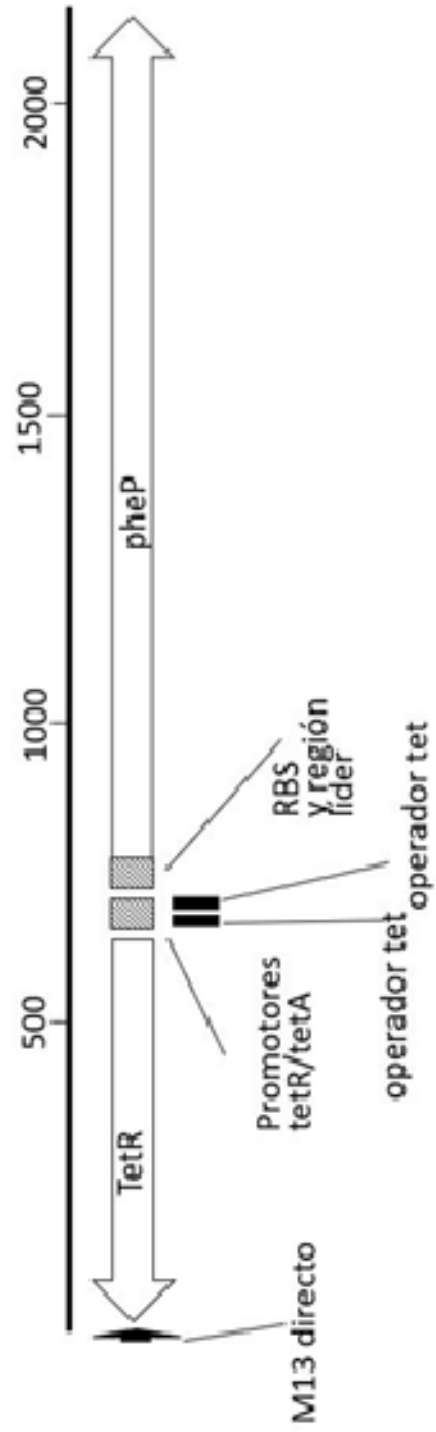
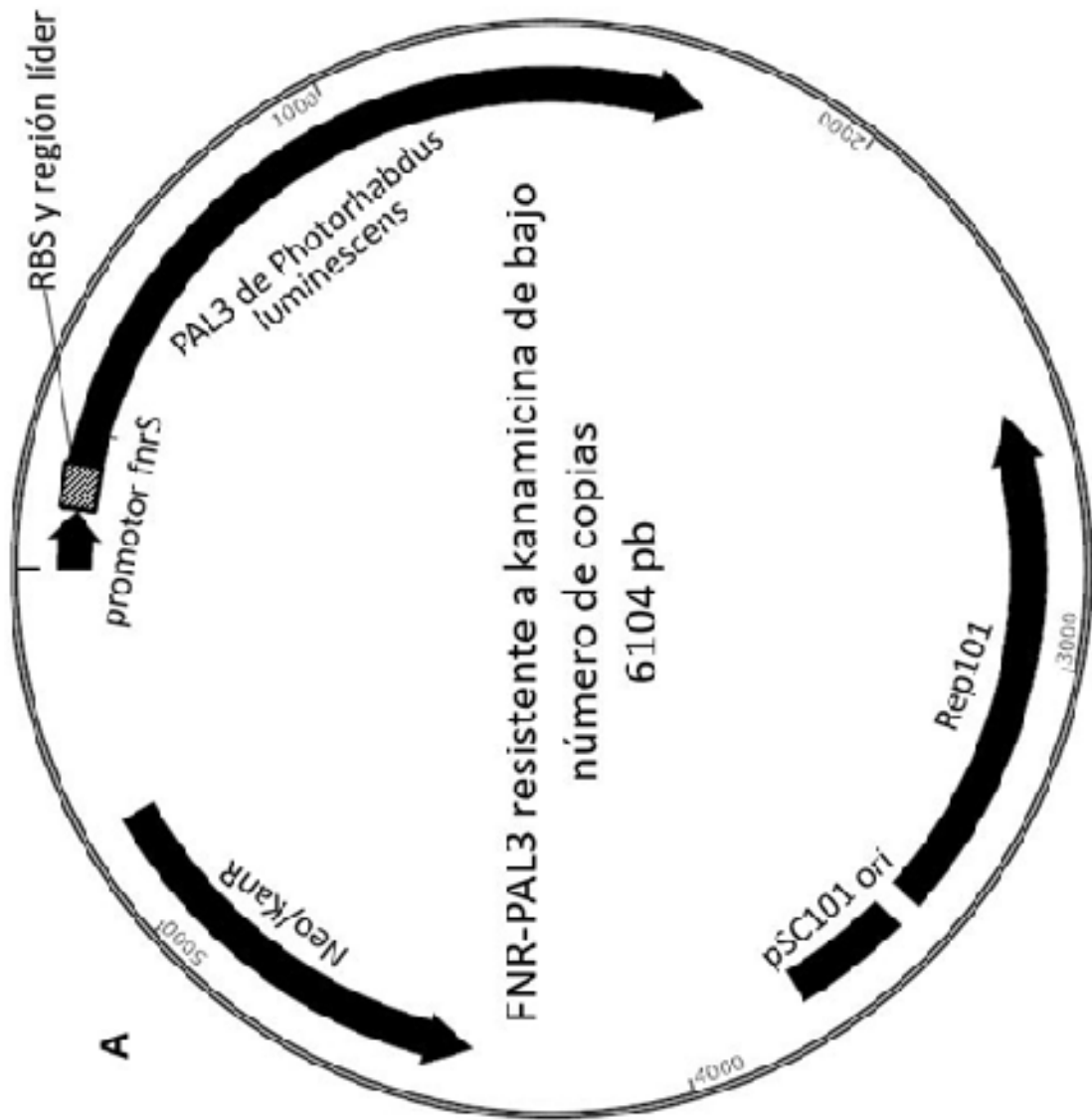


Fig. 11



Figs. 12A



Figs. 12B

B

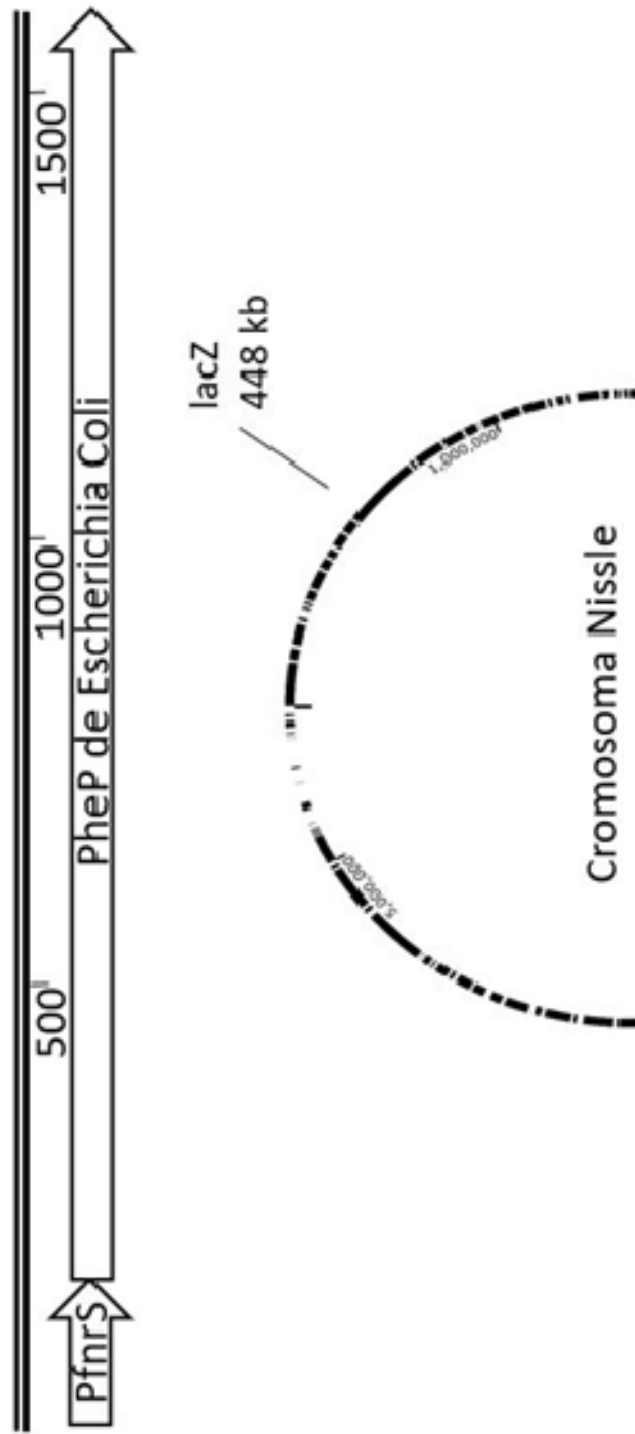


Fig. 13A

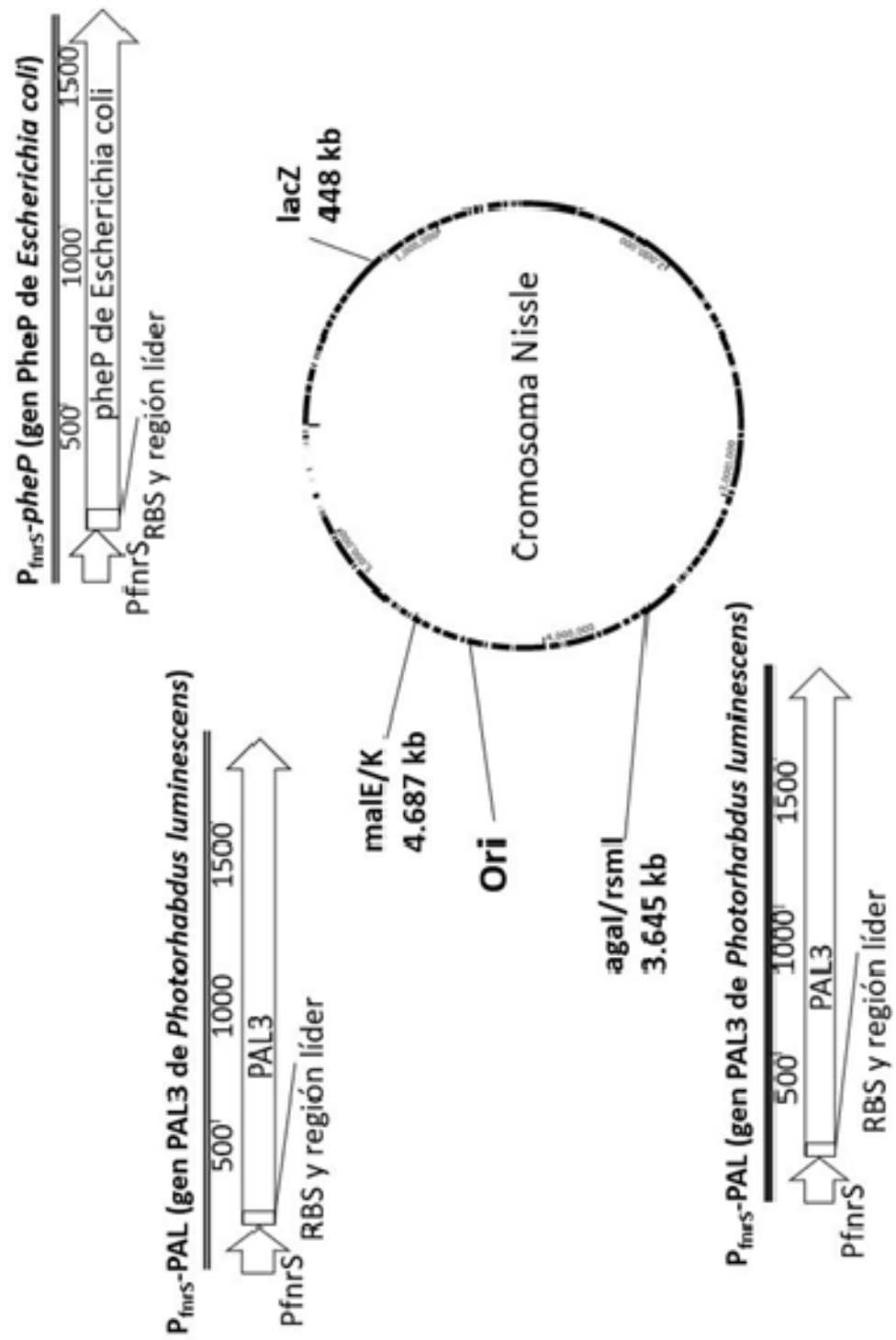


Fig. 13B

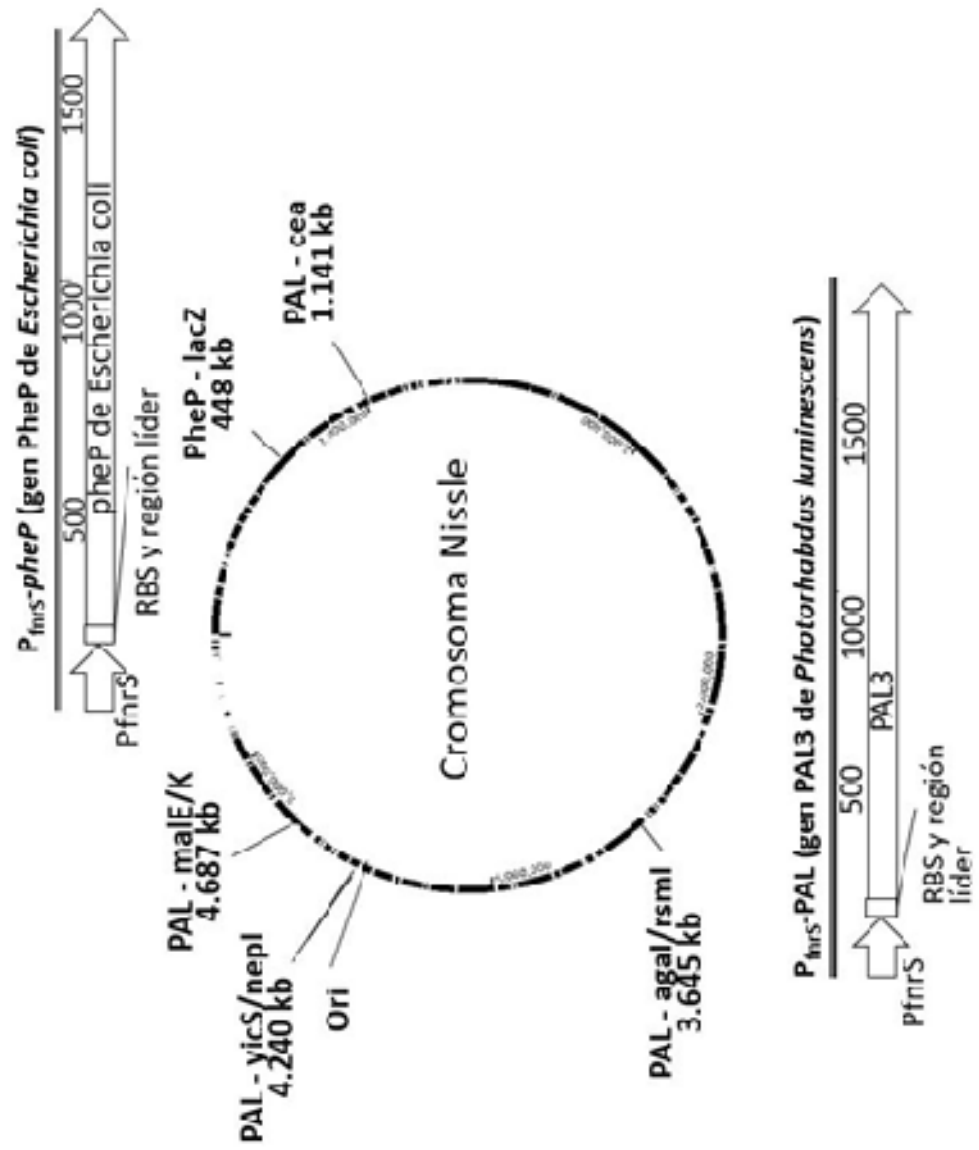


Fig. 13C

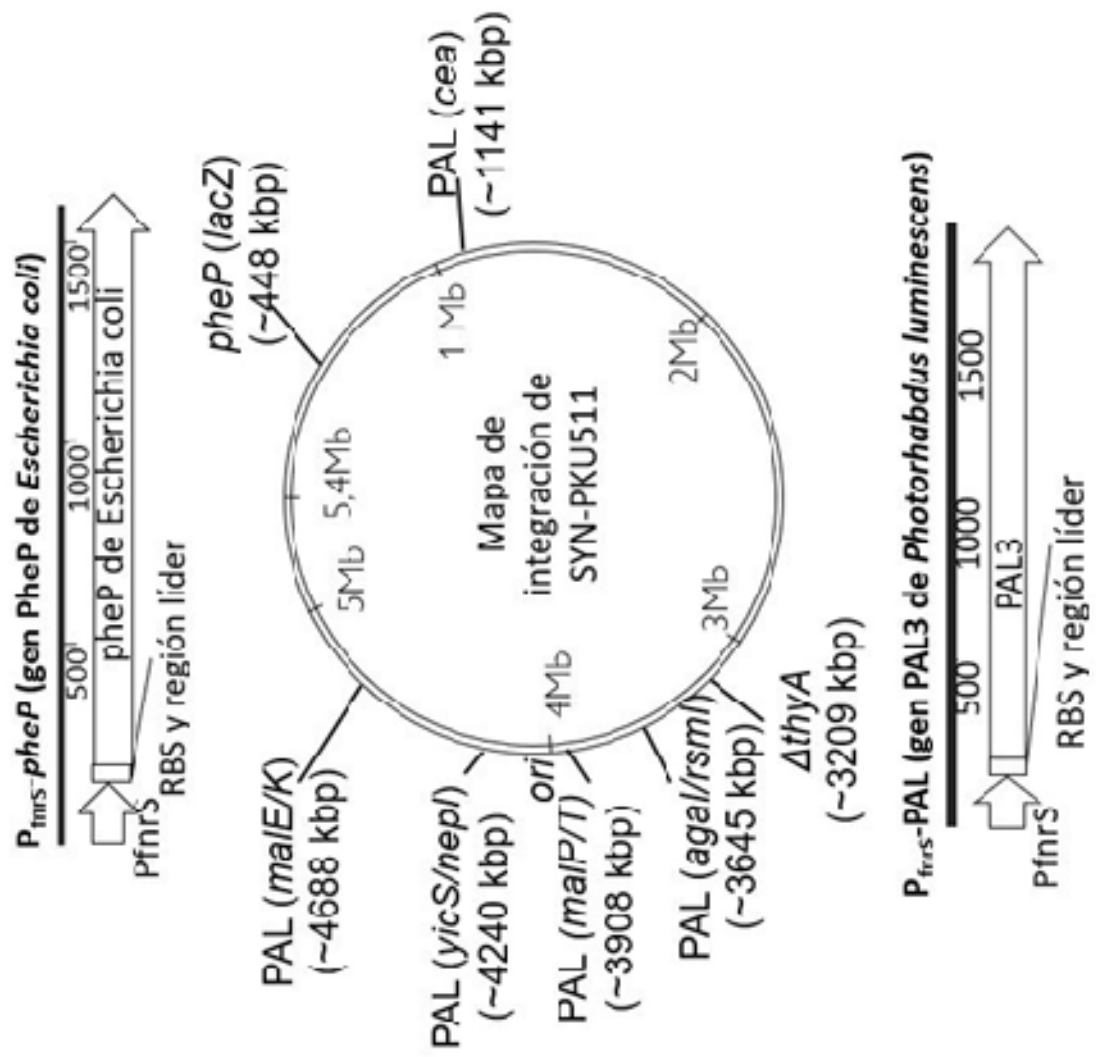


Fig. 14

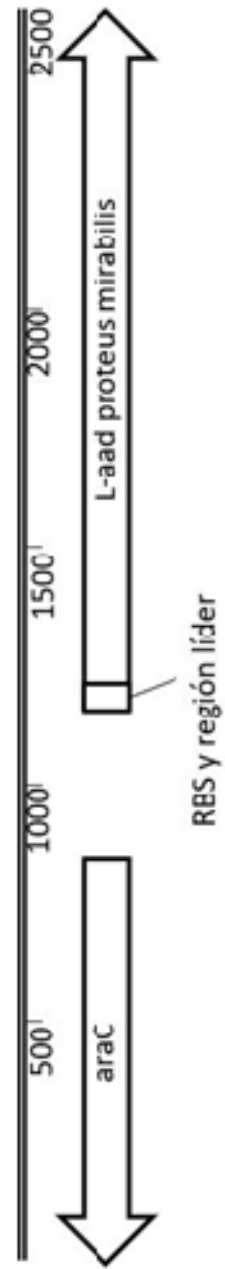


Fig. 15A

A

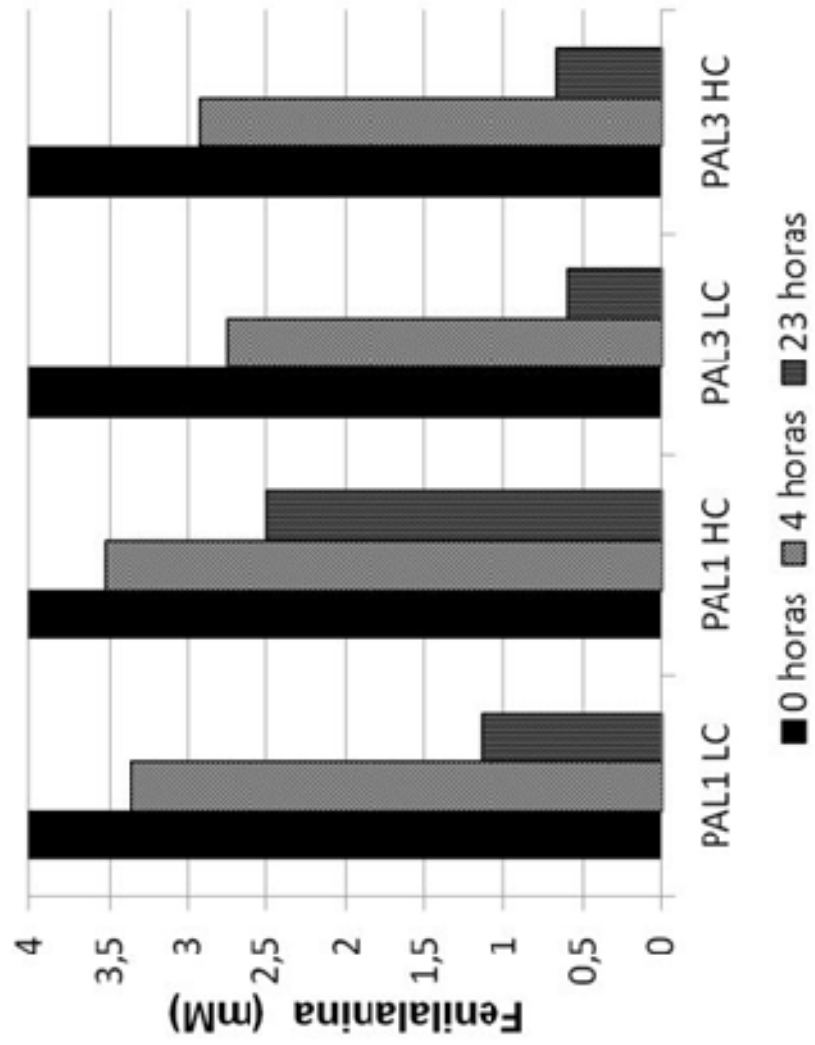


Fig. 15B

B

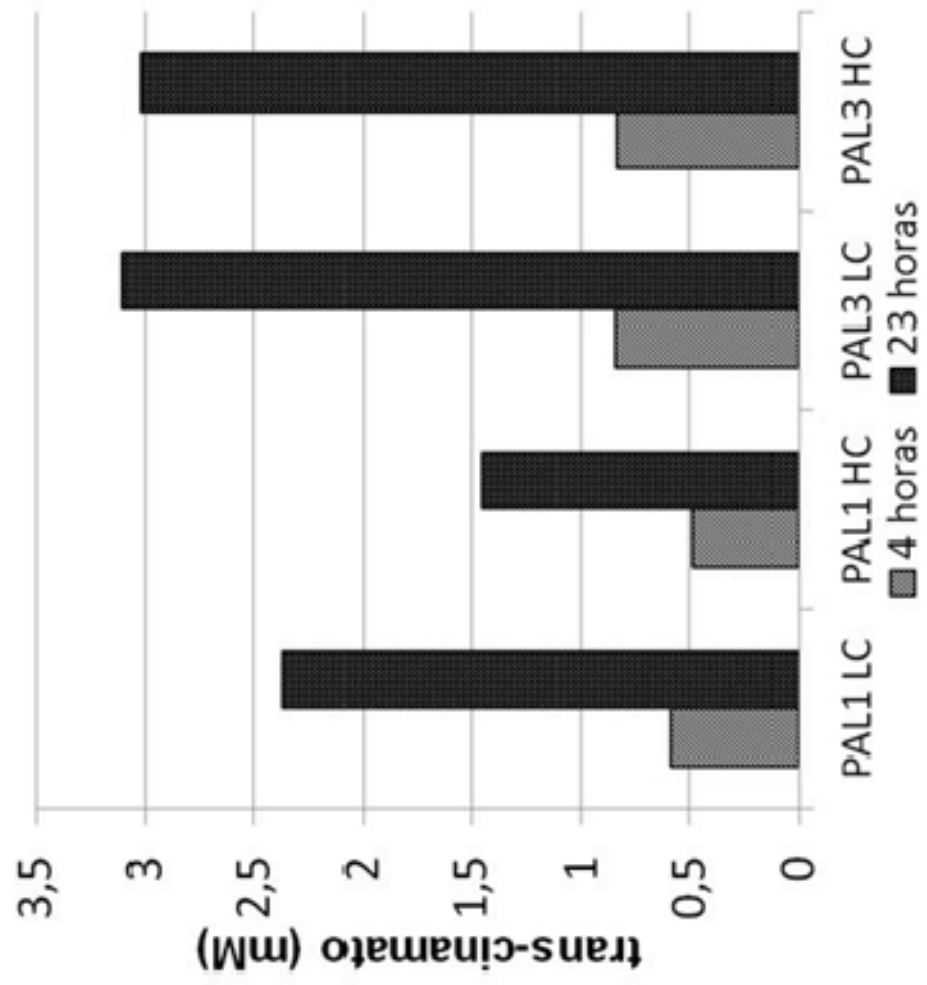
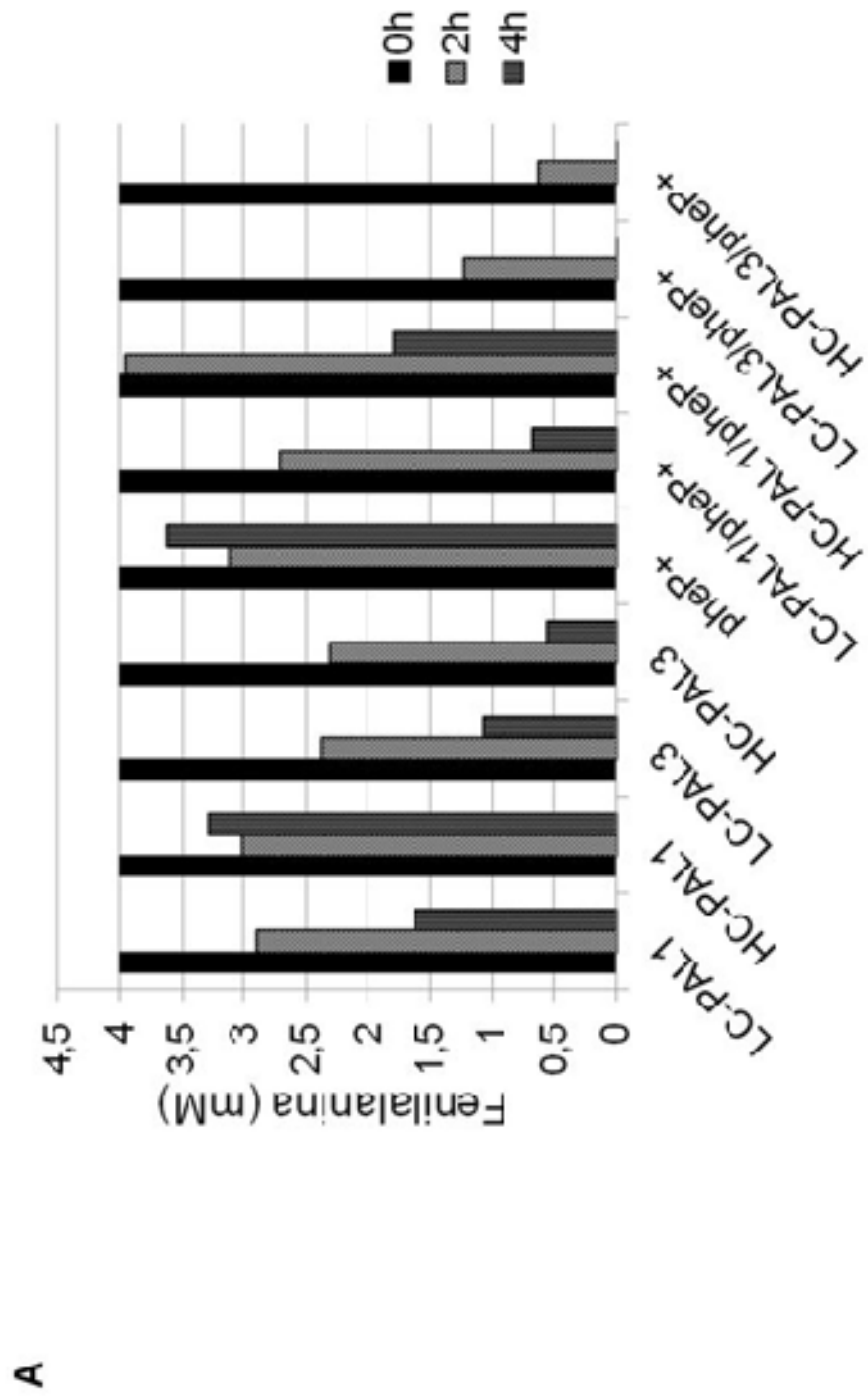
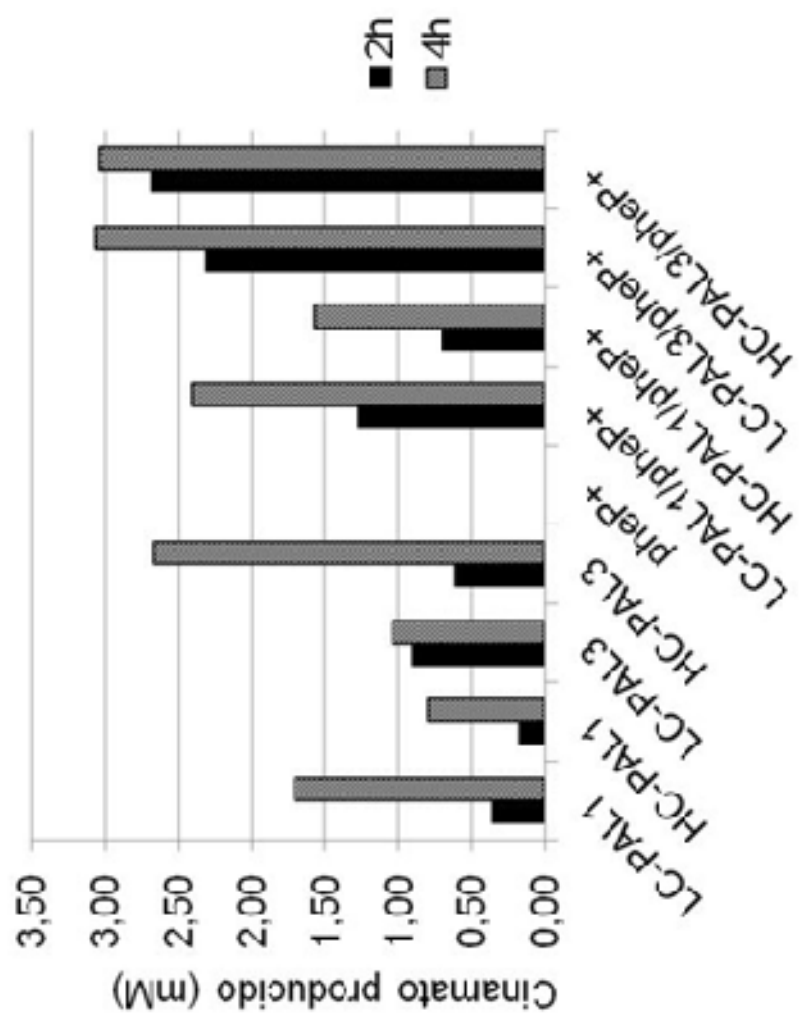


Fig. 16A



Figs. 16B

B



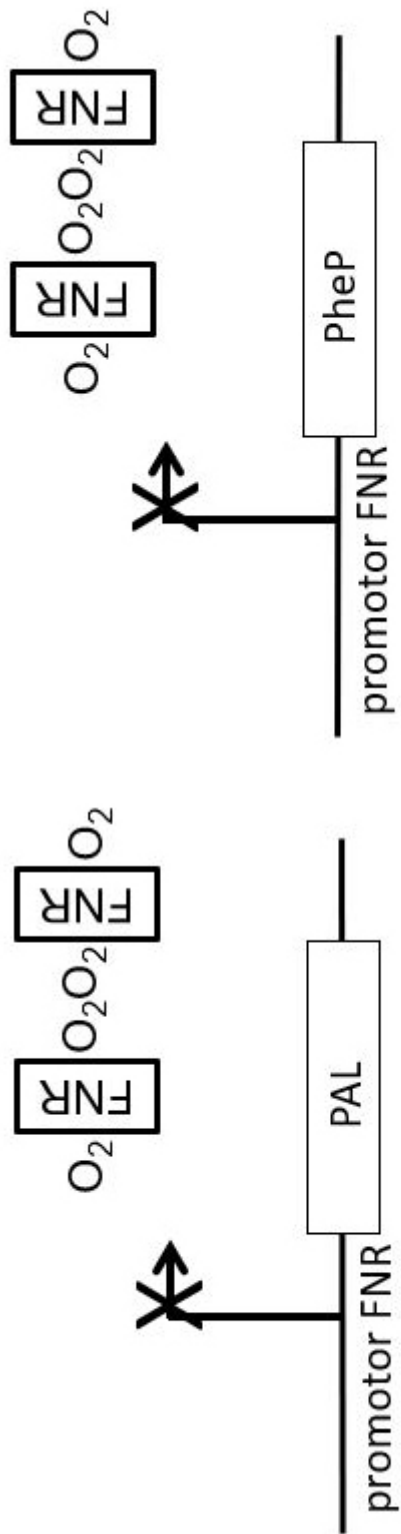


Fig. 17A

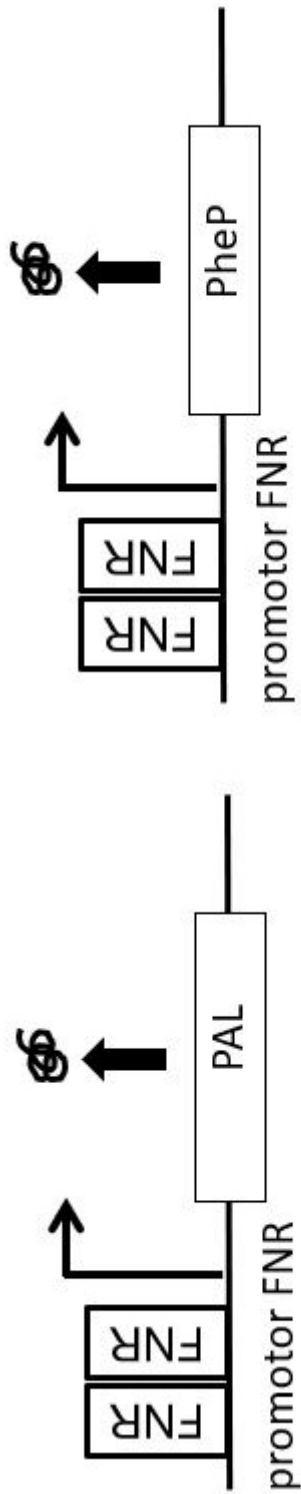


Fig. 17B

Fig. 18

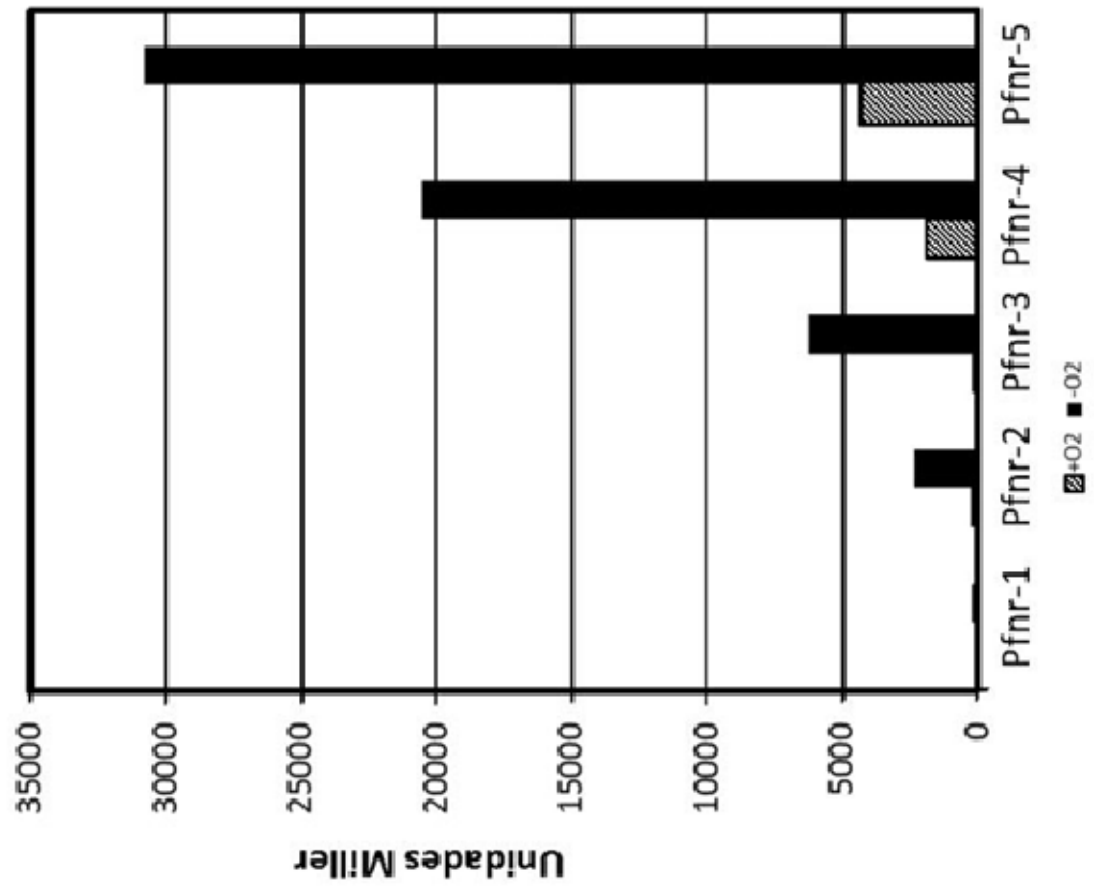


Fig. 19A

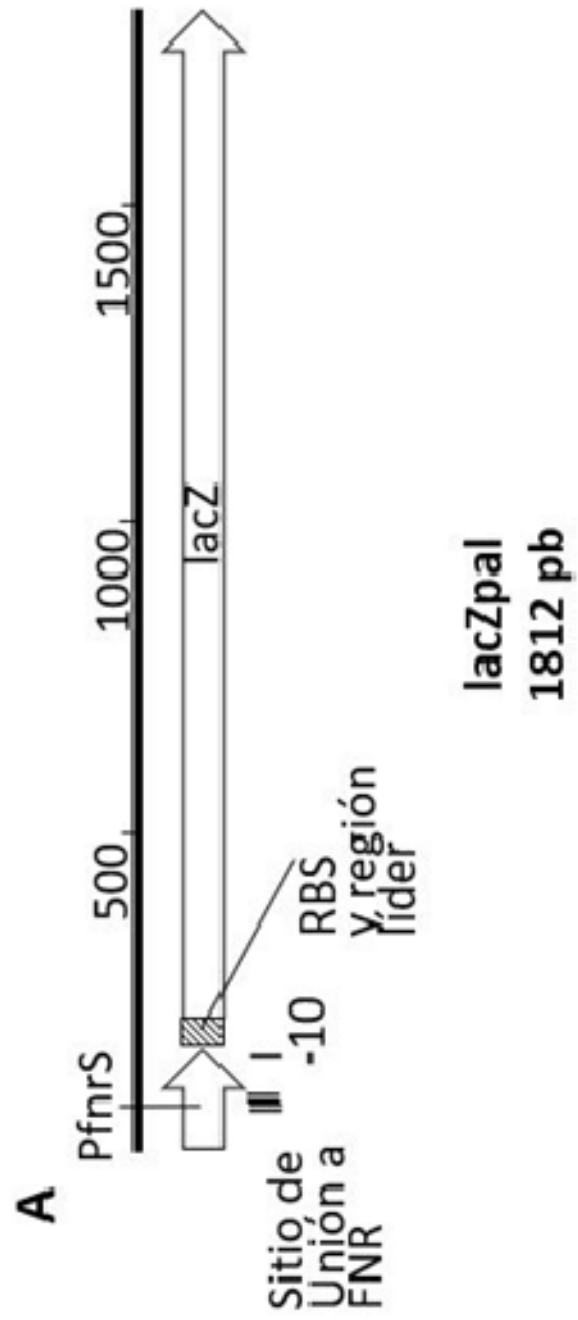


Fig. 19B

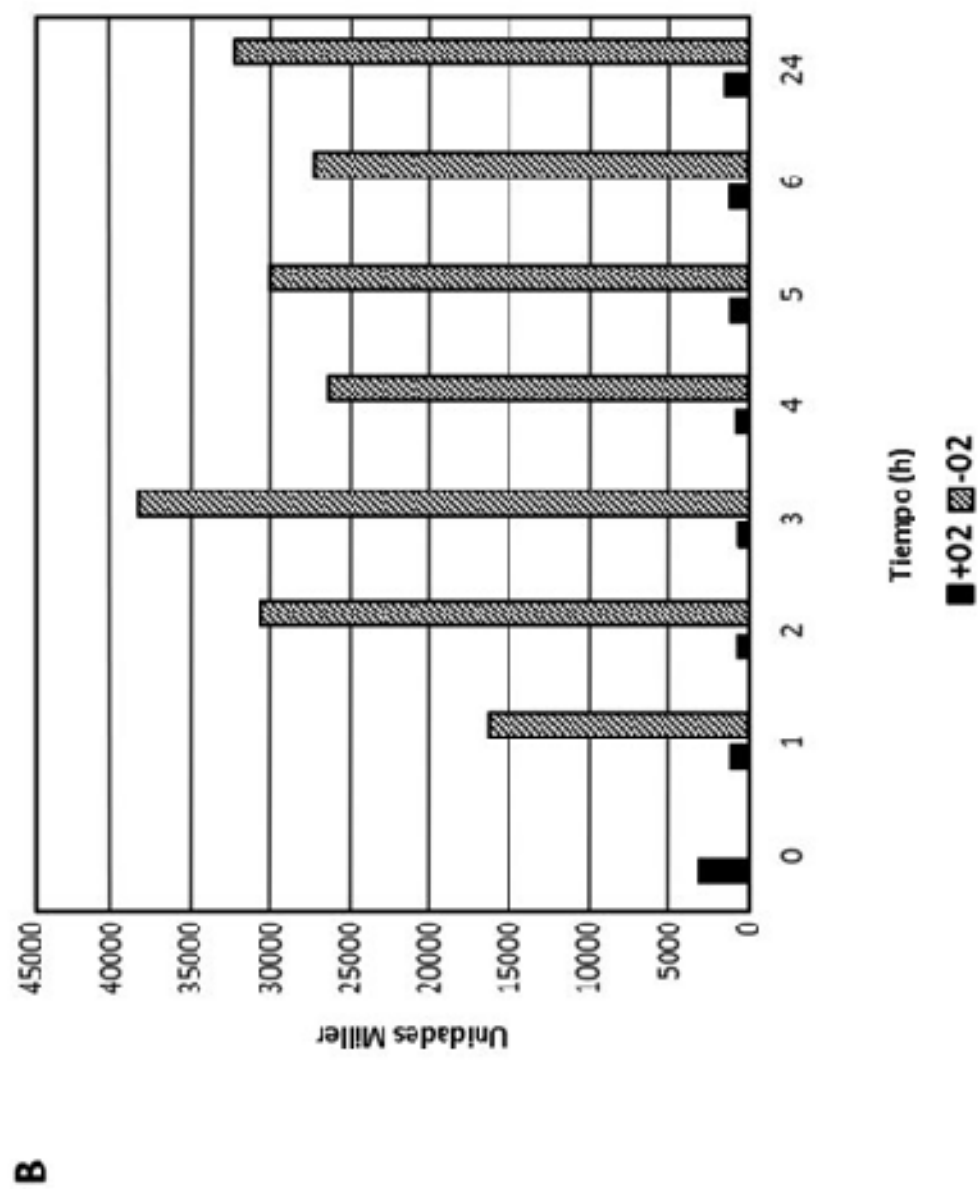


Fig. 19C

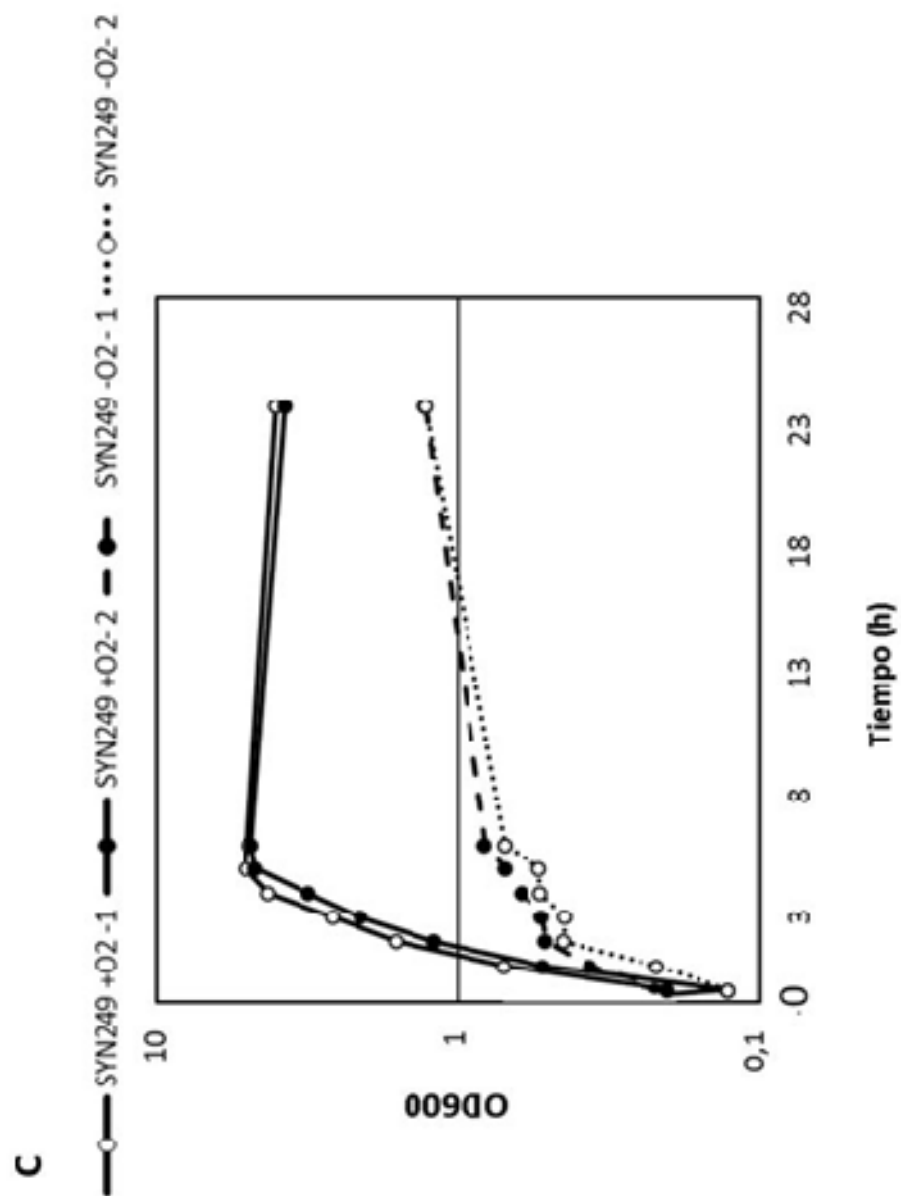


Fig. 20B

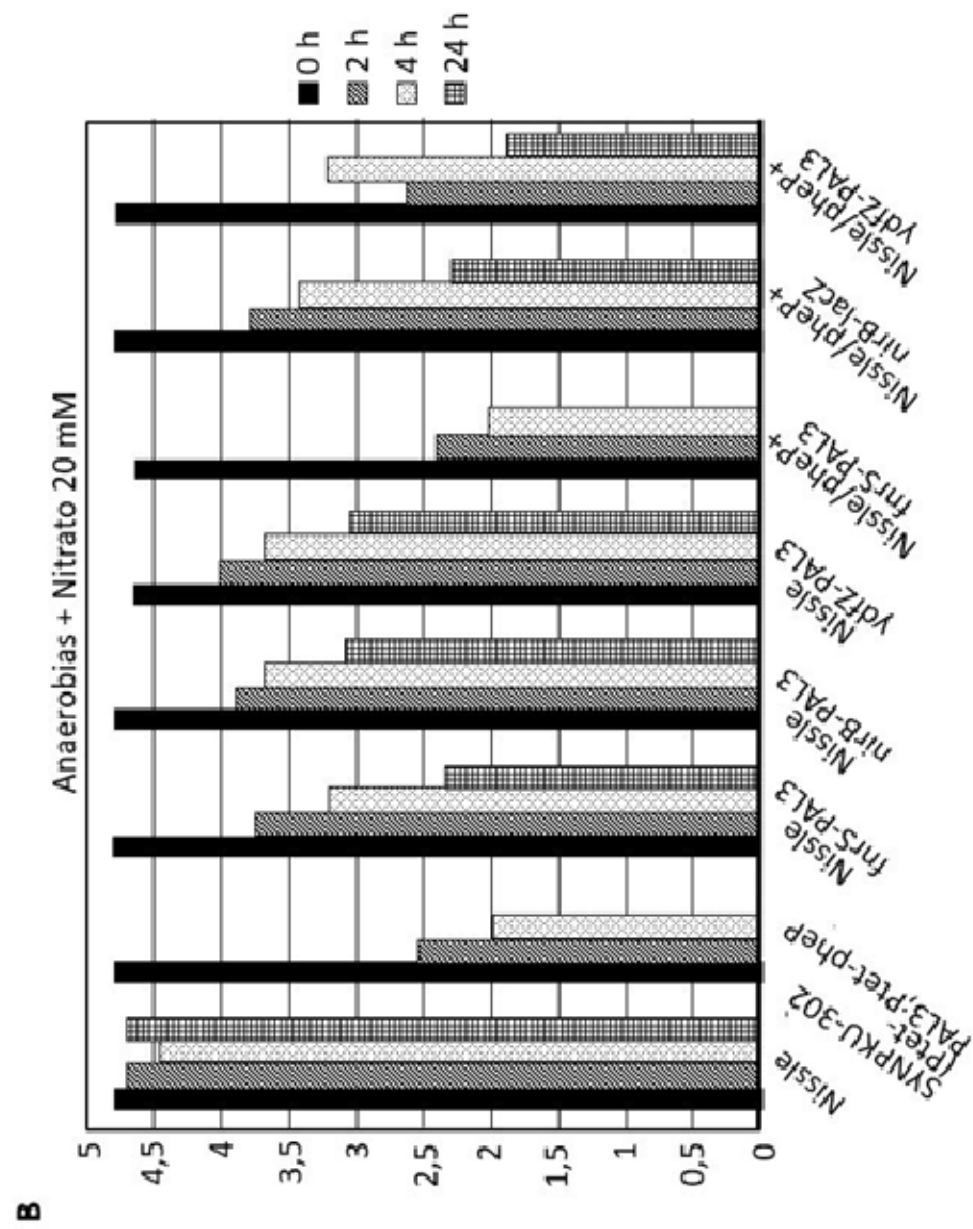


Fig. 21

A

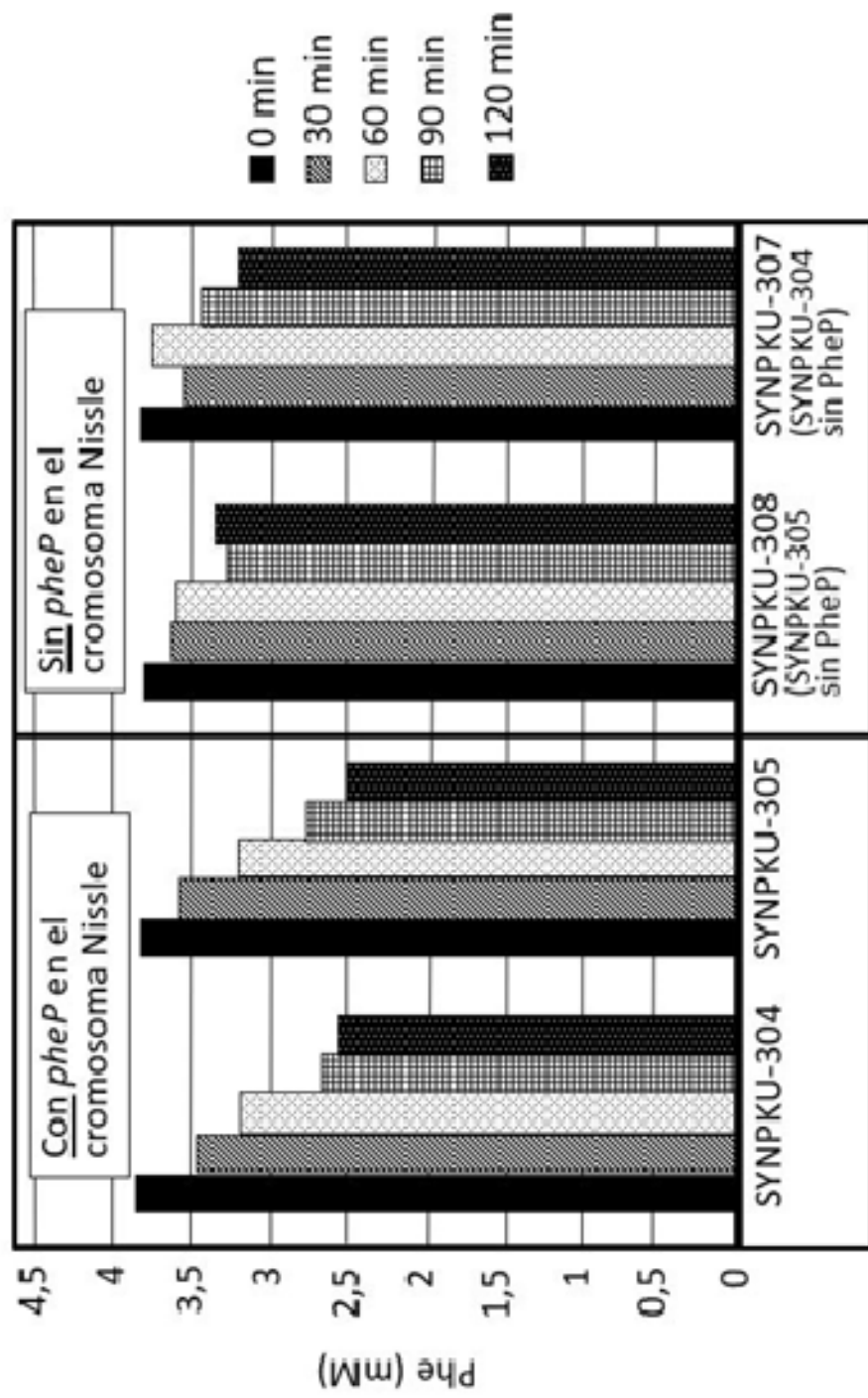


Fig. 22

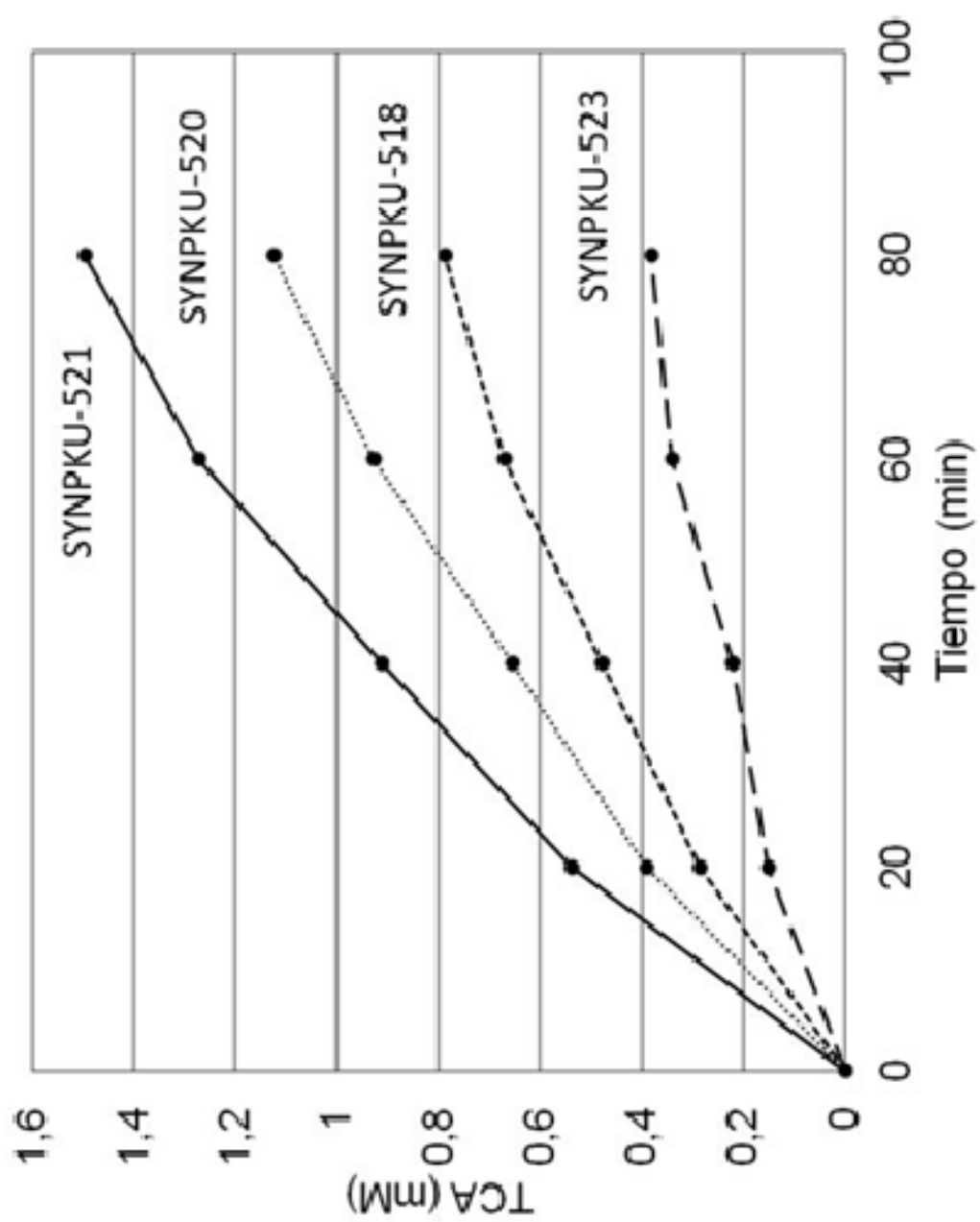


Fig. 23

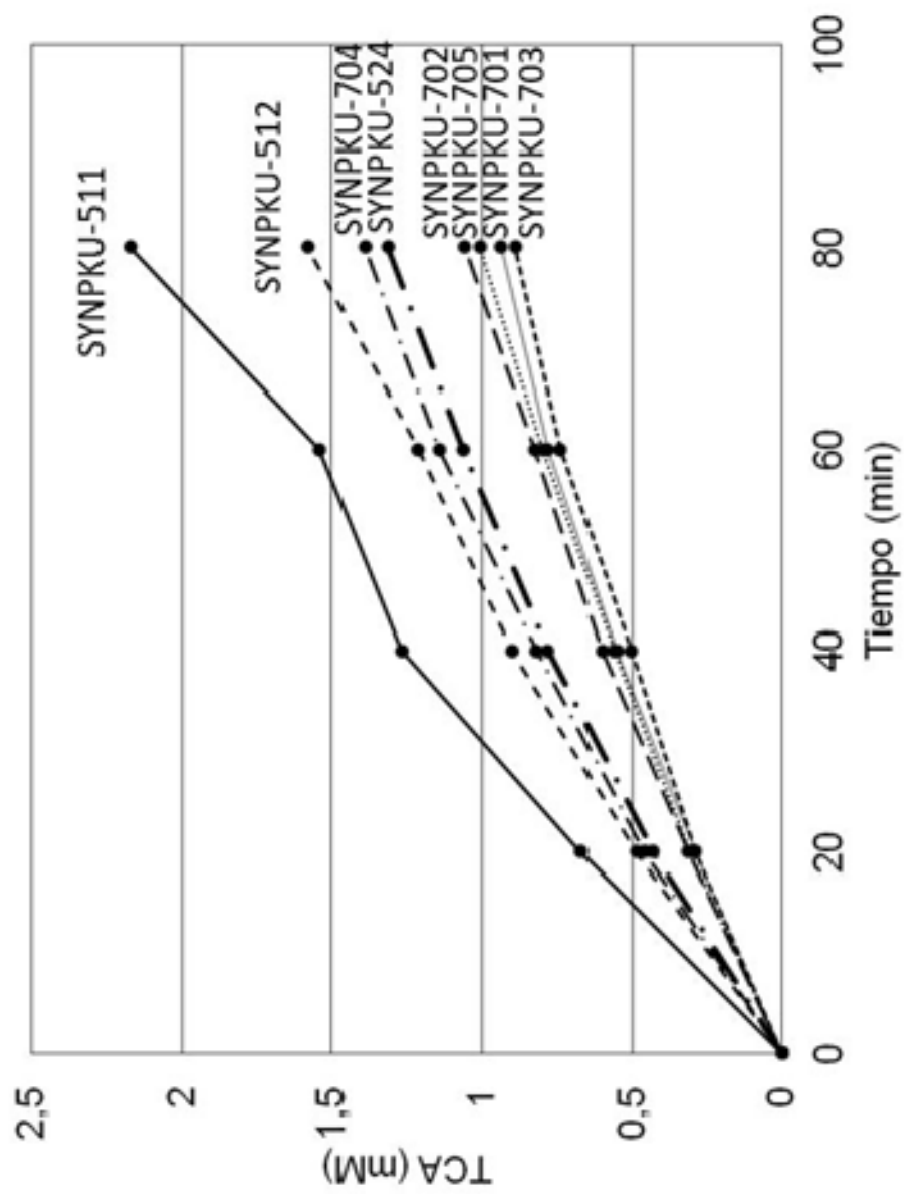


Fig. 24

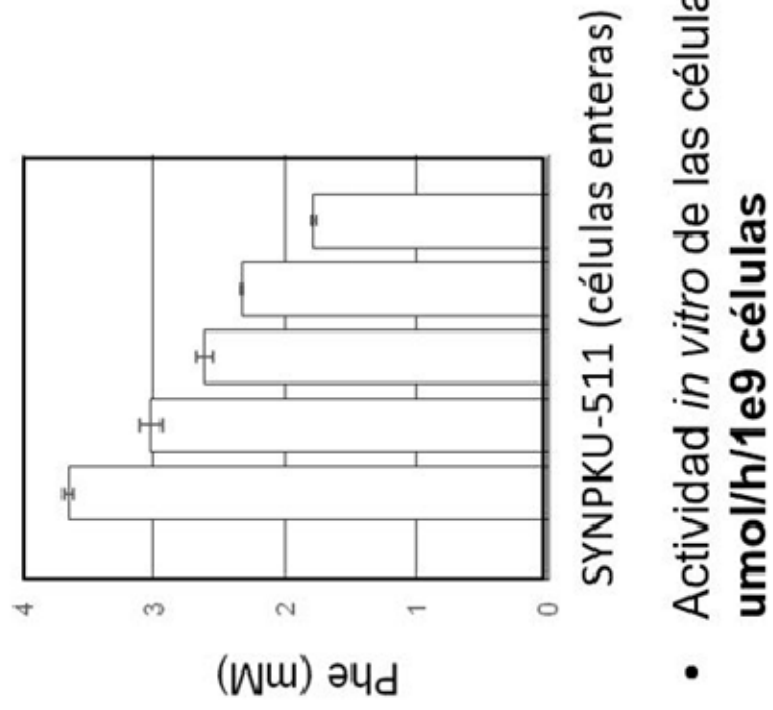
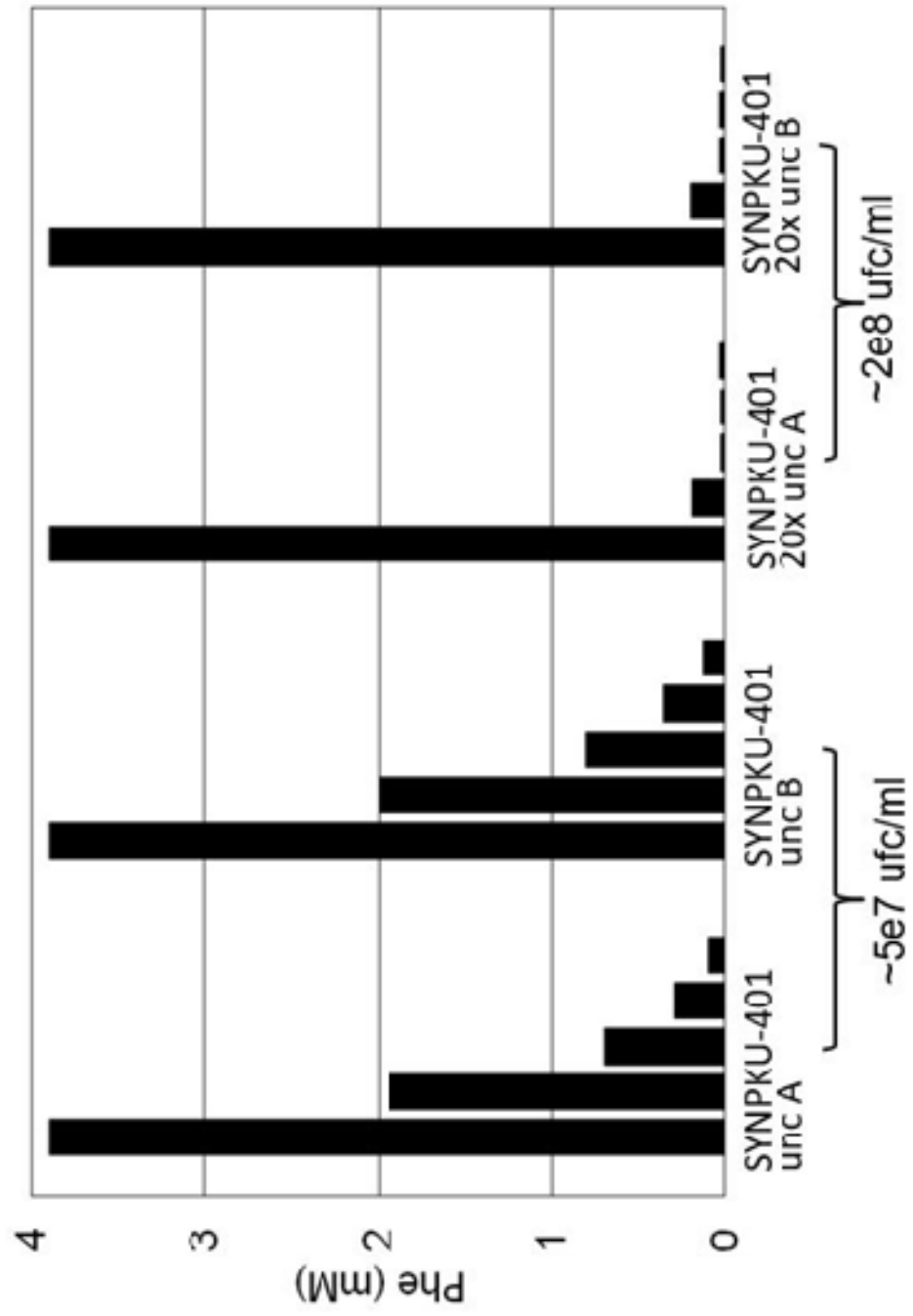


Fig. 25A



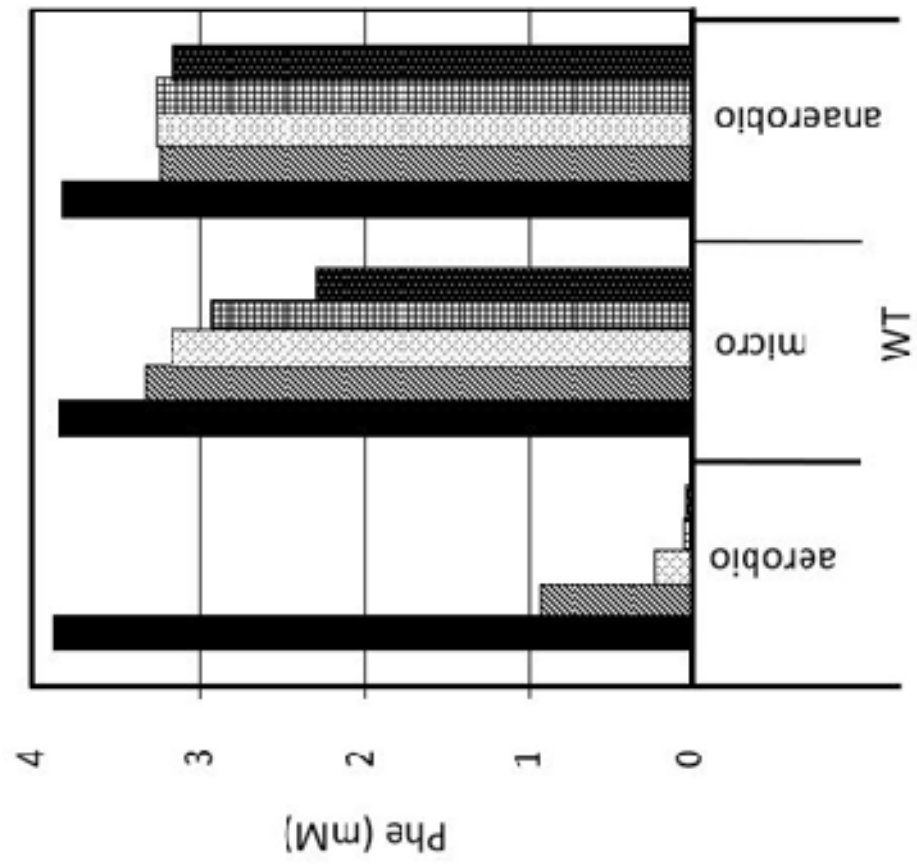


Fig. 25B

Fig. 26A

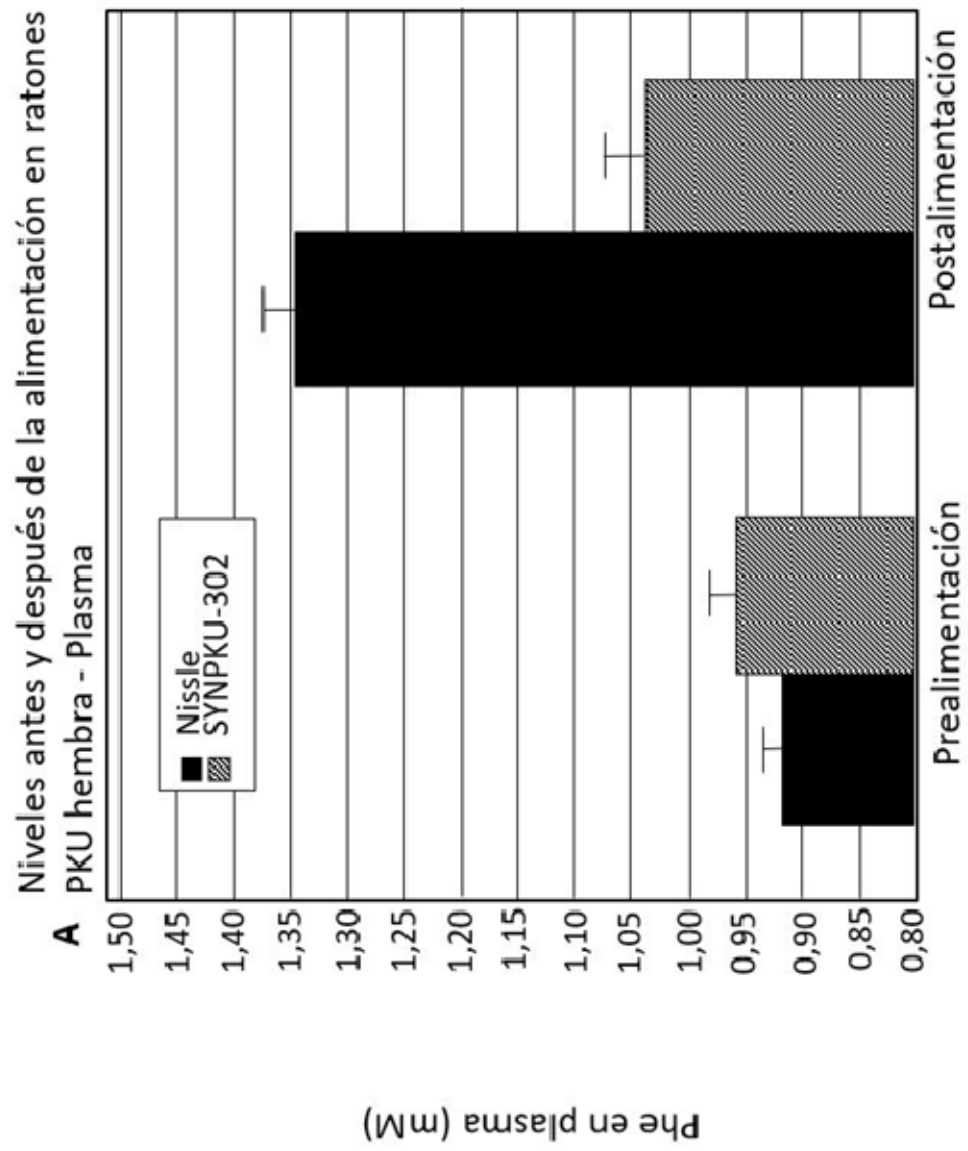
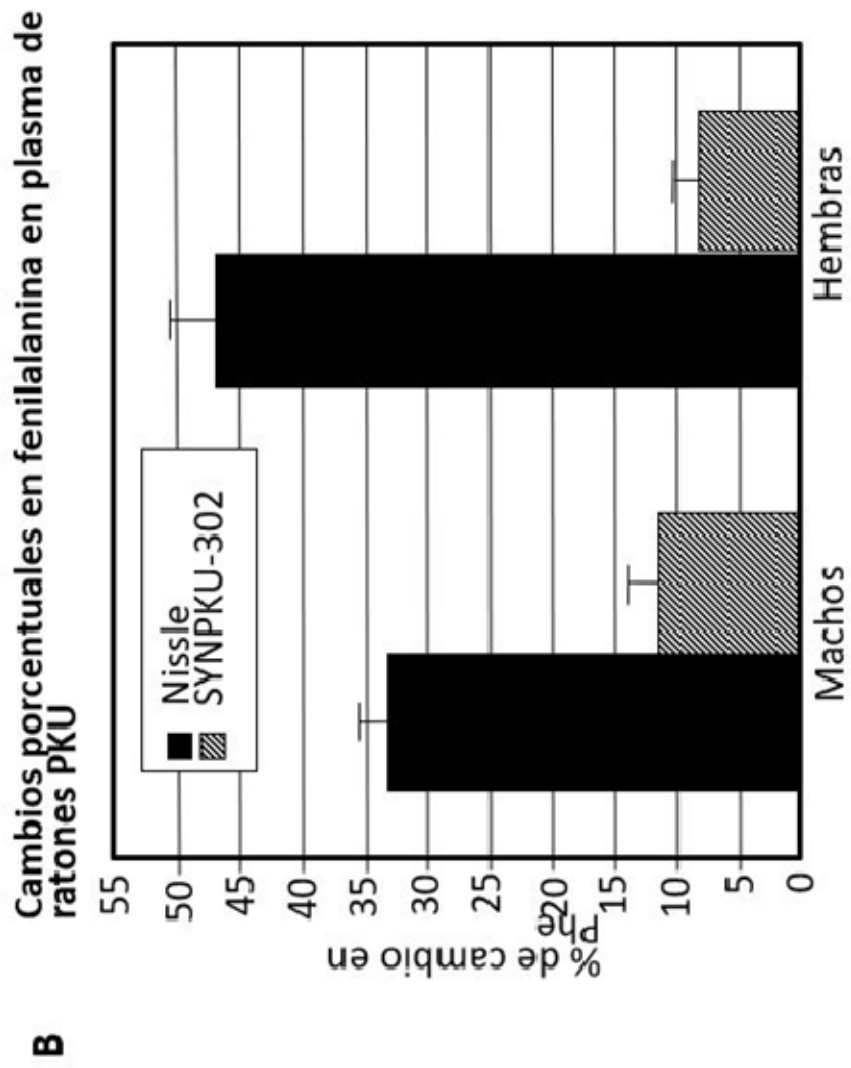


Fig. 26B



Figs. 27A

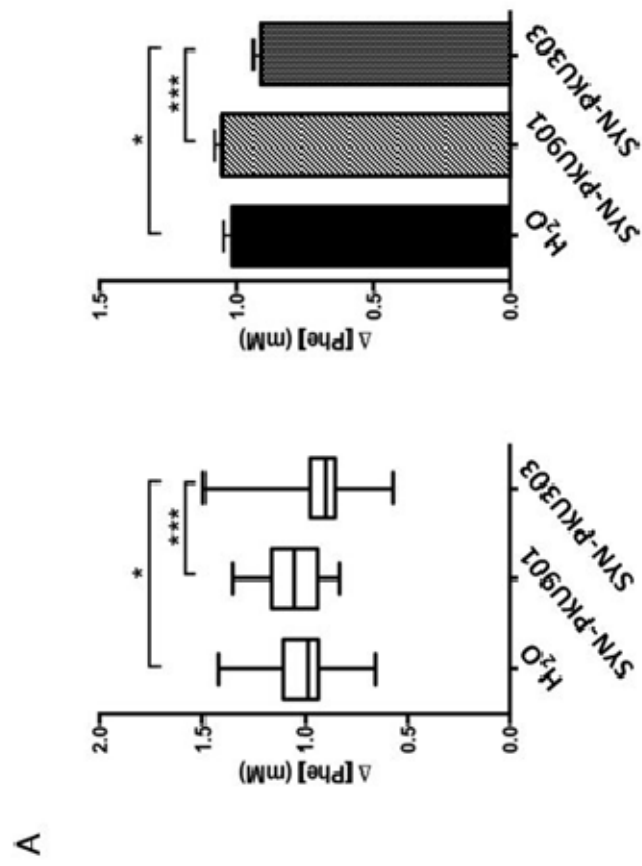
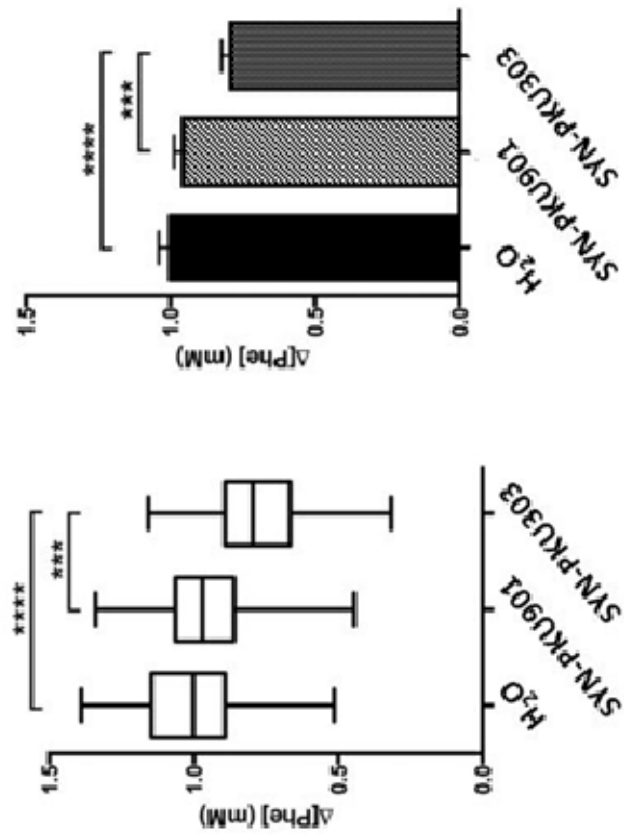


Fig. 27B

B



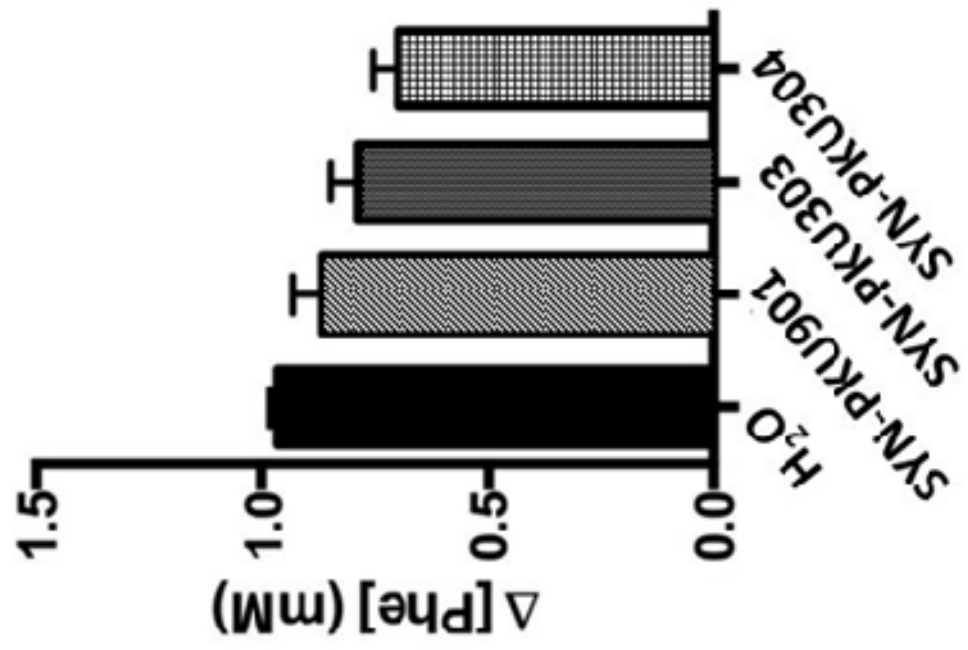
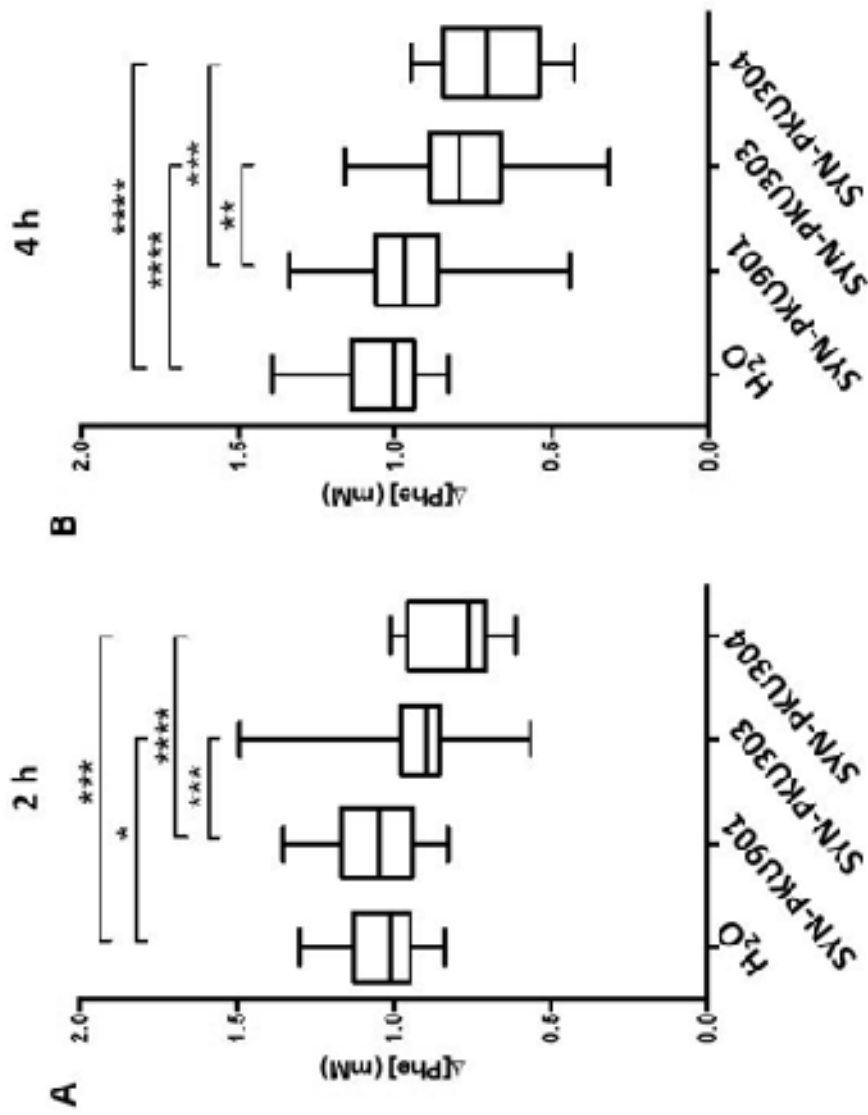


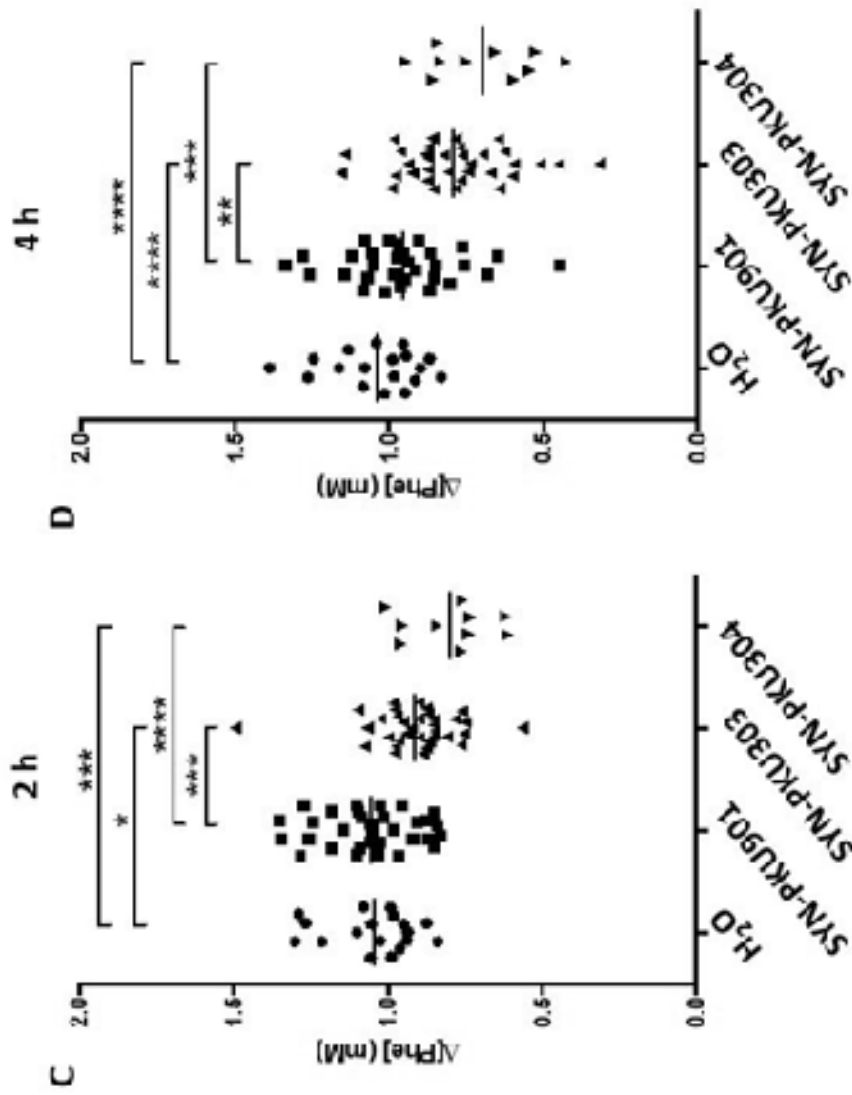
Fig. 28

Figs. 29A y 29B



valores de P: ANOVA con comparación por parejas de Tukey
 * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001

Figs. 29C y 29D



valores de P: ANOVA con comparación por parejas de Tukey
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Figs. 30A y 30B

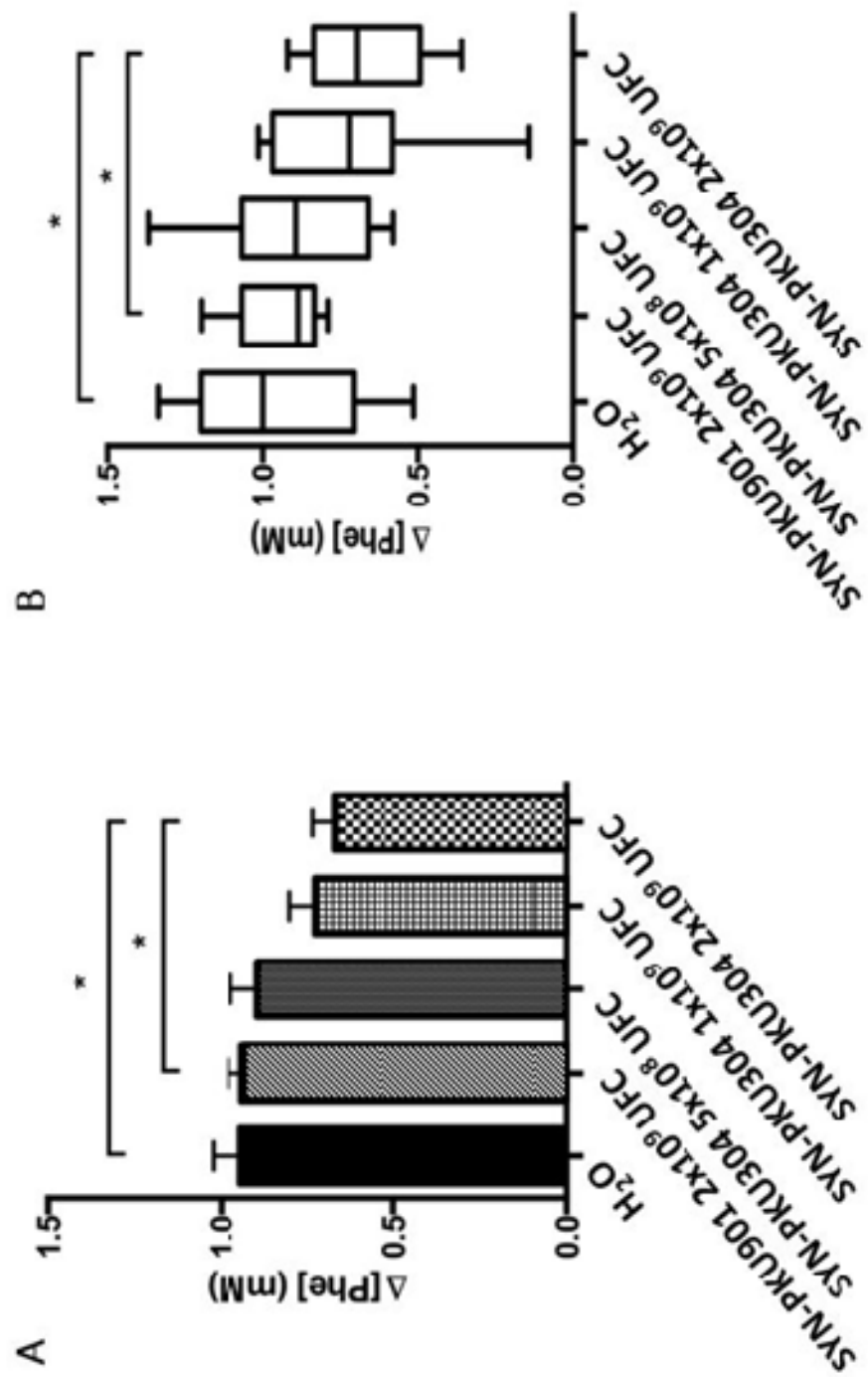
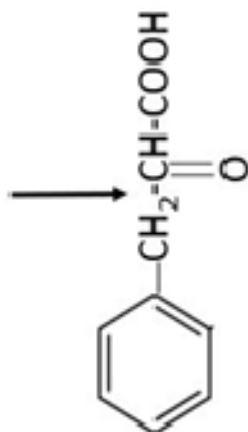
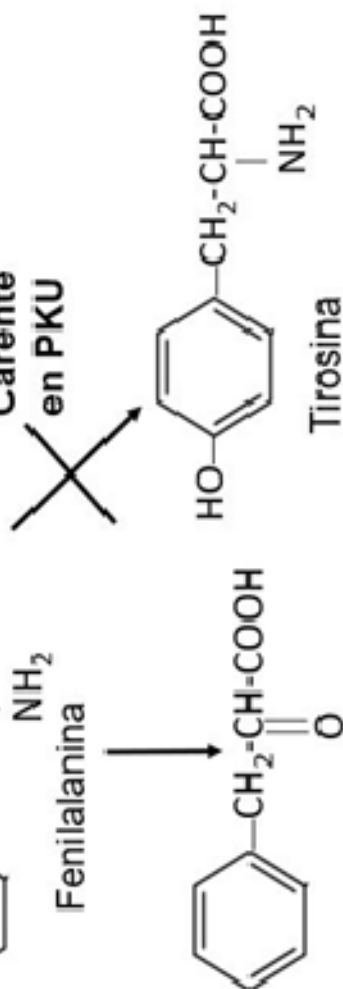


Fig. 31A

específicos de
PKU:

Carente
en PKU



Ácido fenilpirúvico

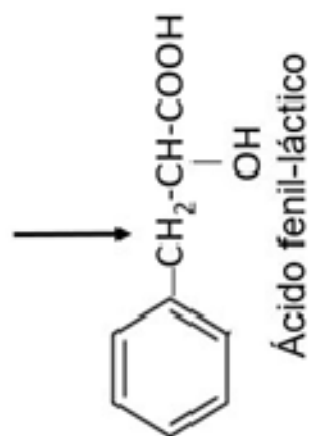
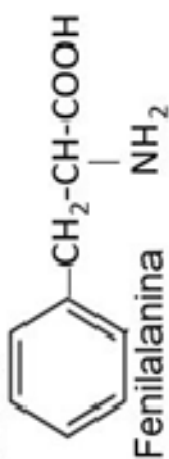
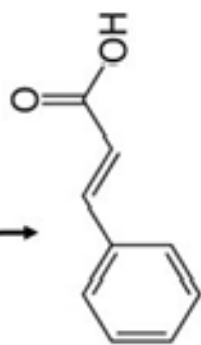


Fig. 31B

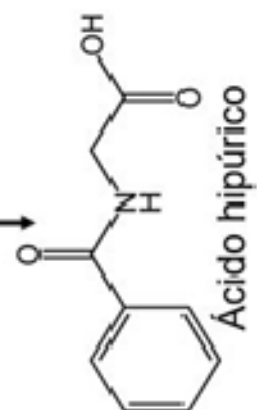
específicos de
PAL:

PAL3



Ácido *trans*-cinámico

Enzimas
hepáticas



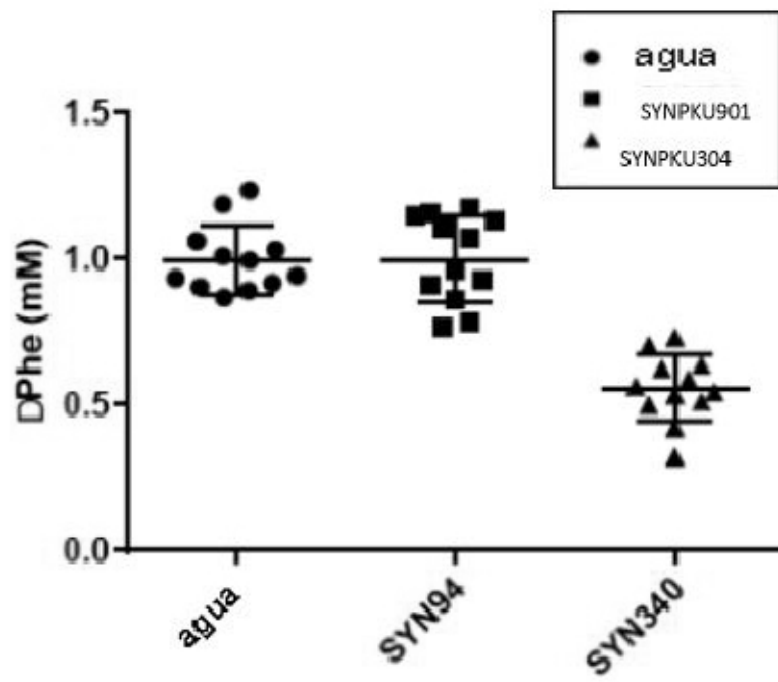


Fig. 32A

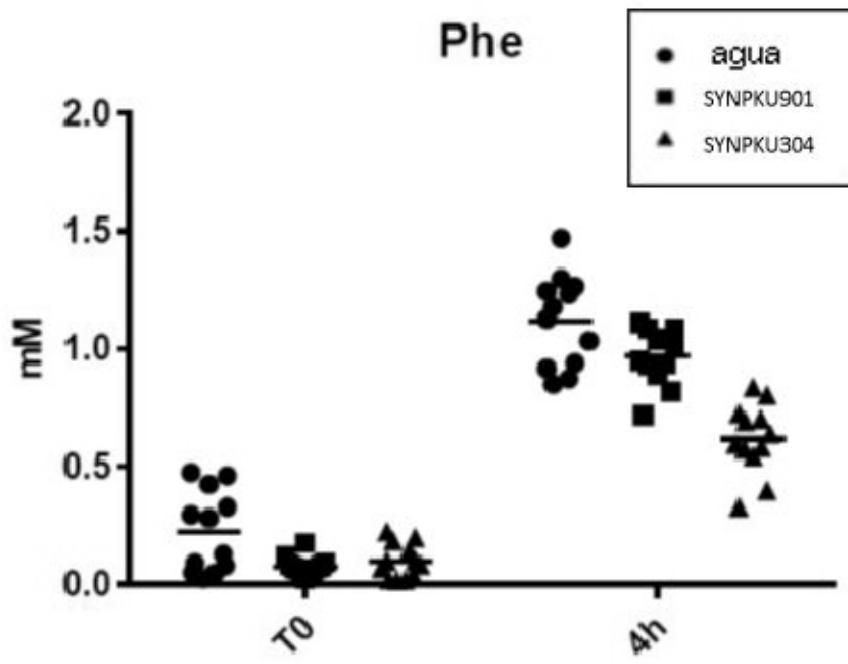


Fig. 32B

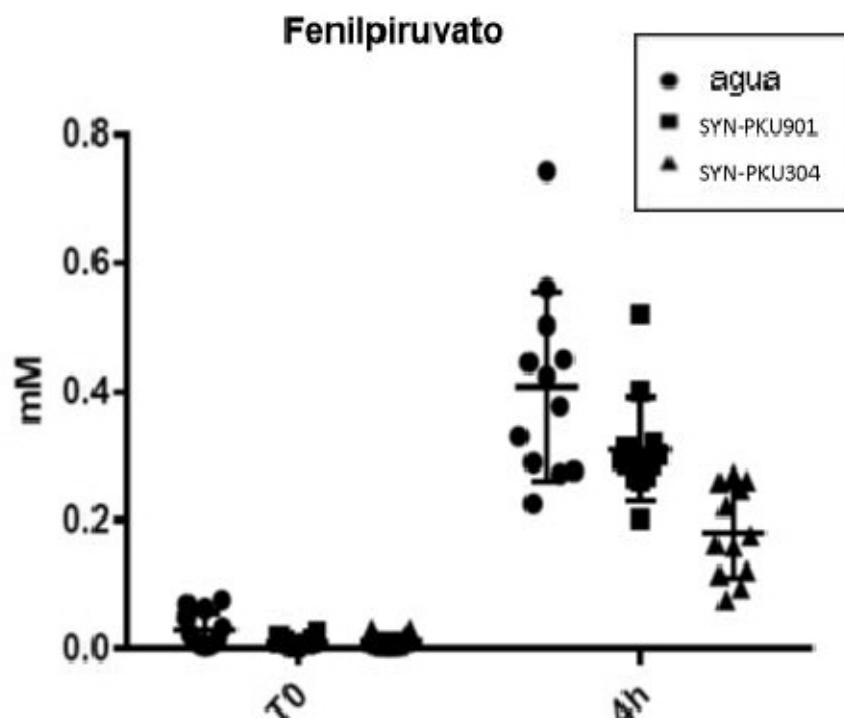


Fig. 32C

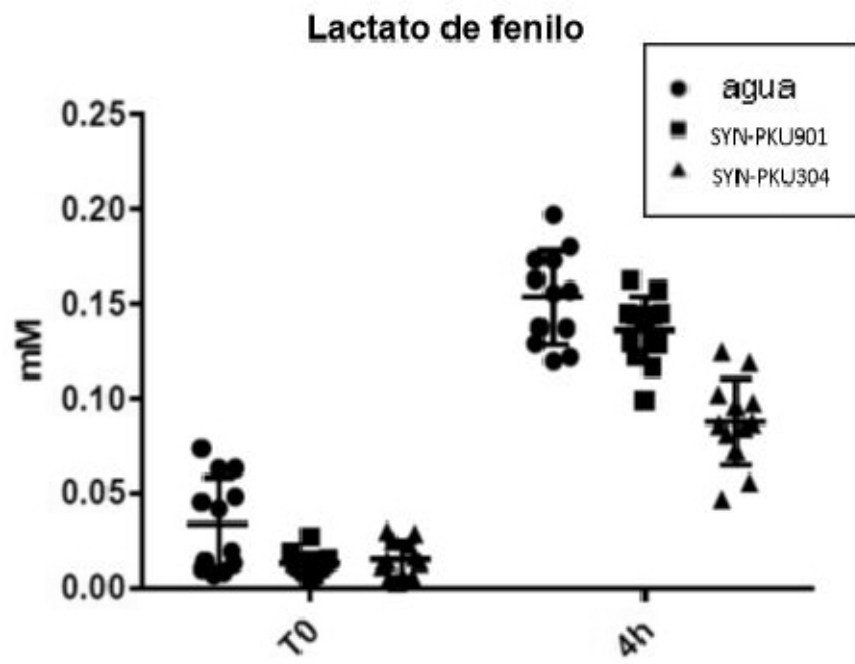


Fig. 32D

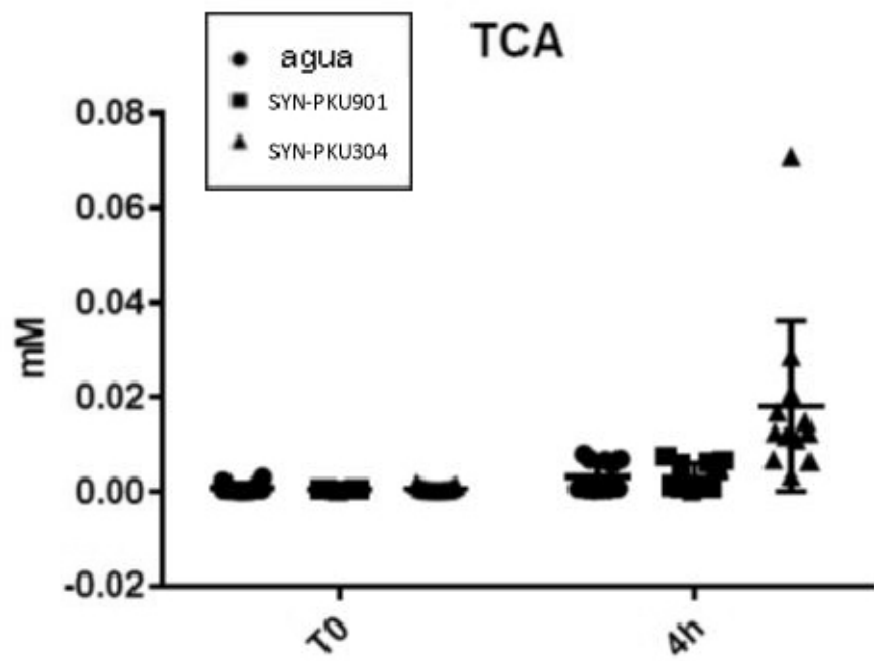


Fig. 32E

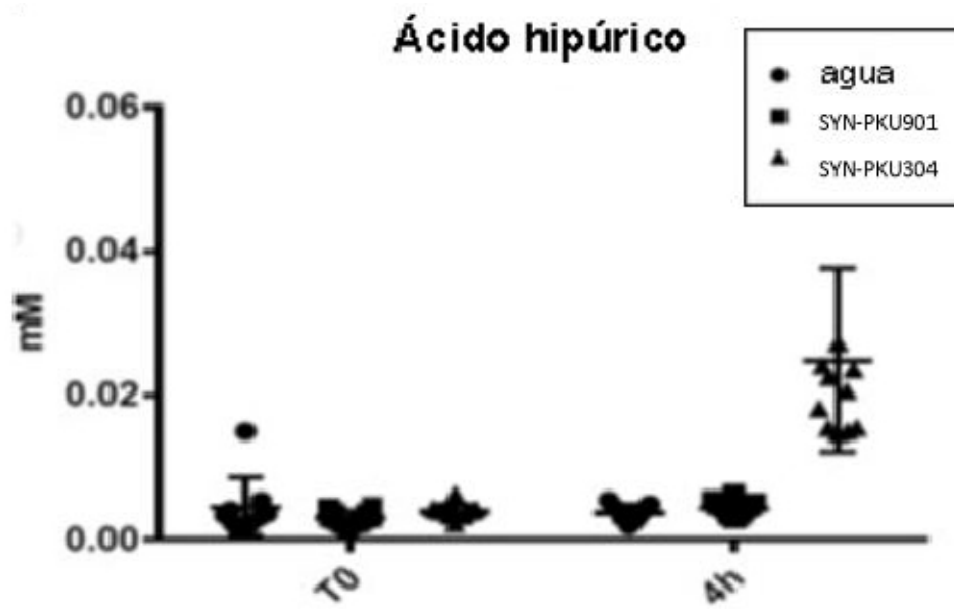


Fig. 32F

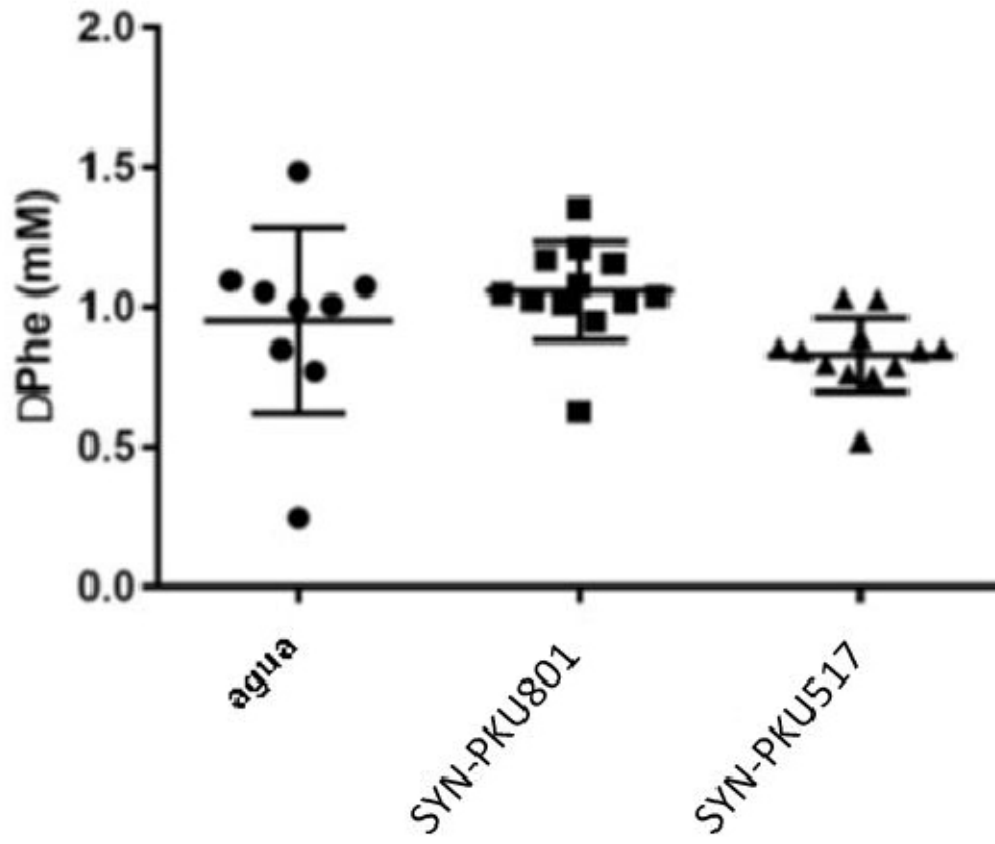


Fig. 33A

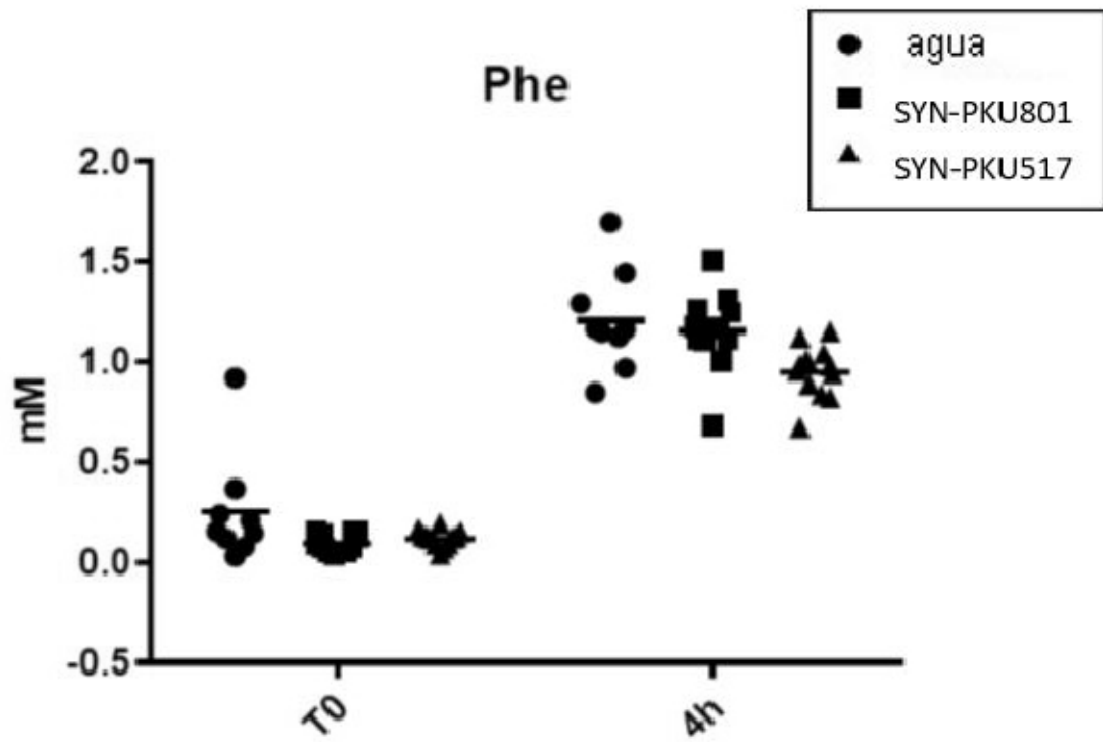


Fig. 33B

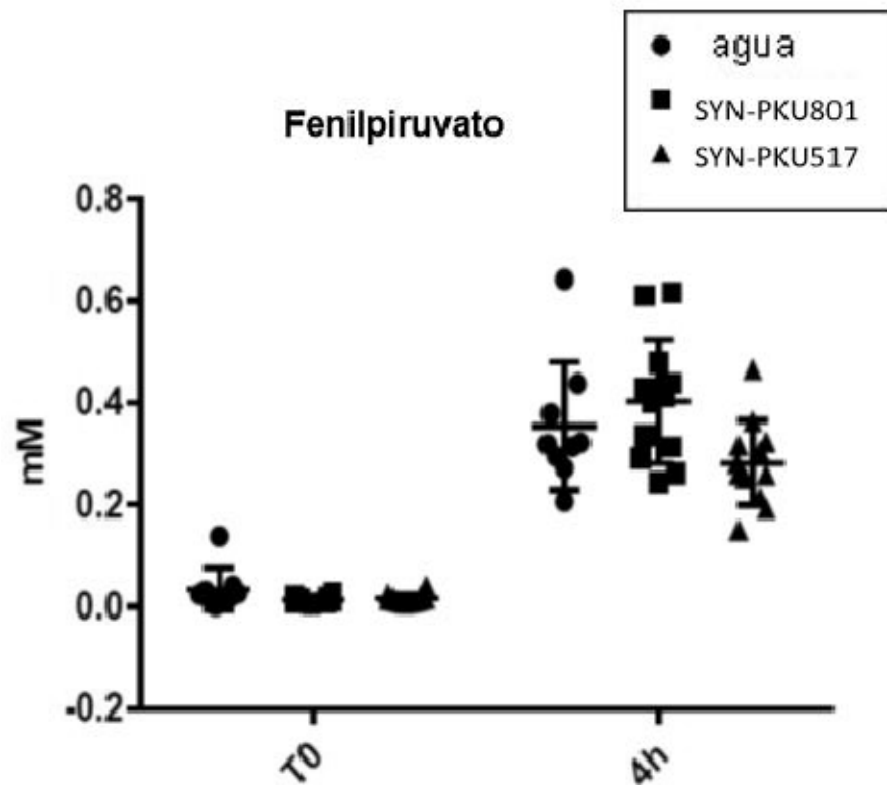


Fig. 33C

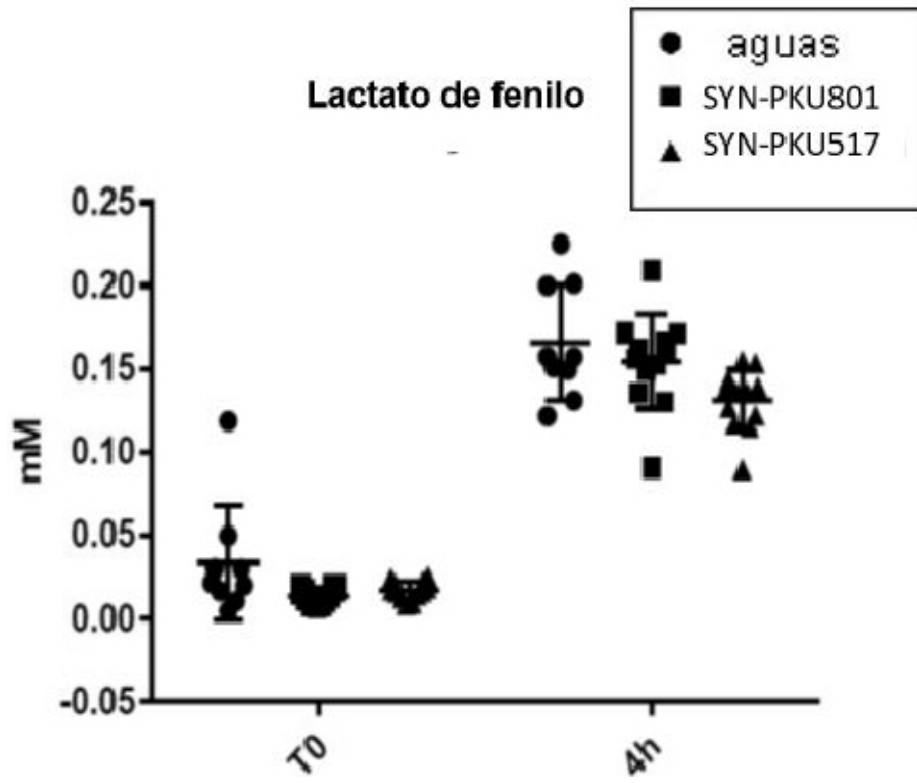


Fig. 33D

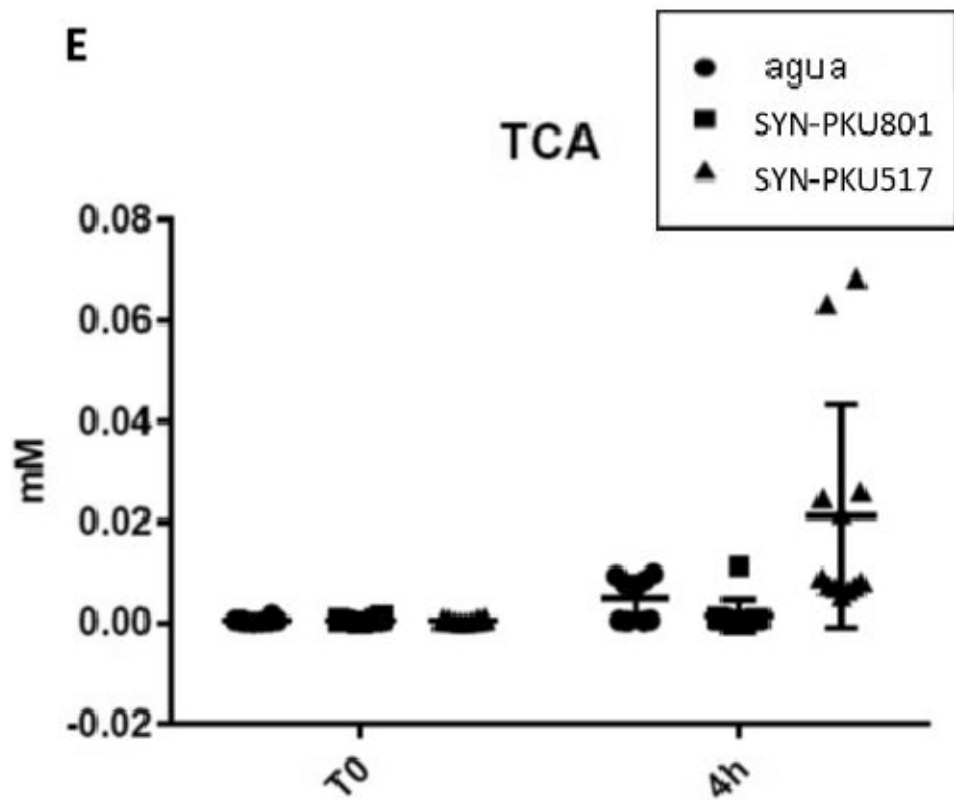


Fig. 33E

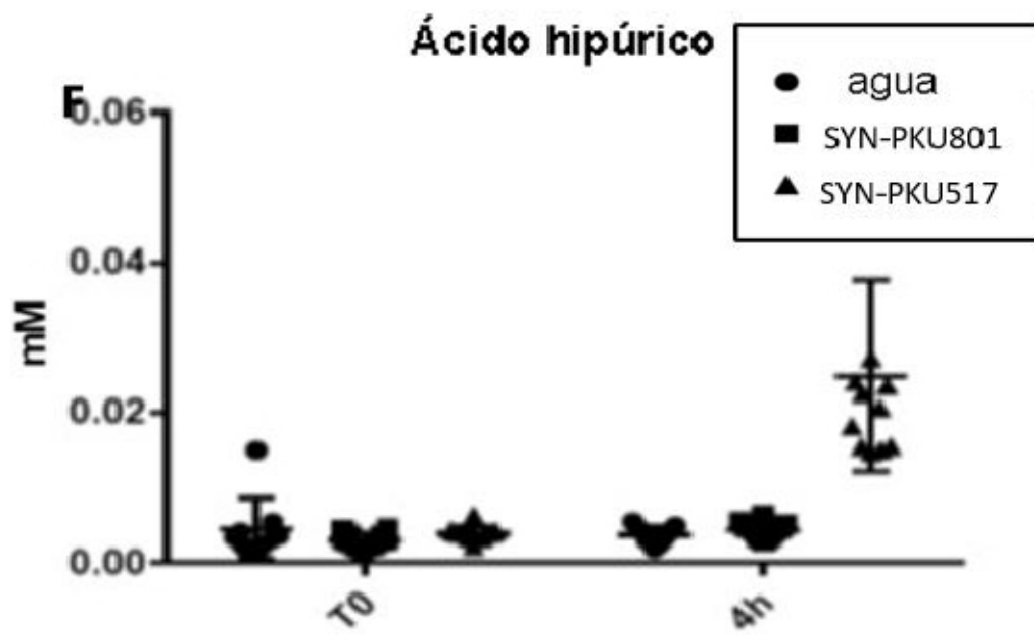


Fig. 33F

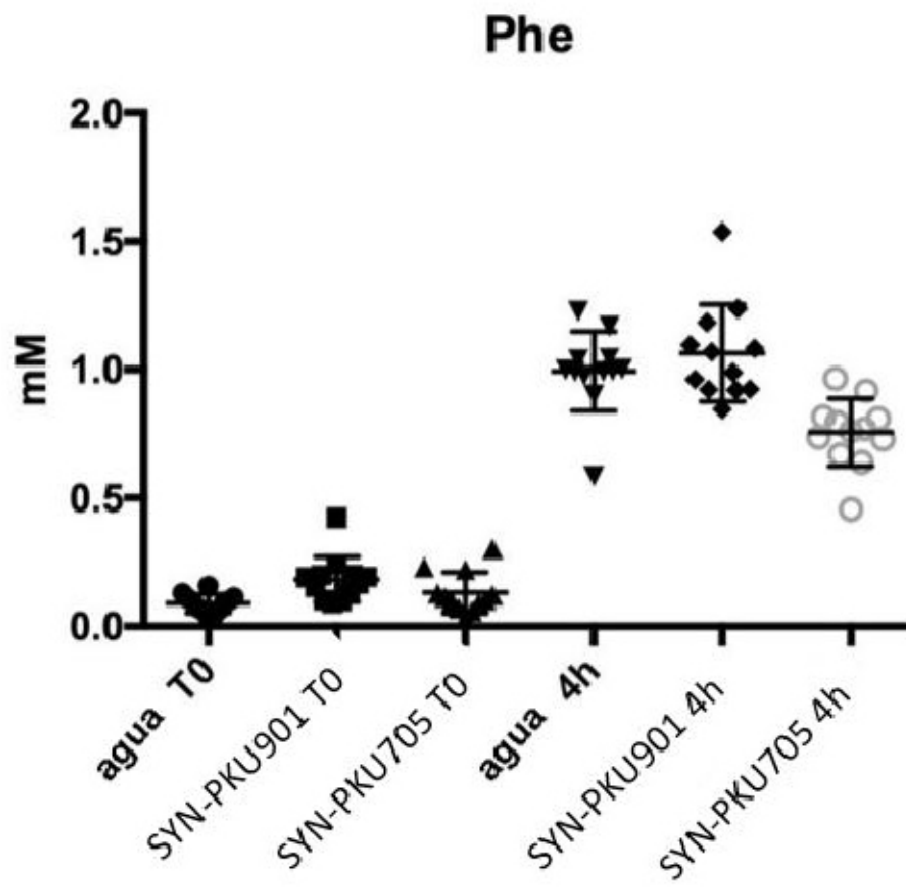


Fig. 34A

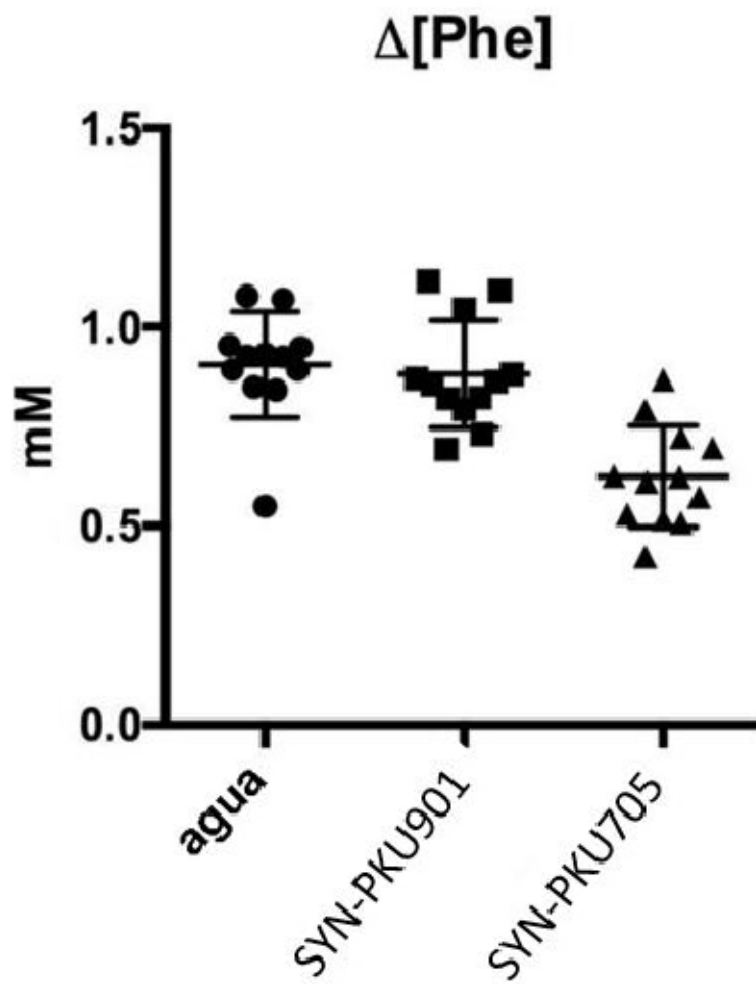


Fig. 34B

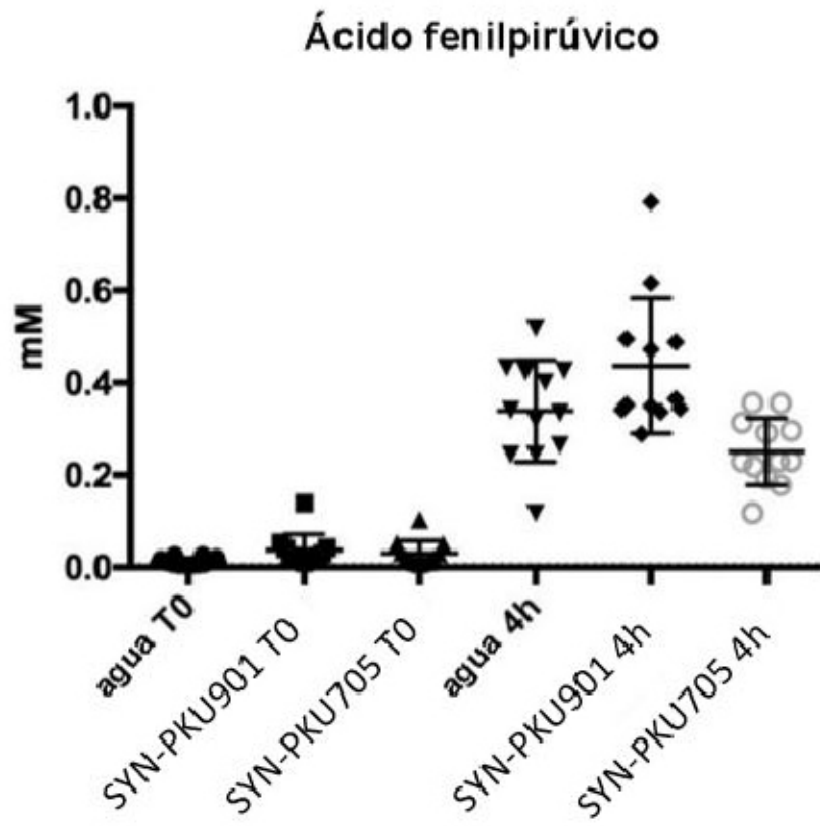


Fig. 34C

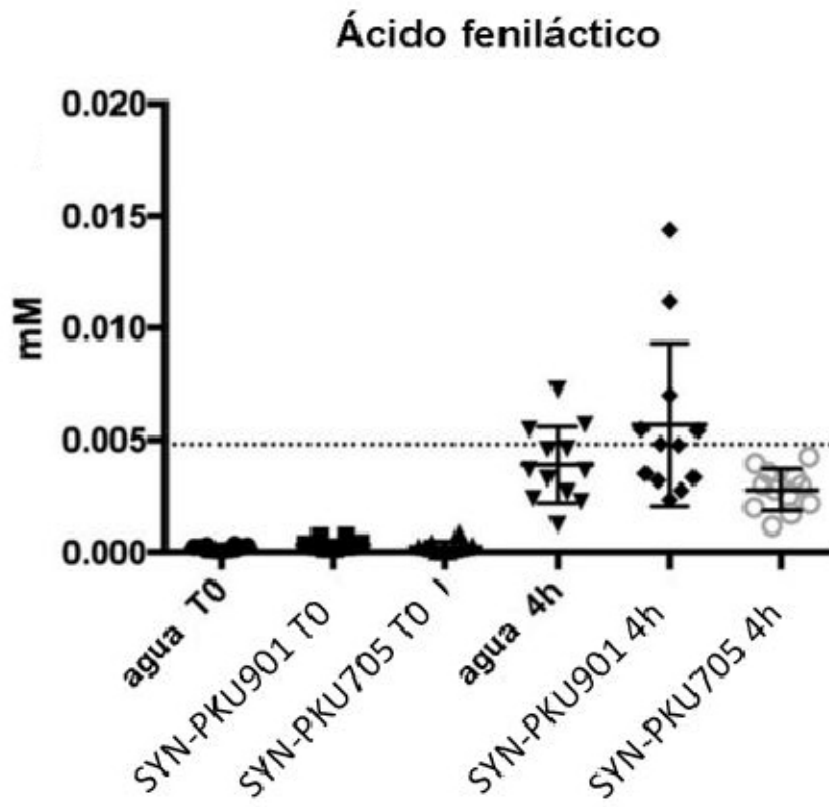


Fig. 34D

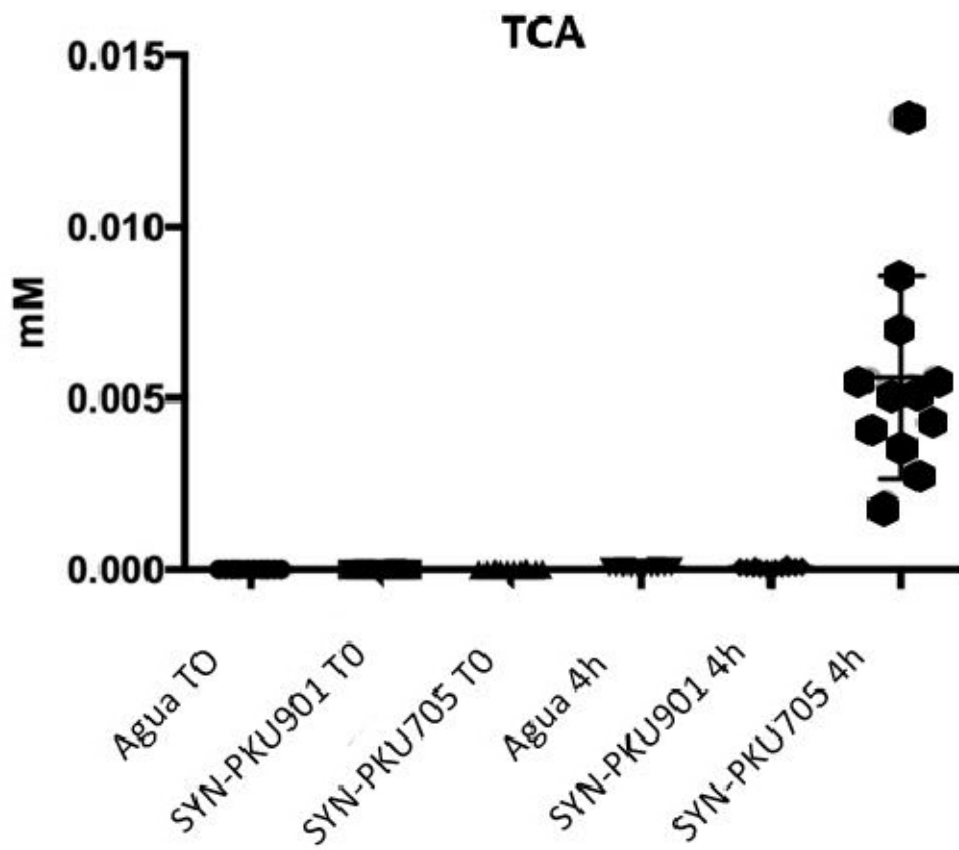


Fig. 34E

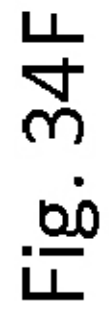
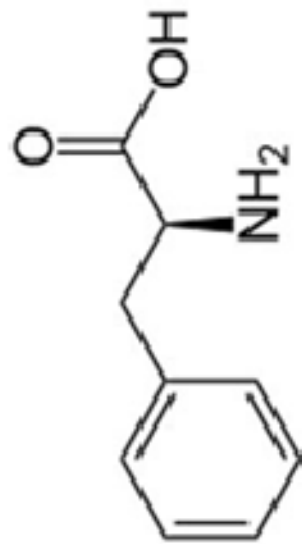
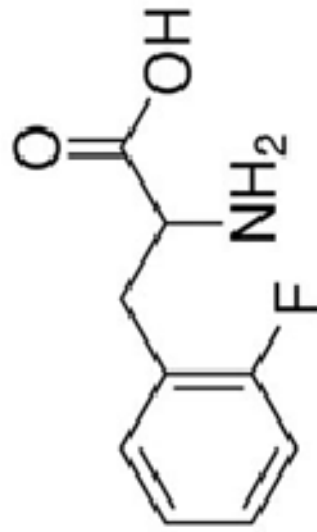


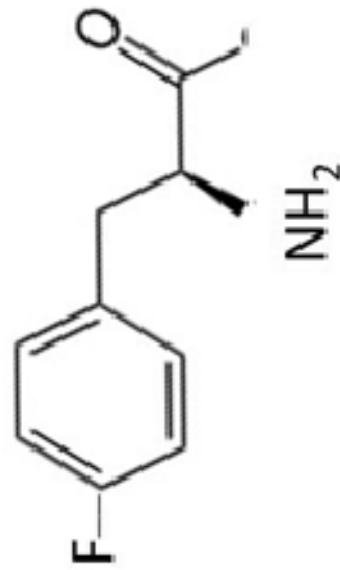
Fig. 35



fenilalanina



o-fluoro-DL-fenilalanina



p-fluoro-DL-fenilalanina

Fig. 36

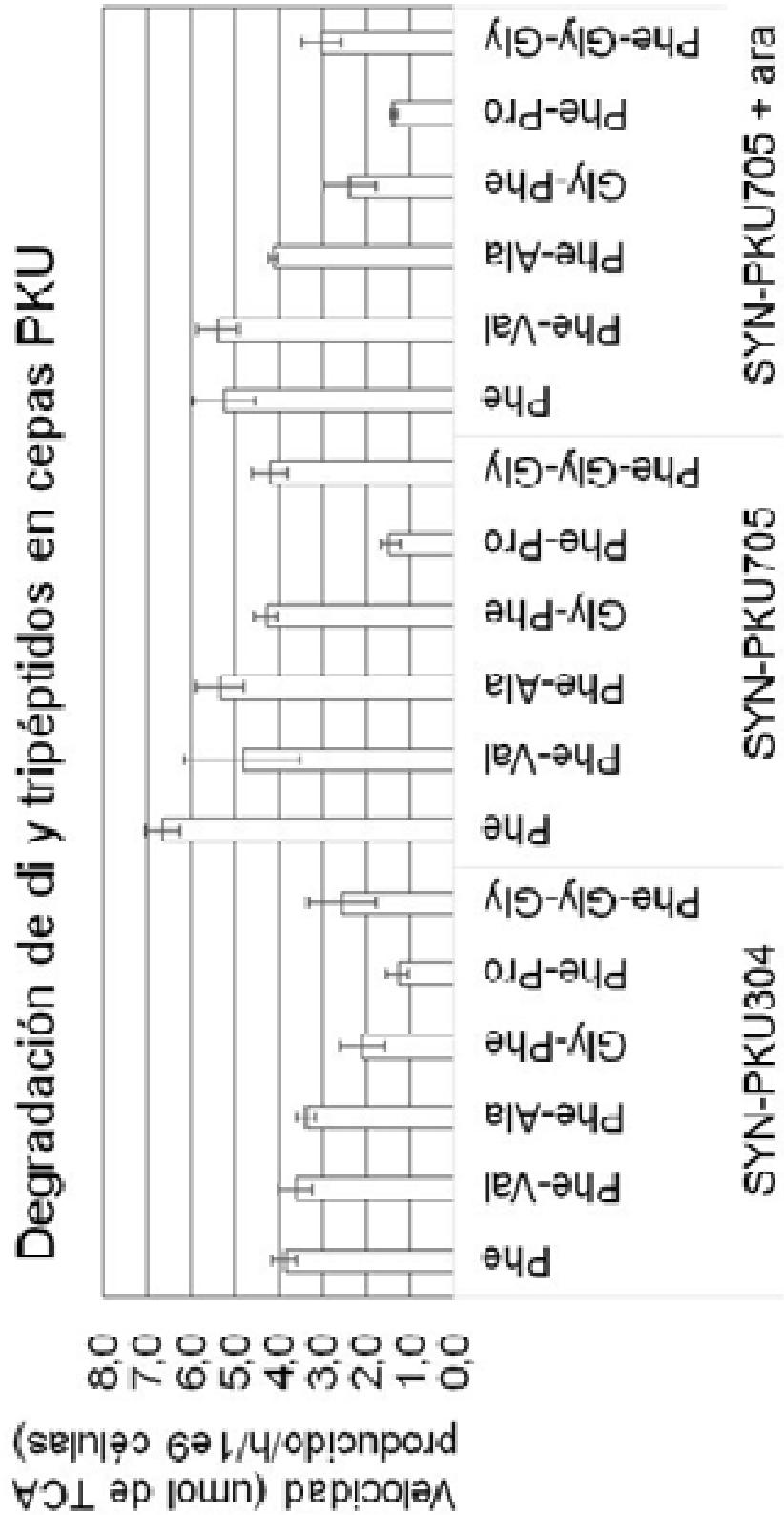


Fig. 37

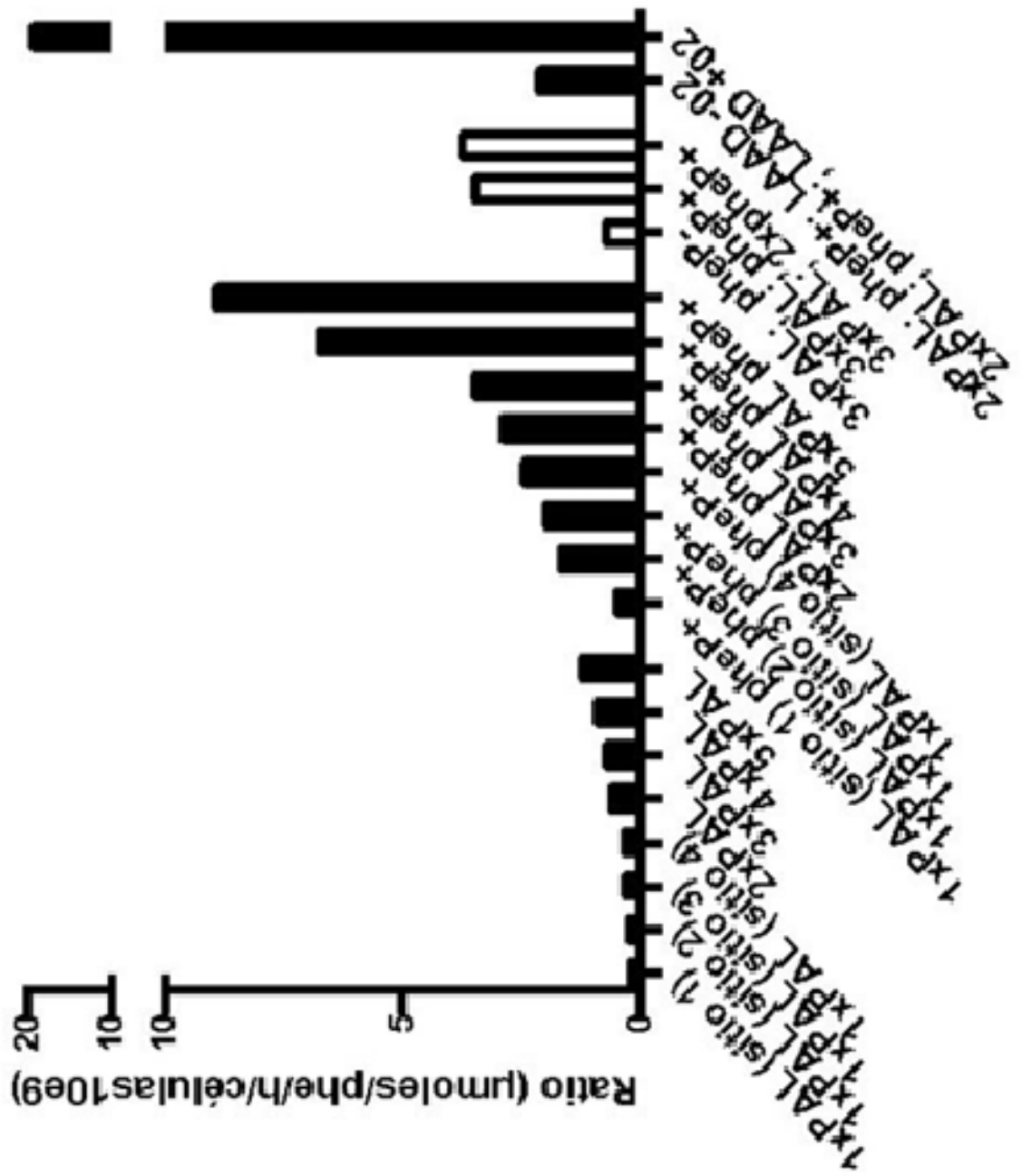


Fig. 38A

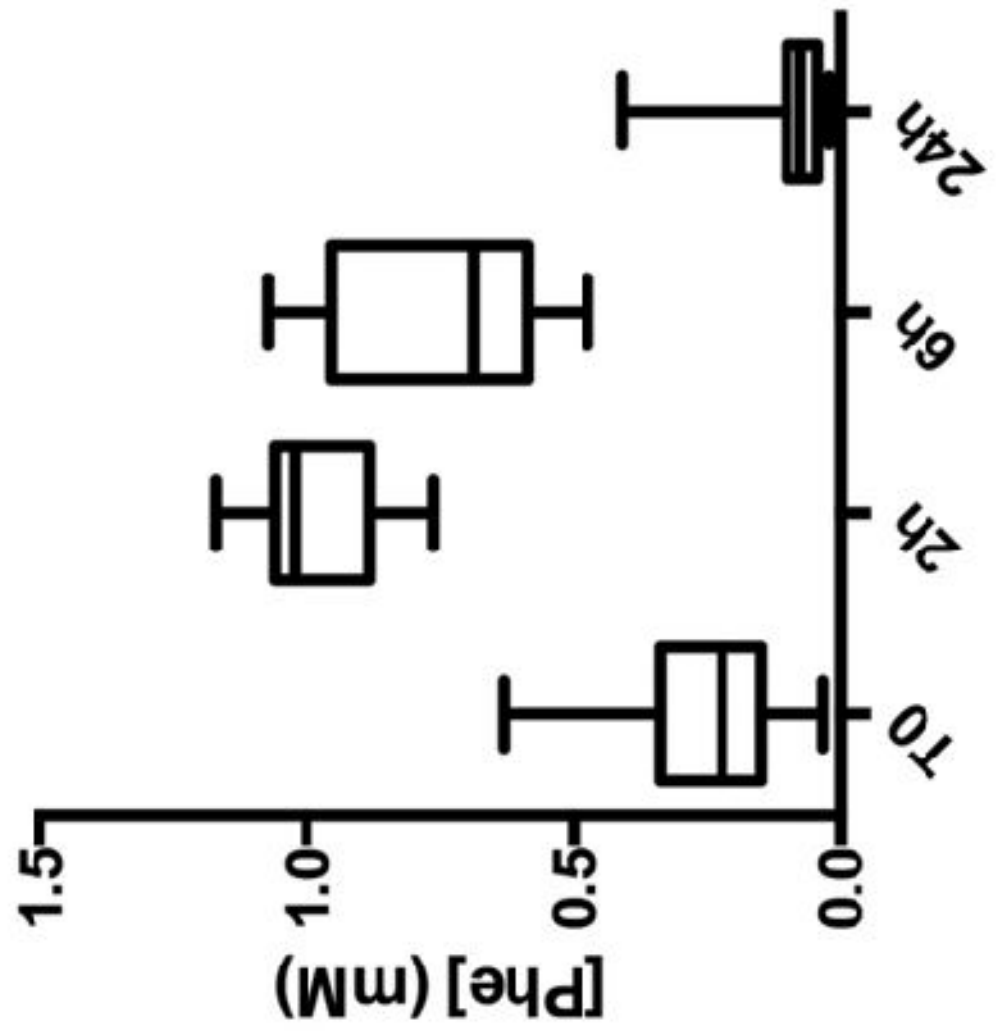


Fig. 38B

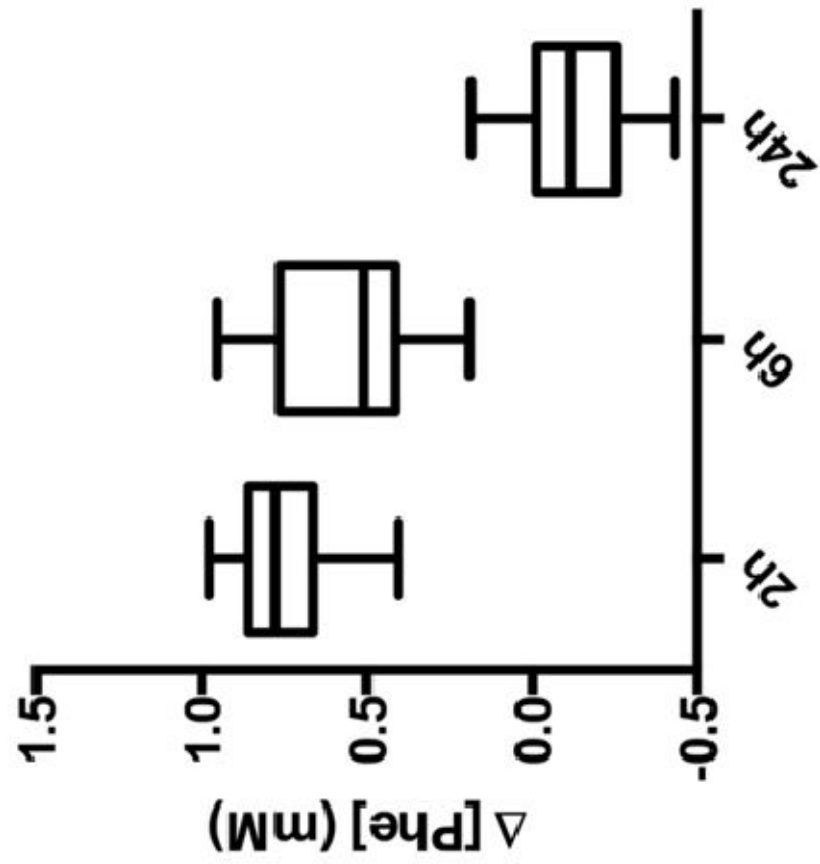


Fig. 38C

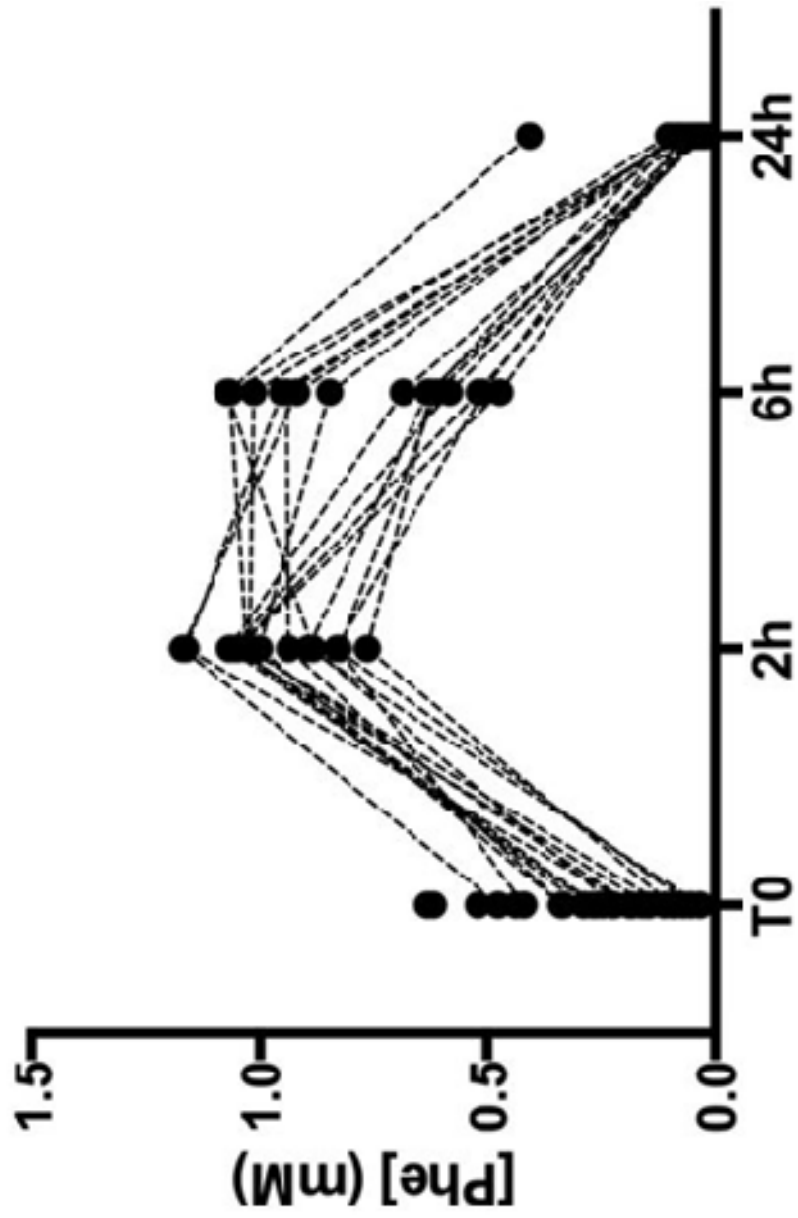


Fig. 39

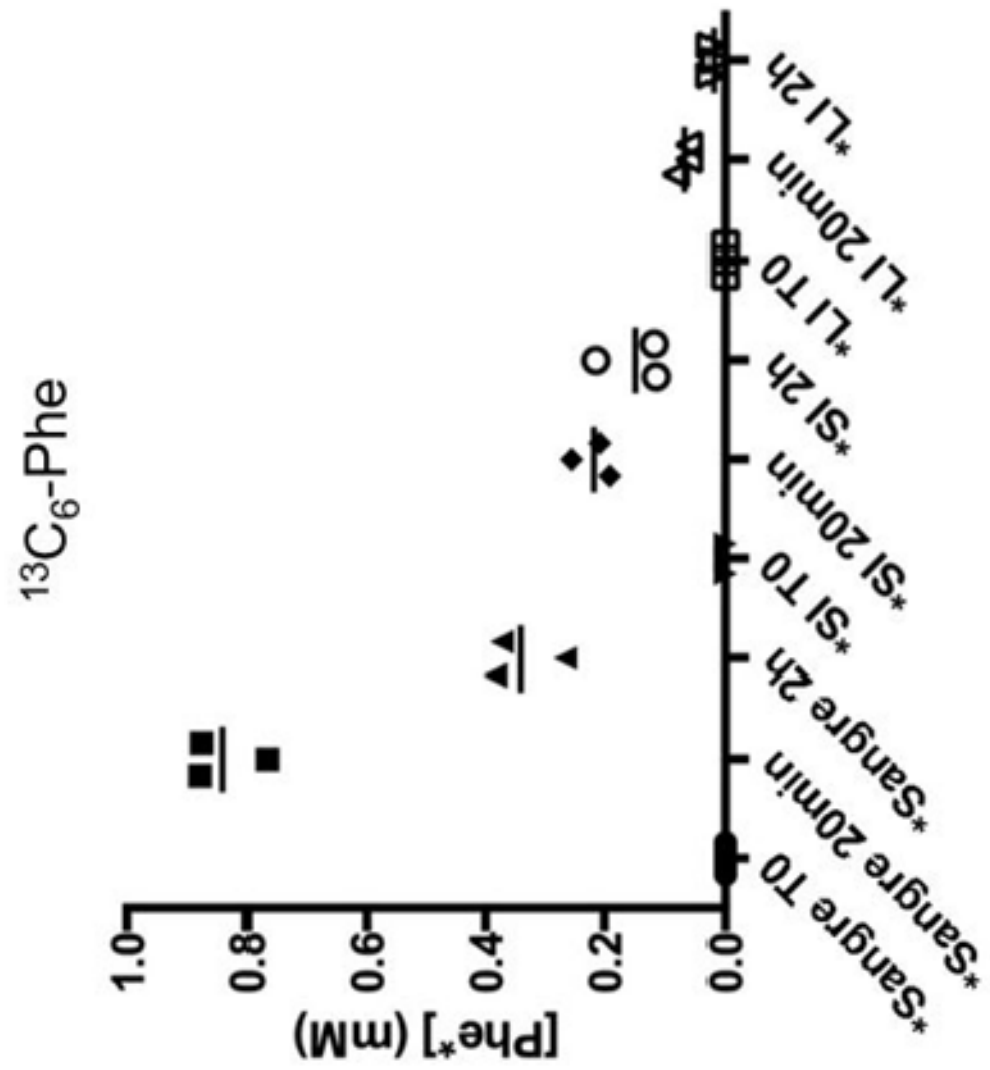


Fig. 40A

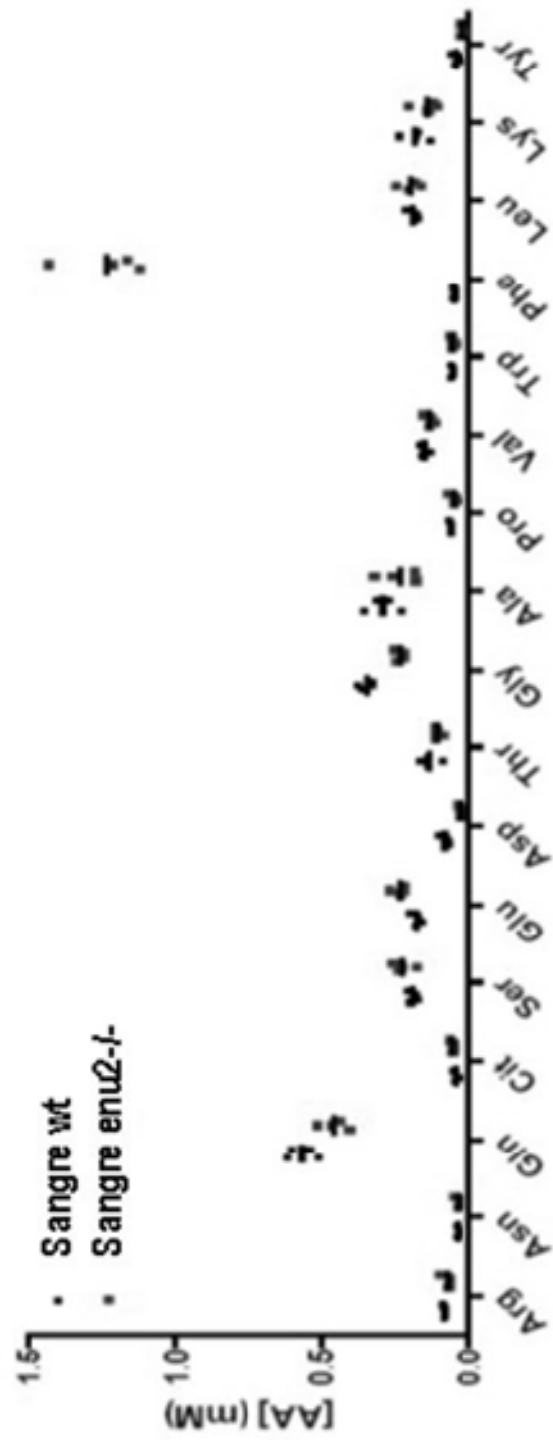


Fig. 40B

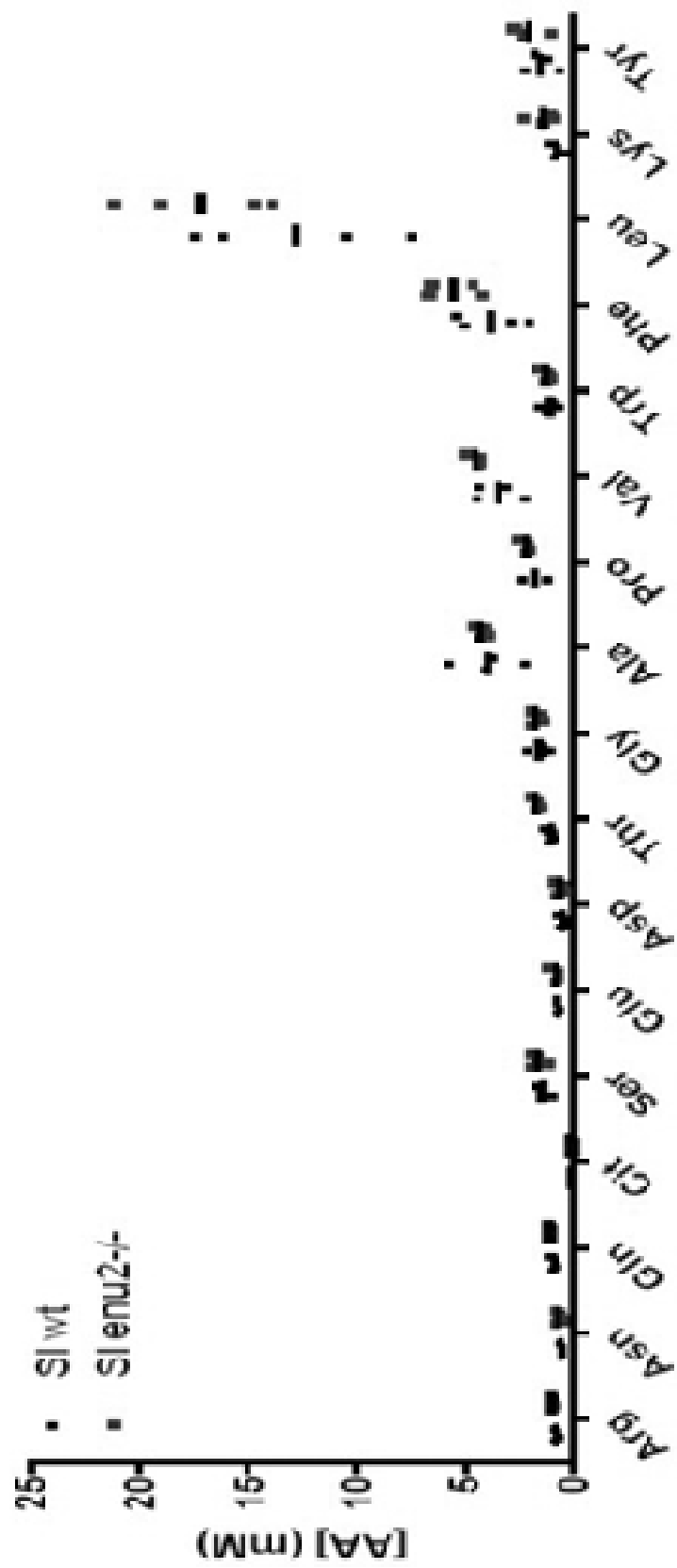


Fig. 40C

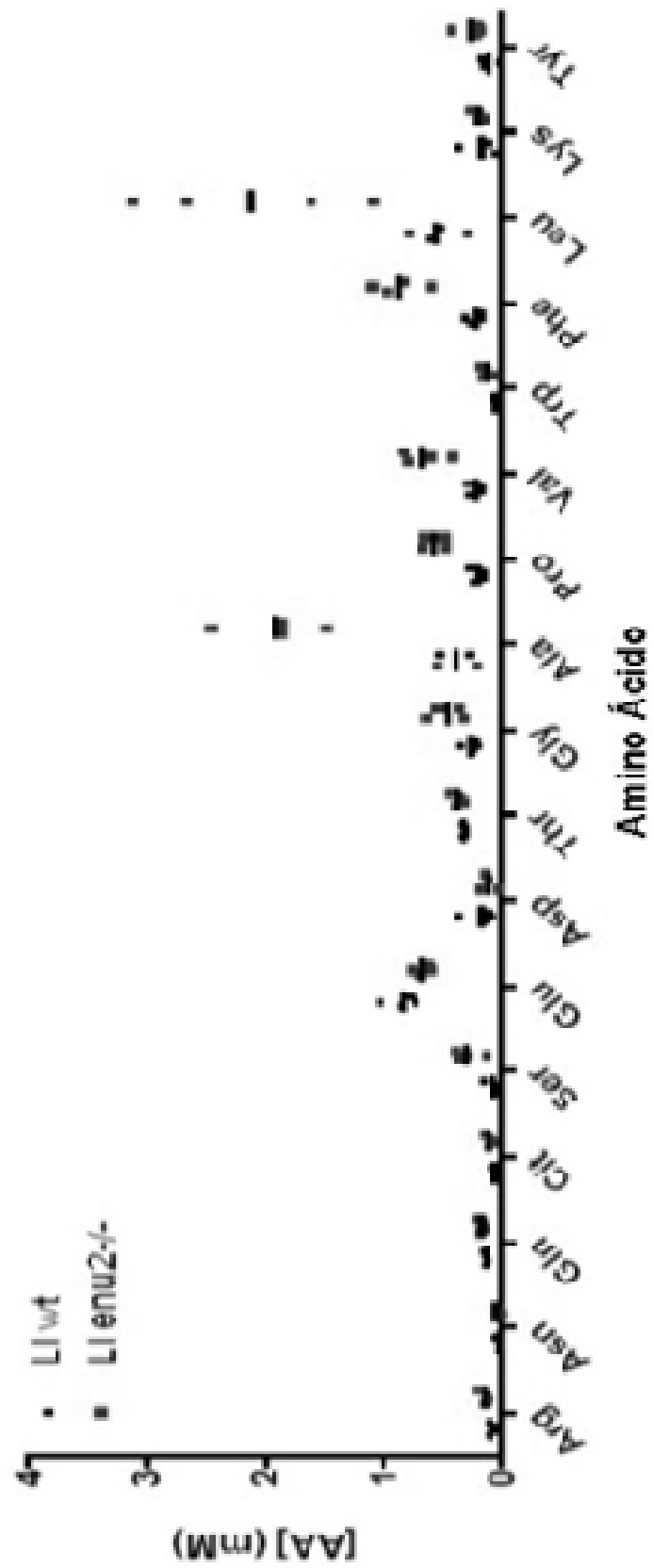


Fig. 41A

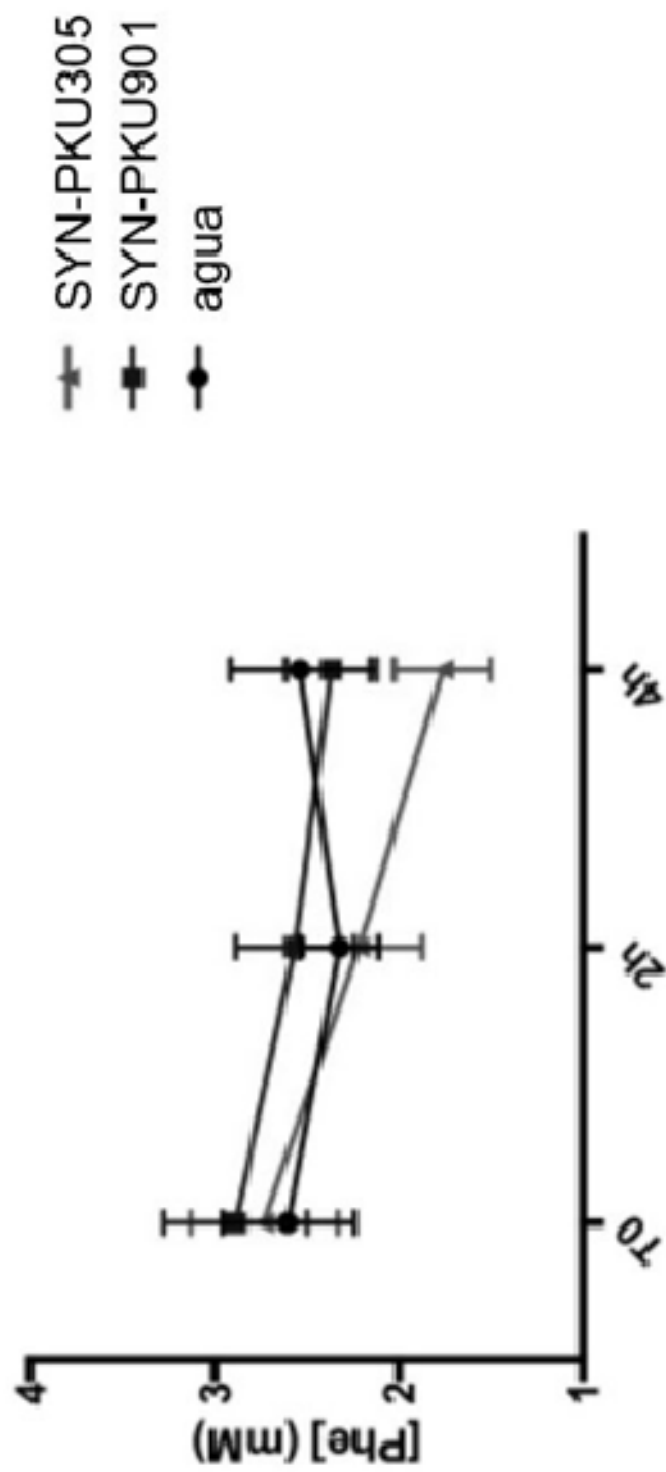


Fig. 42A

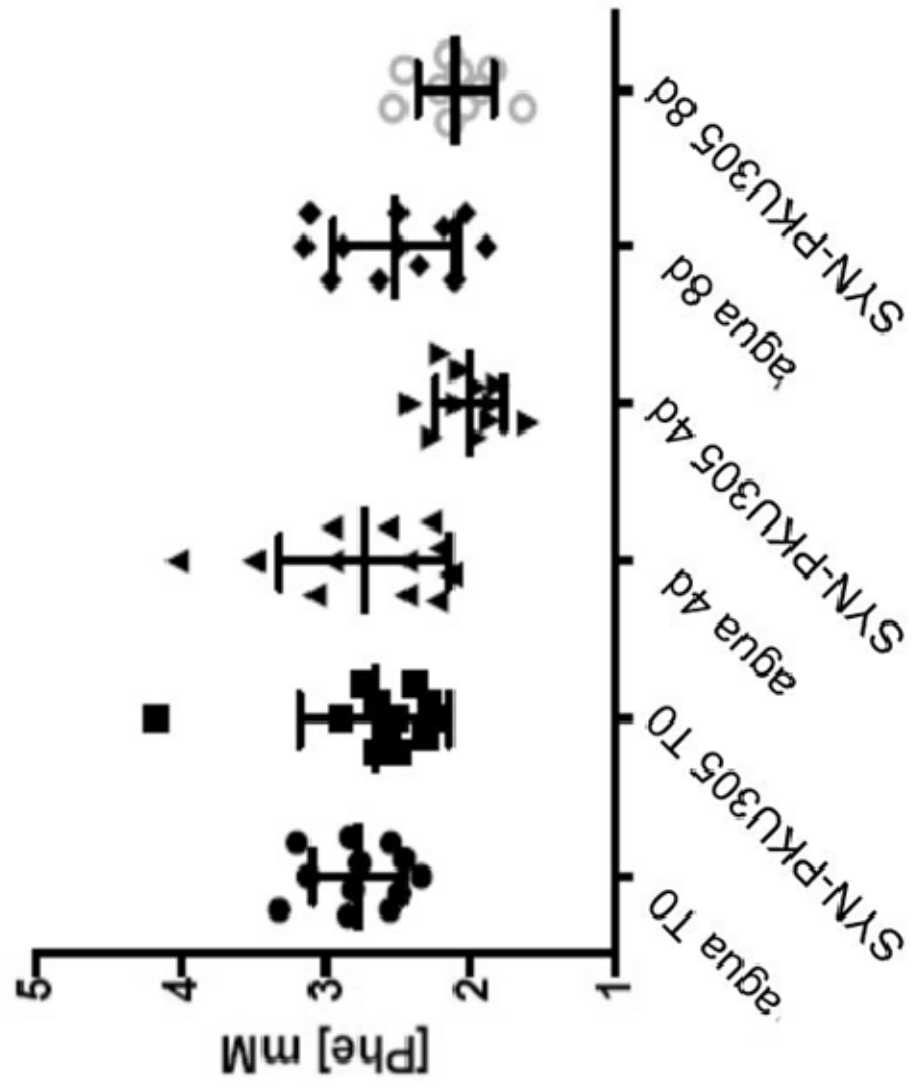


Fig. 42B

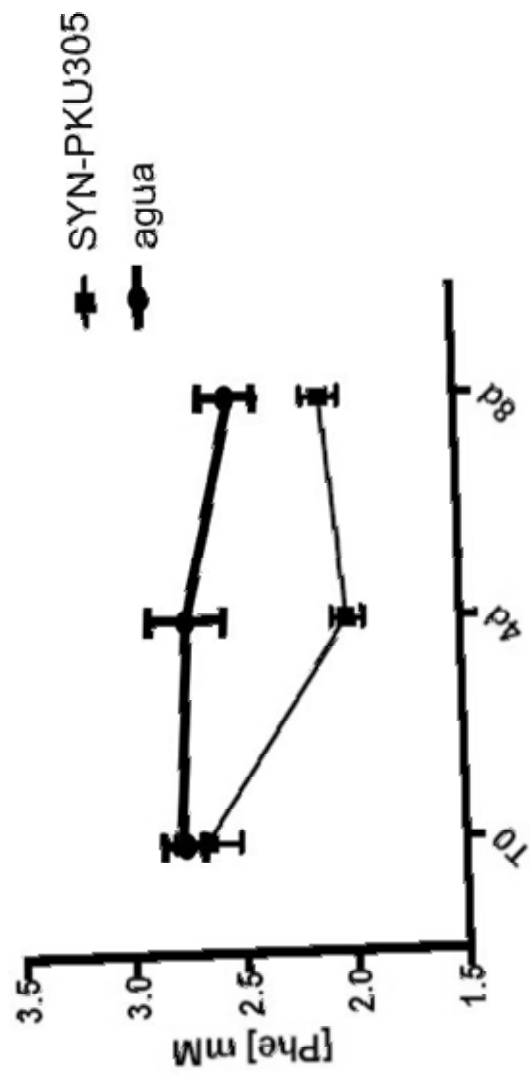


Fig. 43A

Genotipo	Actividad de PAL ($\mu\text{mol/h}$)	% de disminución en $\Delta[\text{pHe}]$
5XPAL; 1XpheF; ΔthyA	18	0
5XPAL; 1XpheF; ΔthyA	32	12
2XPAL; 1XpheF	40	17
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD	160	31
pSC101-PAL3; 1XpheF	61	45
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD	150	50
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD	176	53
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD; ΔthyA	204	16
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD; ΔthyA	83	20
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD; ΔdapA	227	41
3XPAL; 2XpheF; 1XLAAD; fmrS-LAAD	91	24
3XPAL; 2XpheF; 1XPara-fmrS24Y	506	47
3XPAL; 2XpheF; 1XPara-fmrS24Y	269	46

Fig. 43B

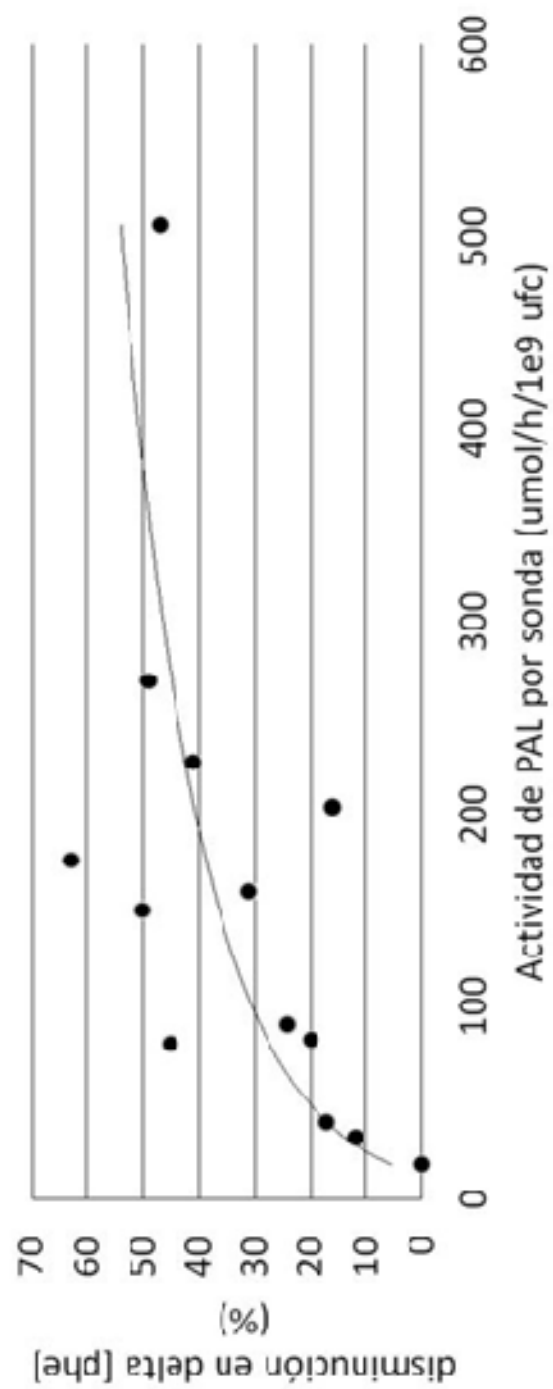


Fig. 44A

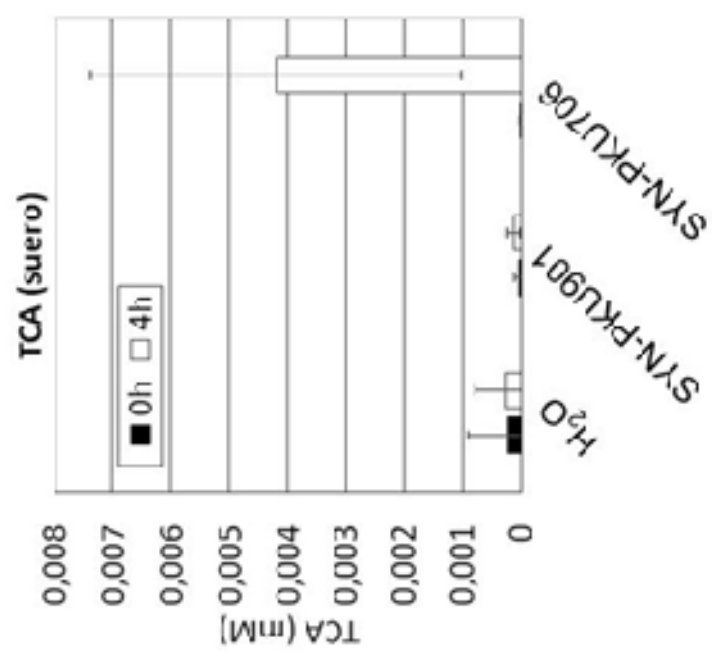


Fig. 44B

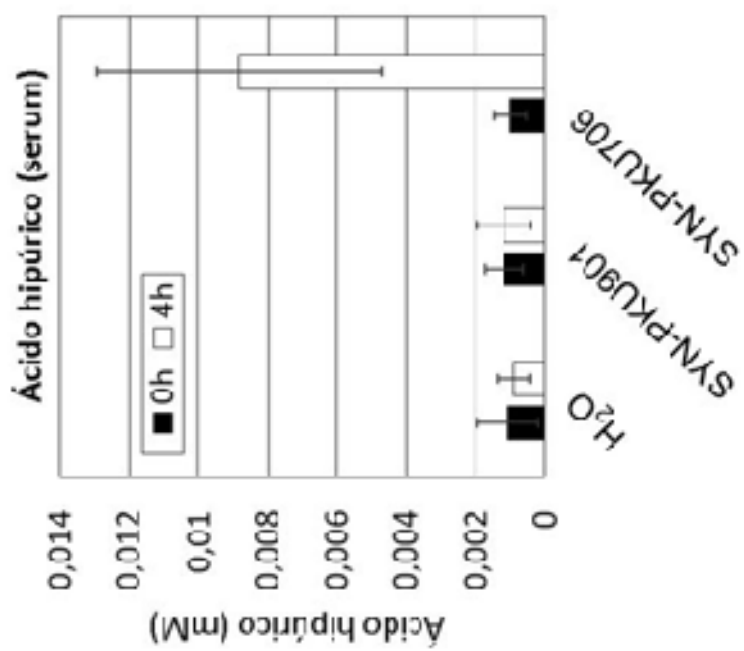


Fig. 44C

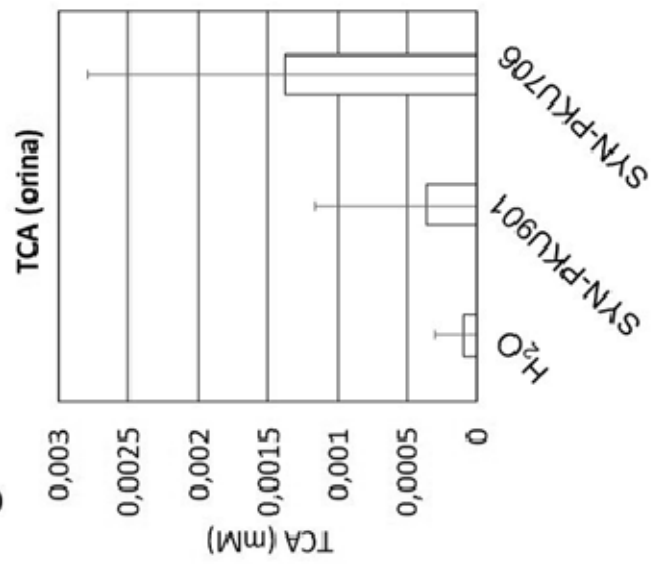


Fig. 44D

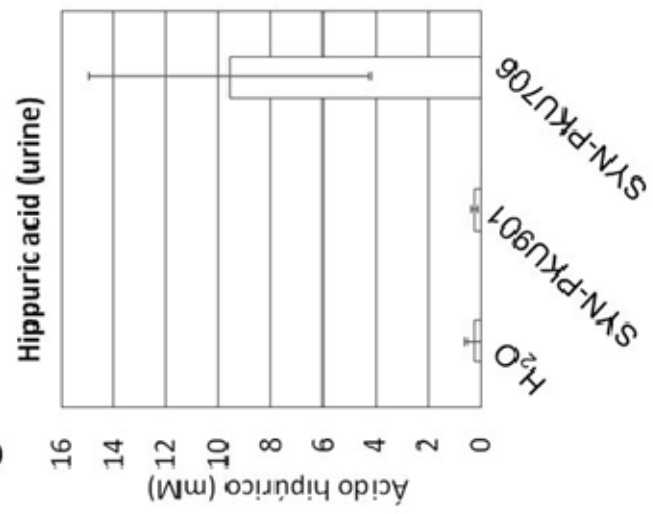


Fig. 45A

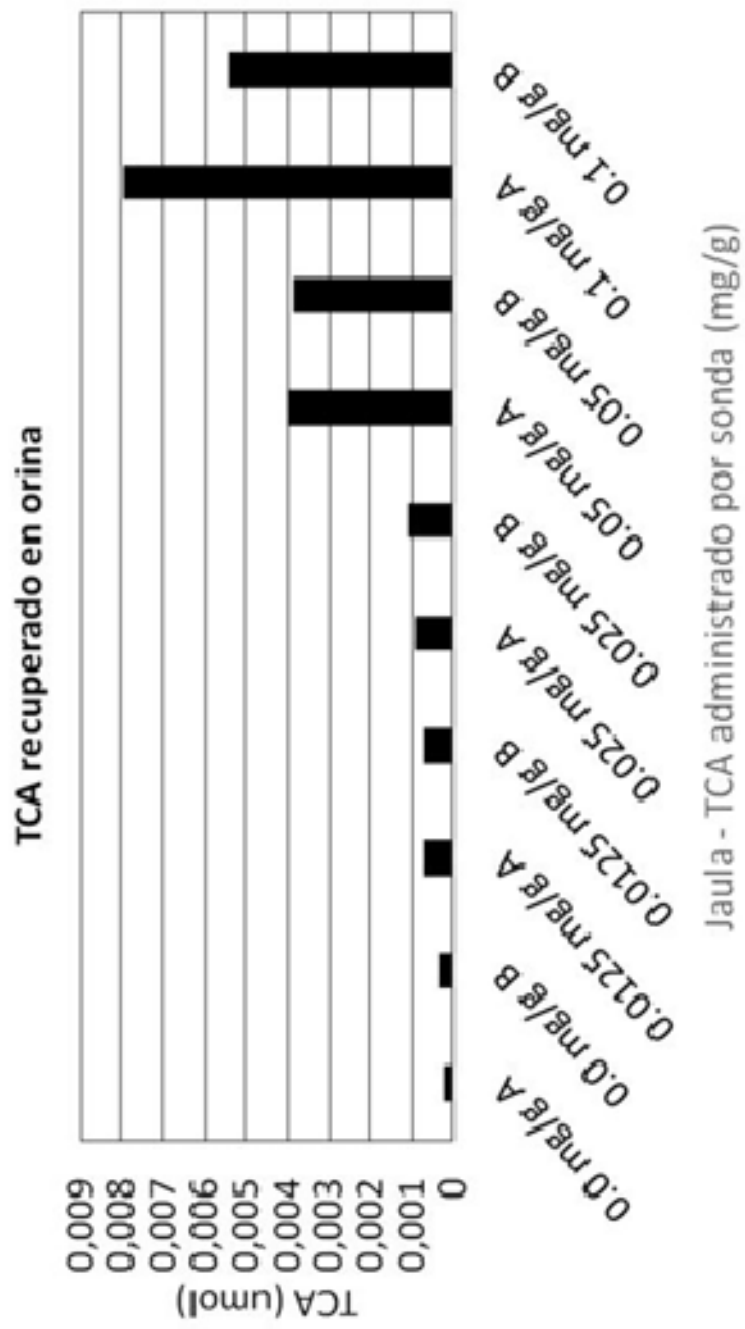


Fig. 45B

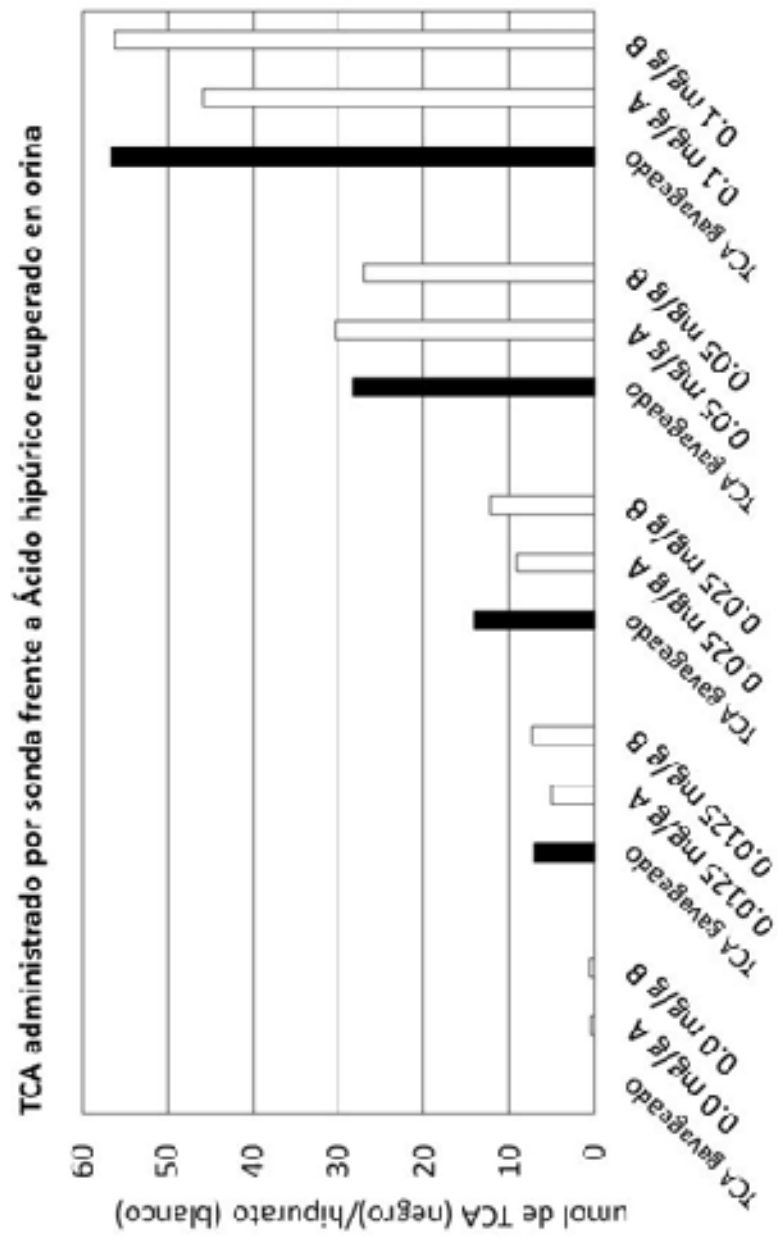


Fig. 46

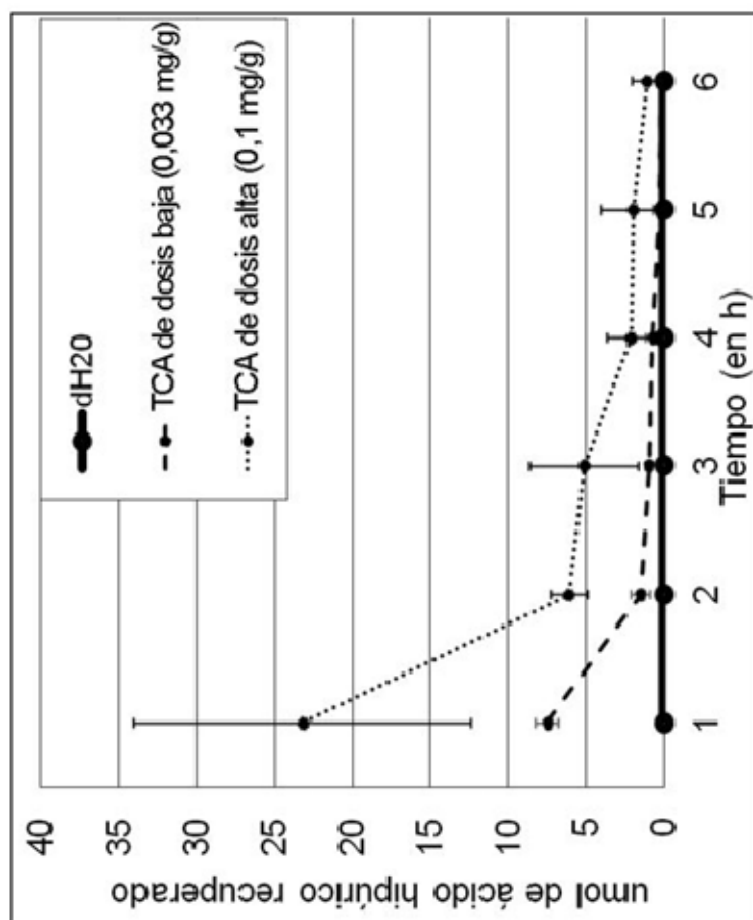


Fig. 47A

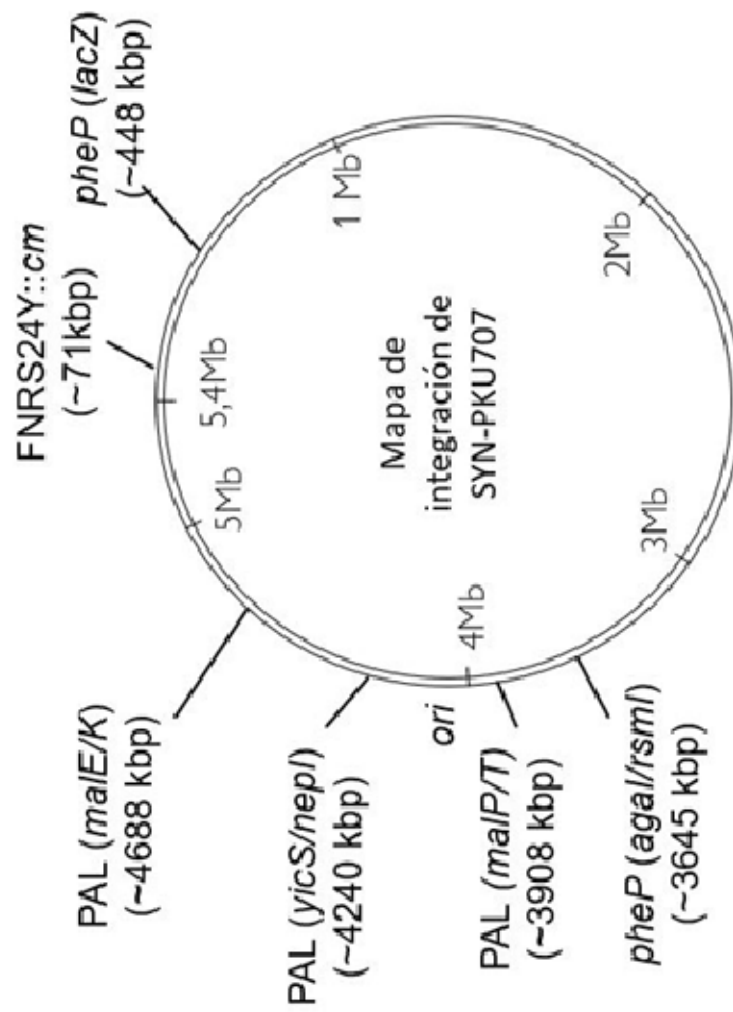


Fig. 47B

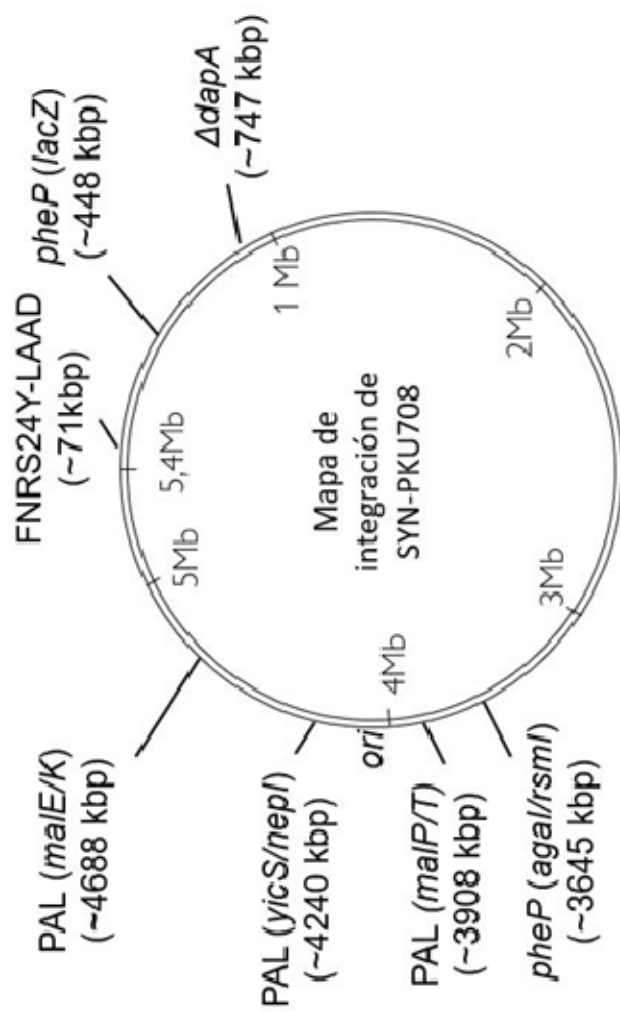


Fig. 47C

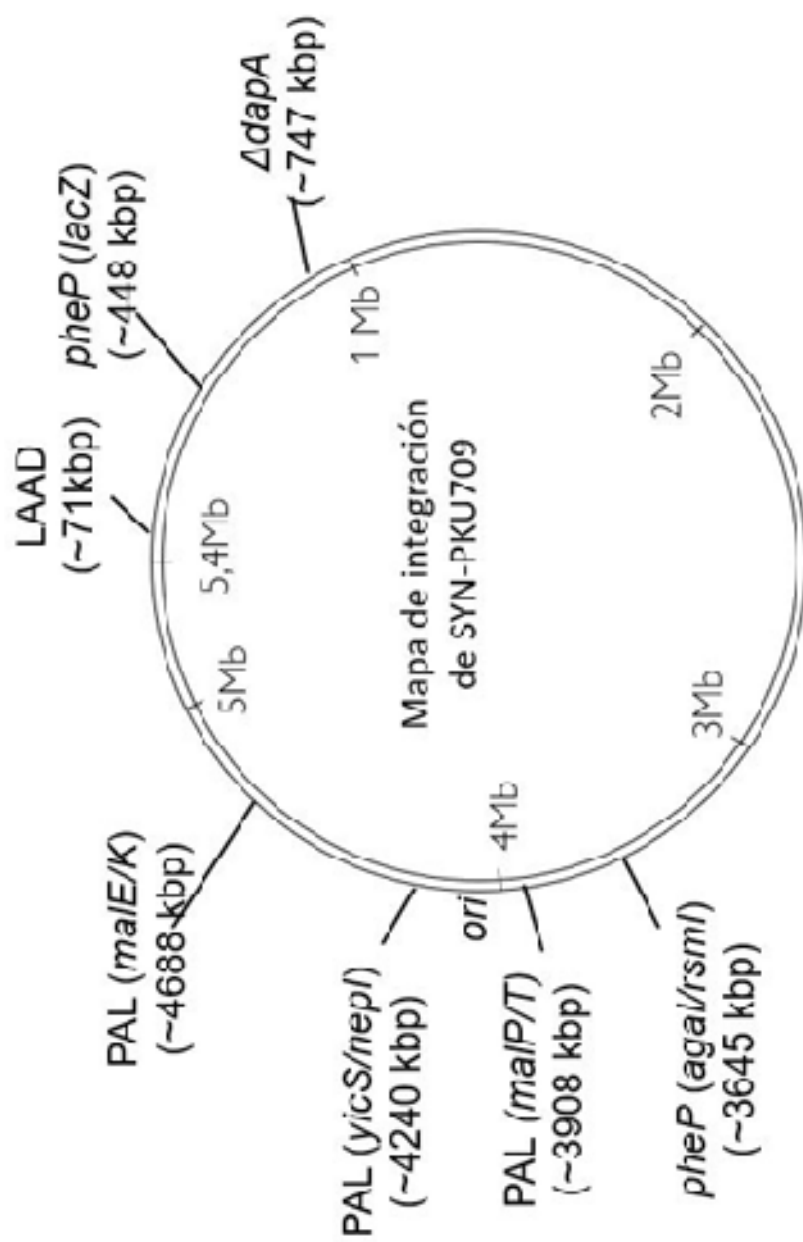


Fig. 47D

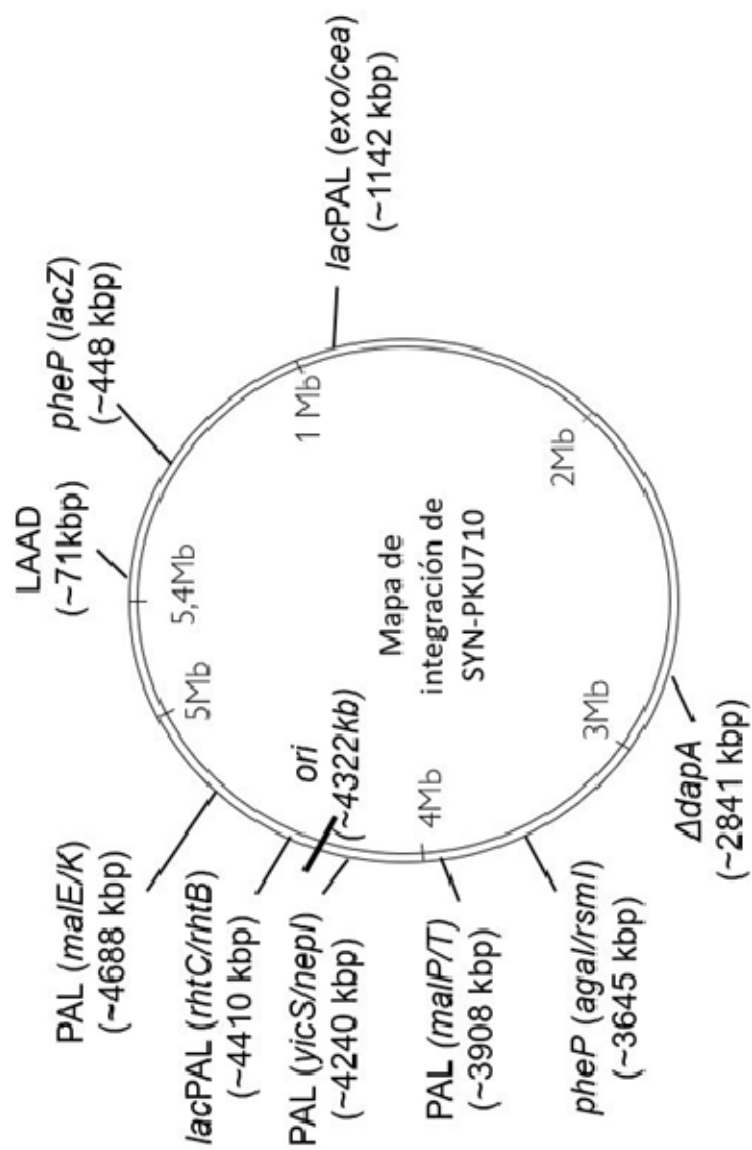


Fig. 47E

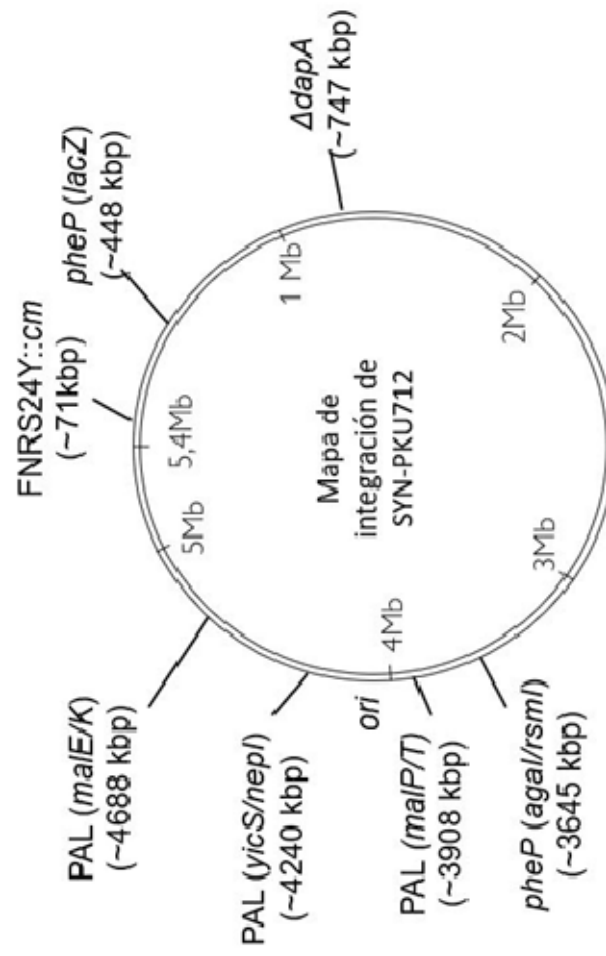


Fig. 47F

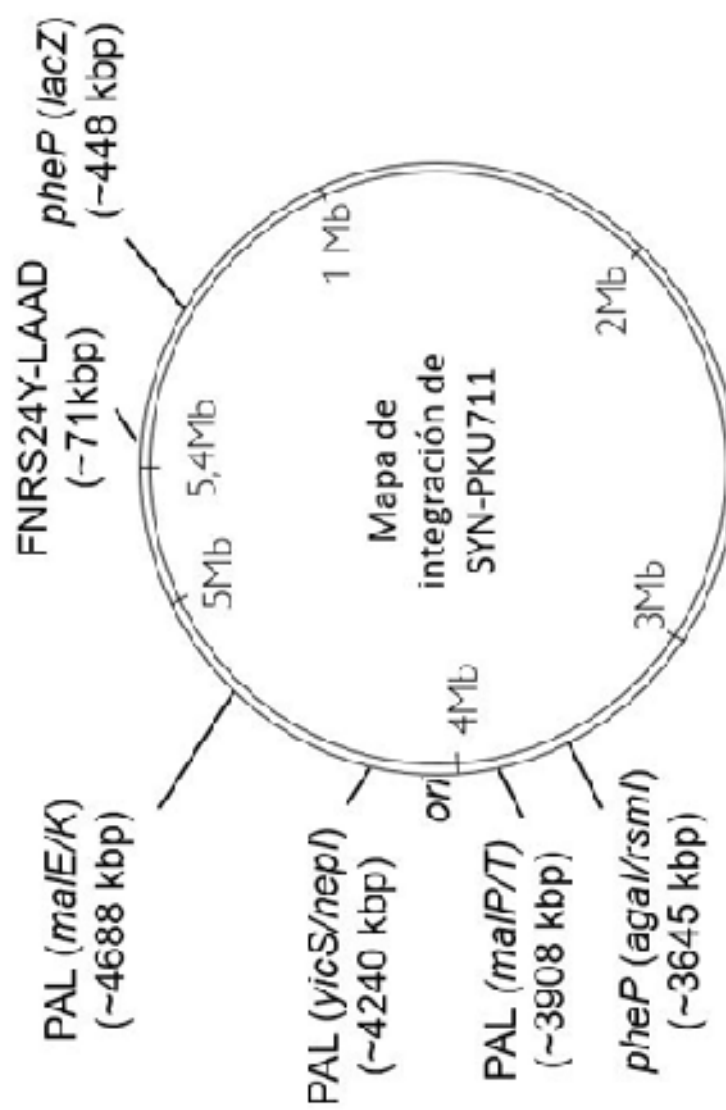


Fig. 48A

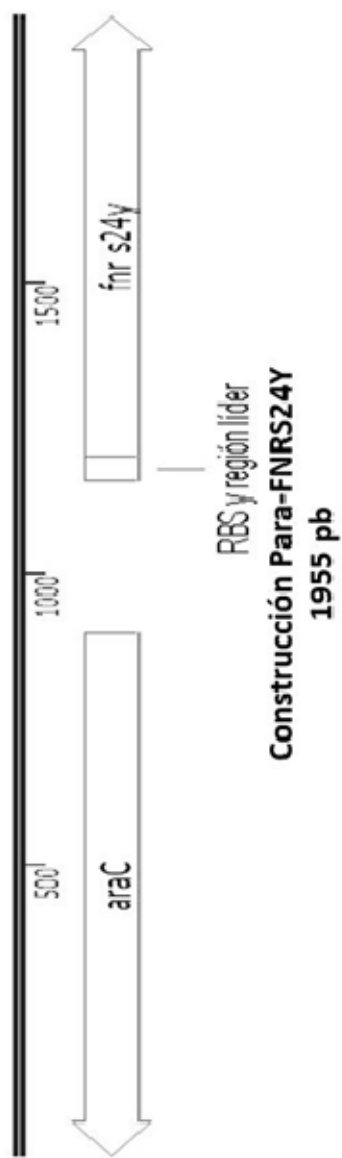


Fig. 48B

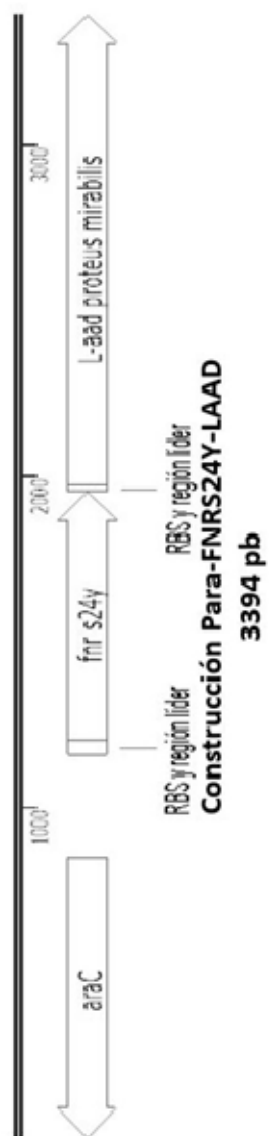


Fig. 49

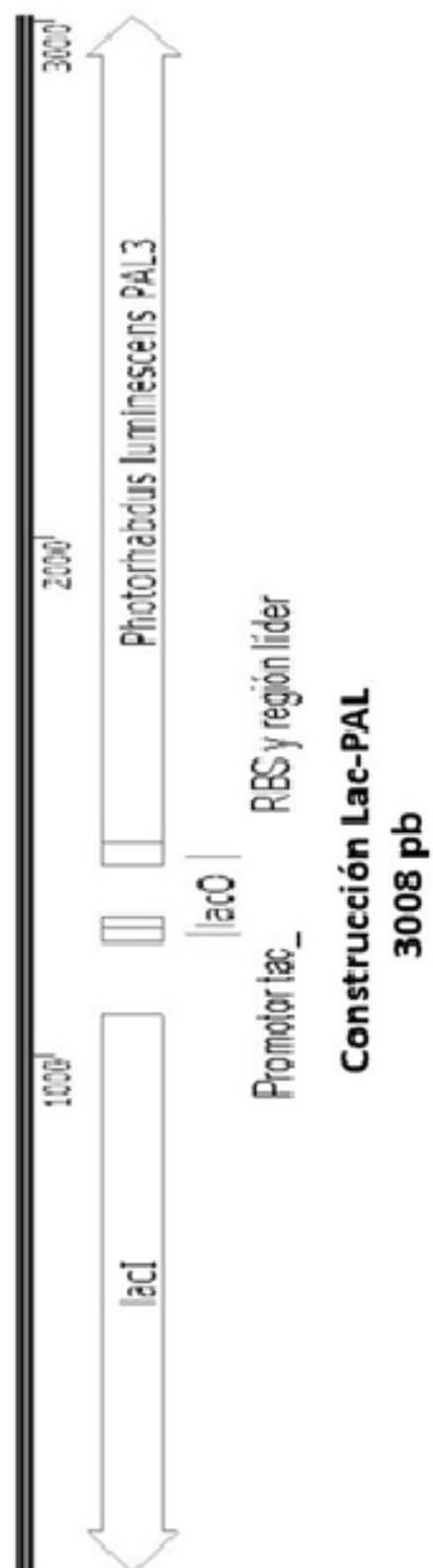


Fig. 50

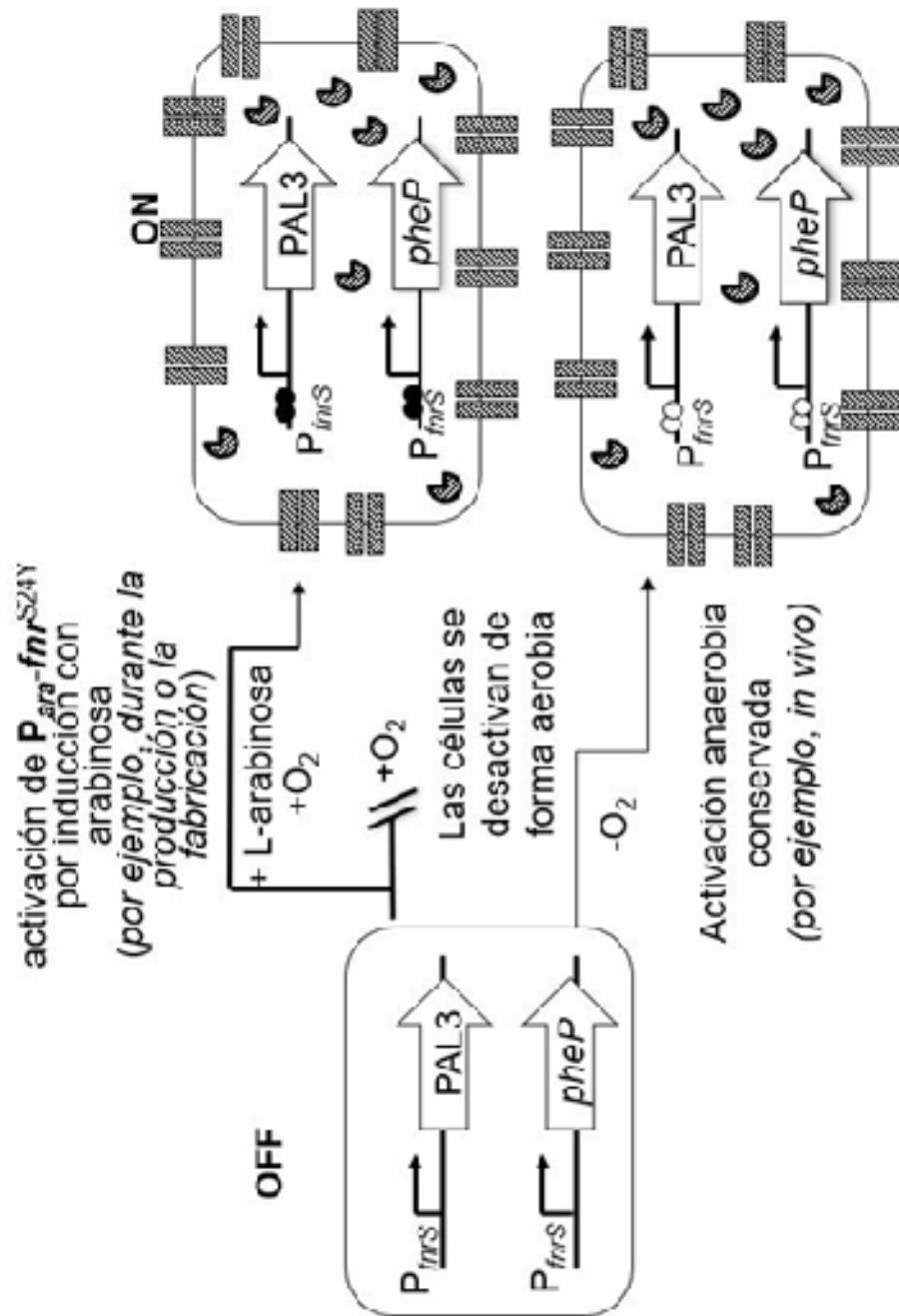


Fig. 51

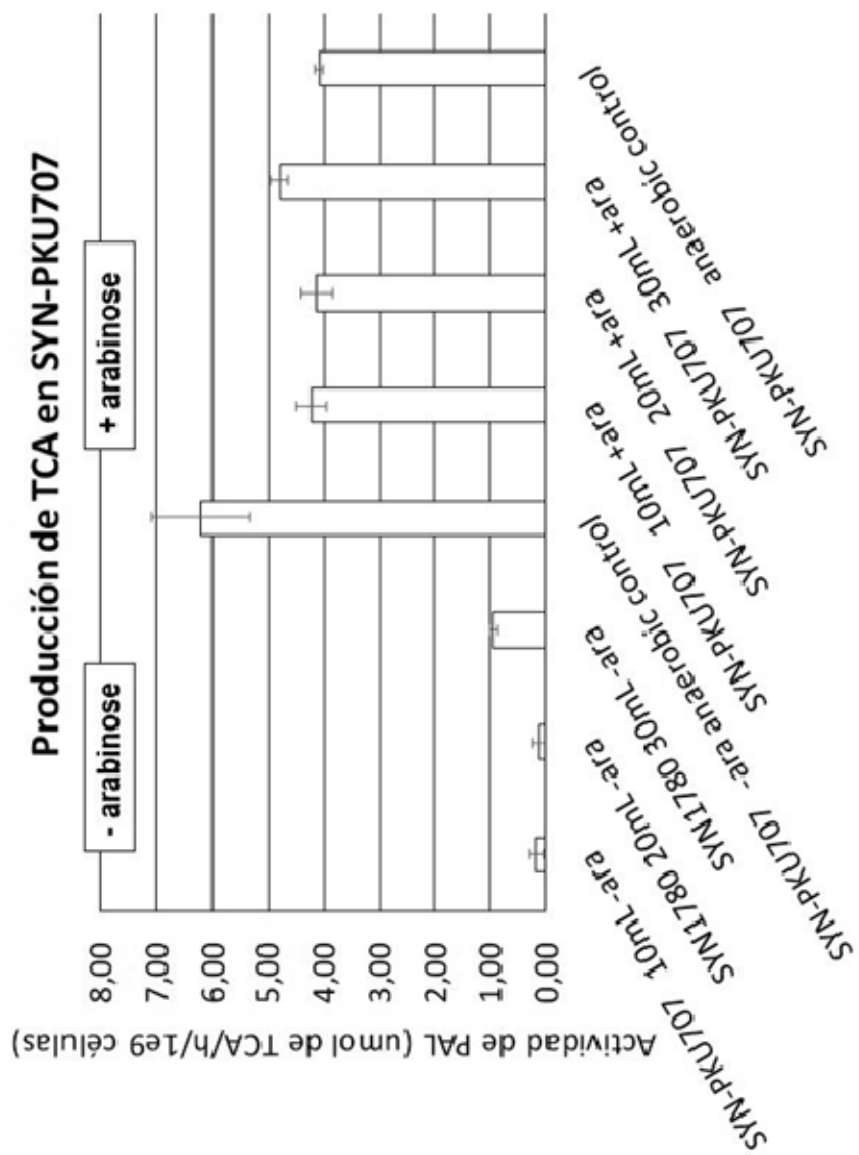


Fig. 52

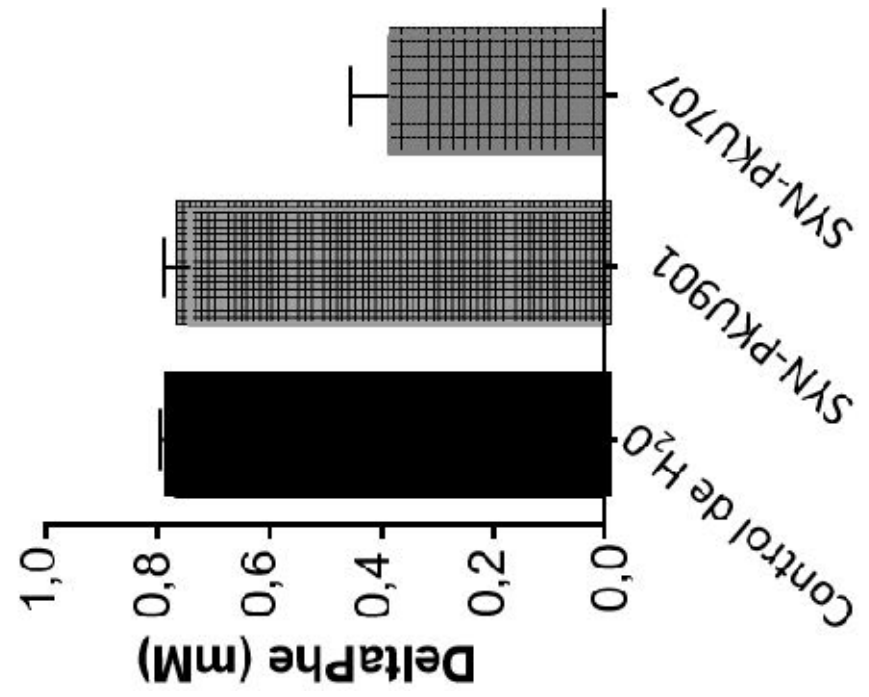


Fig. 53

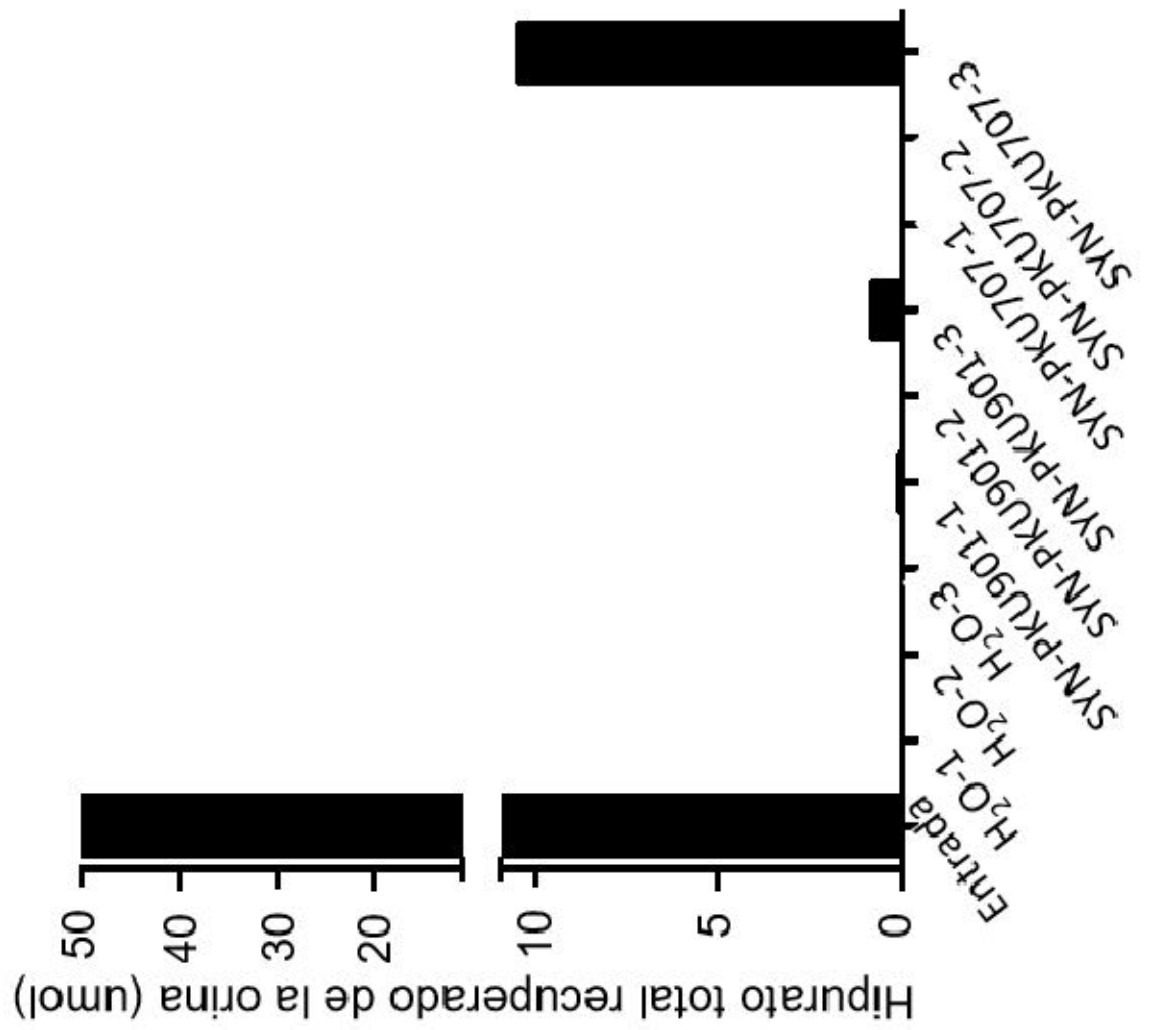


Fig. 54A

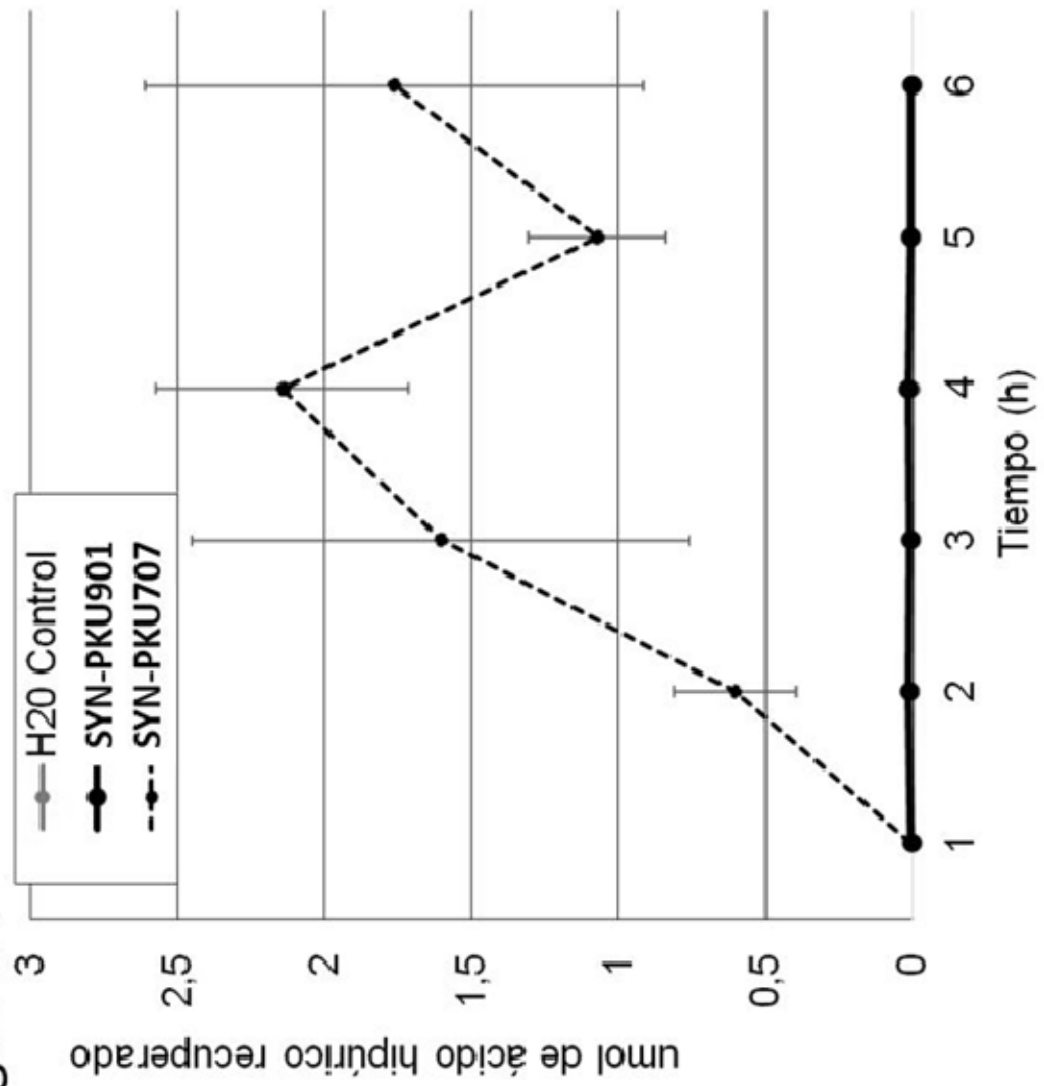
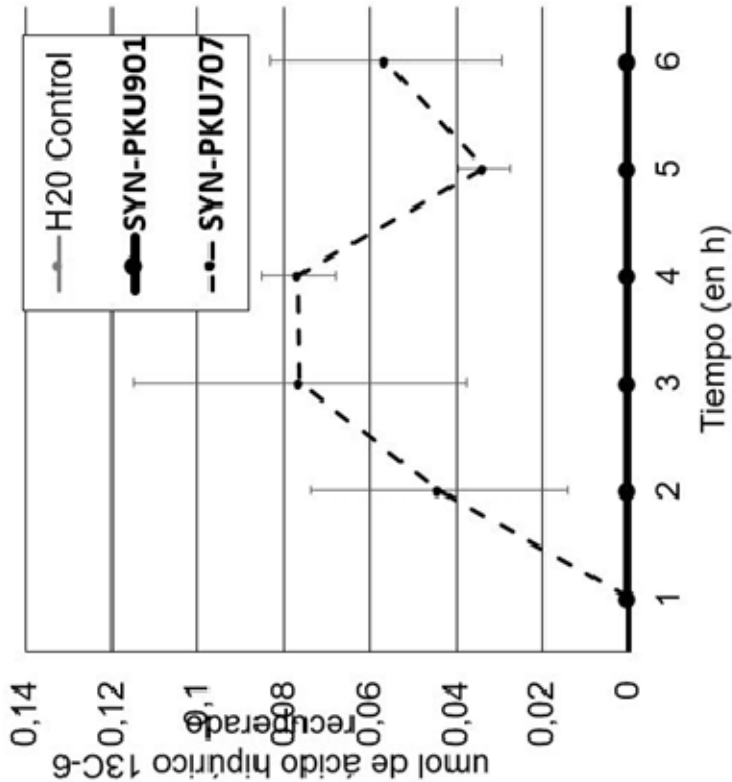


Fig. 54B



SYN1780 – 3XP_{hrs}-PAL3; 2XP_{hrs}pheP; P_{ara}-fms24Y

Fig. 55

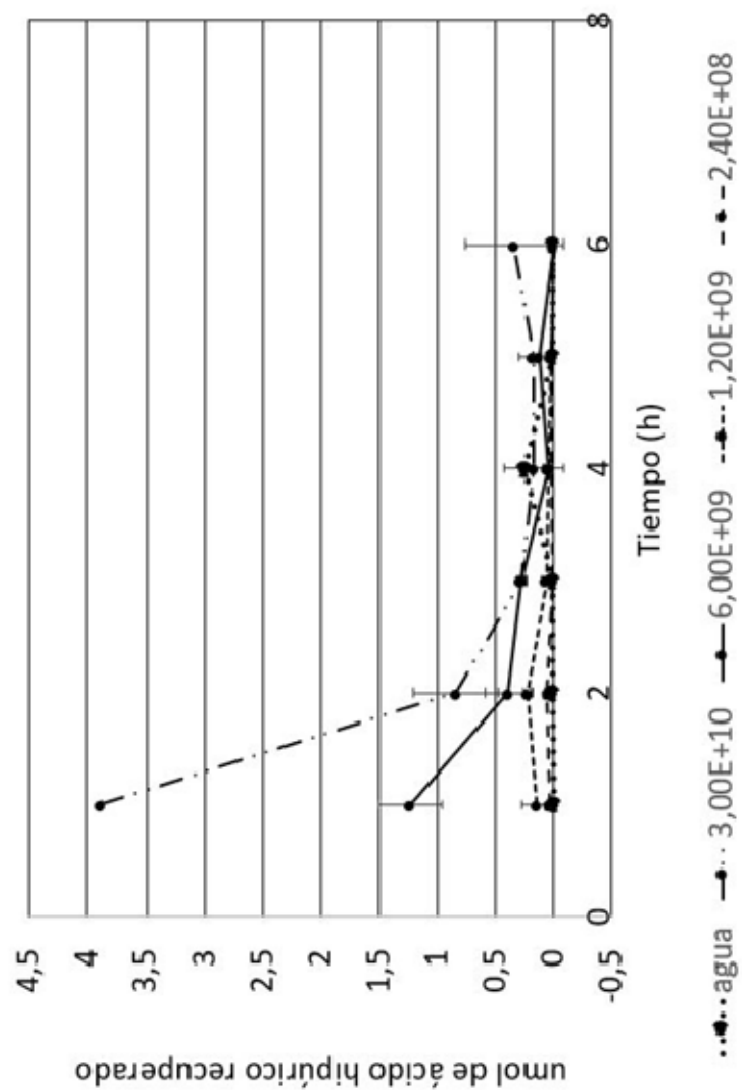


Fig. 56

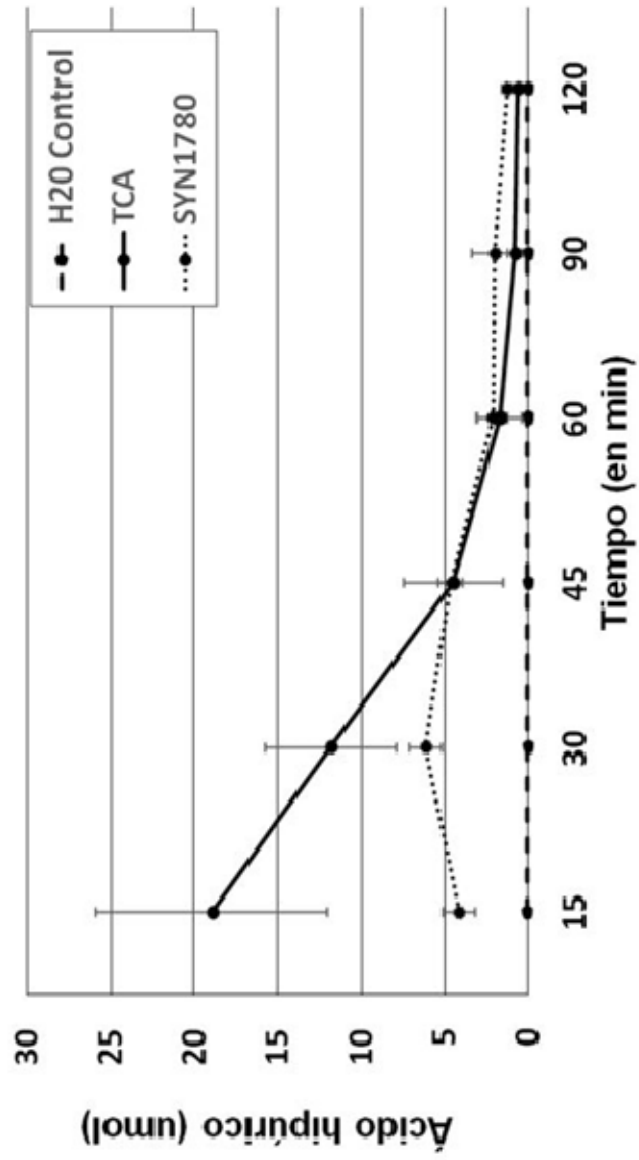
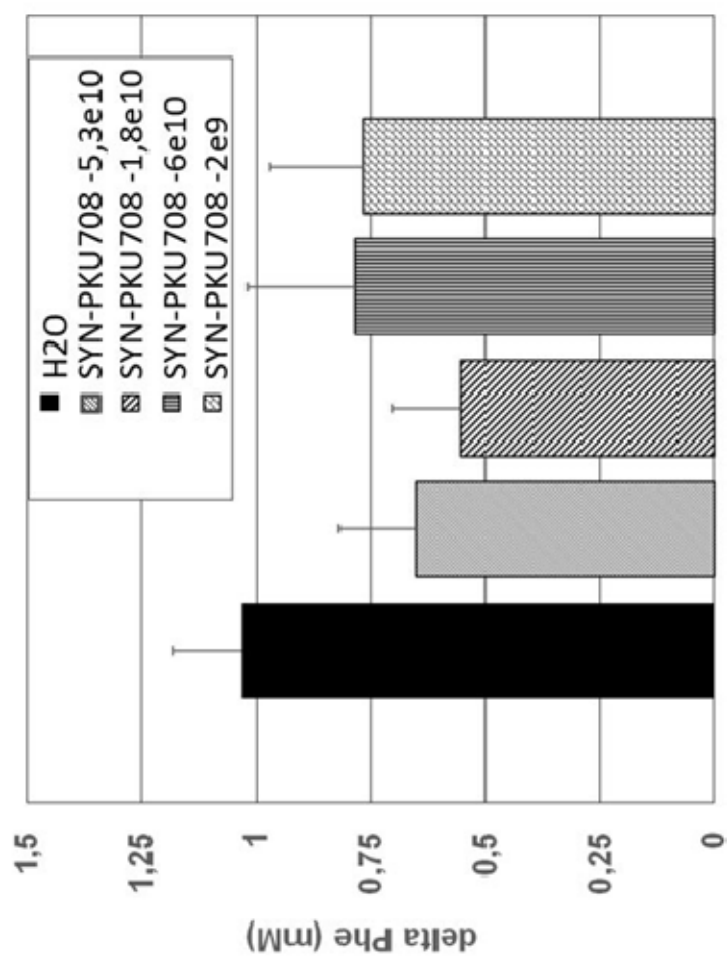


Fig. 57A



SYN1967 – 3XP_{tnrS}-PAL3; 2XP_{tnrS}-pheP; P_{ara}-tnrS24Y-LAAD; ddapA

Fig. 57B

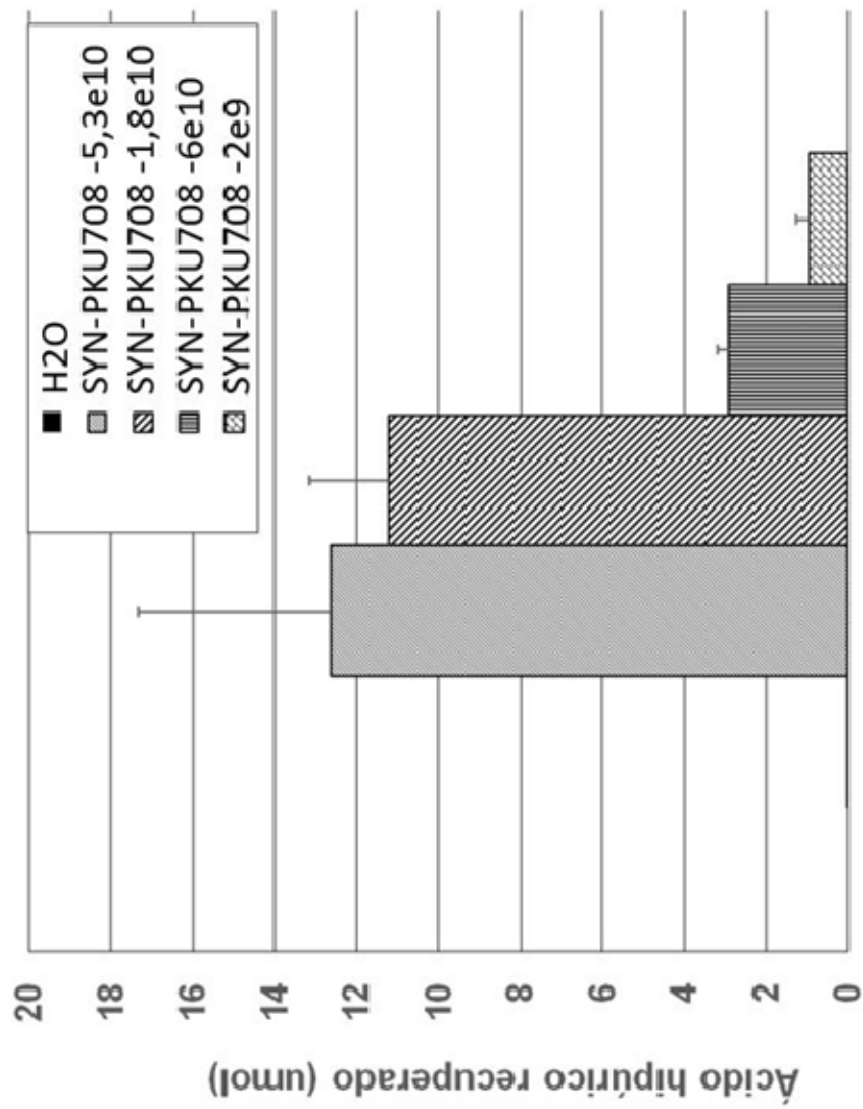


Fig. 58A

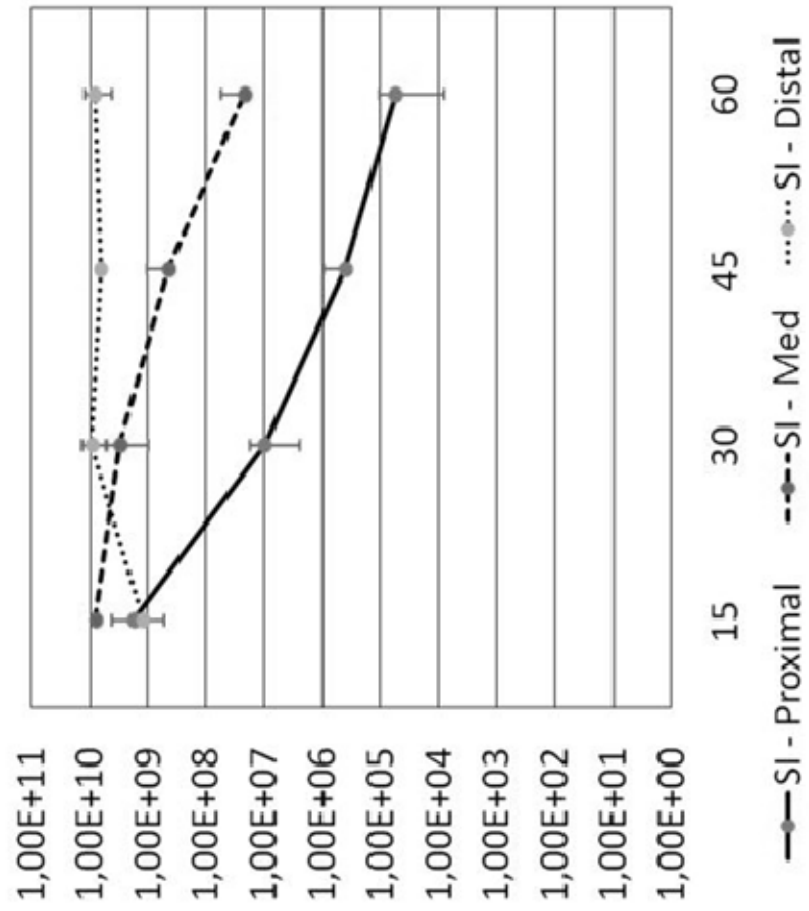


Fig. 58B

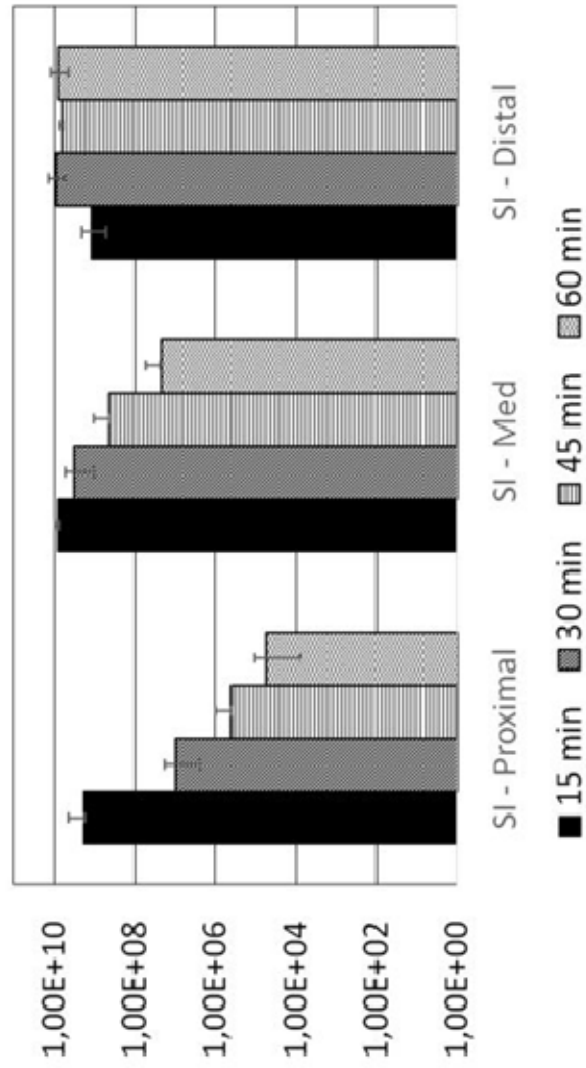


Fig. 59A

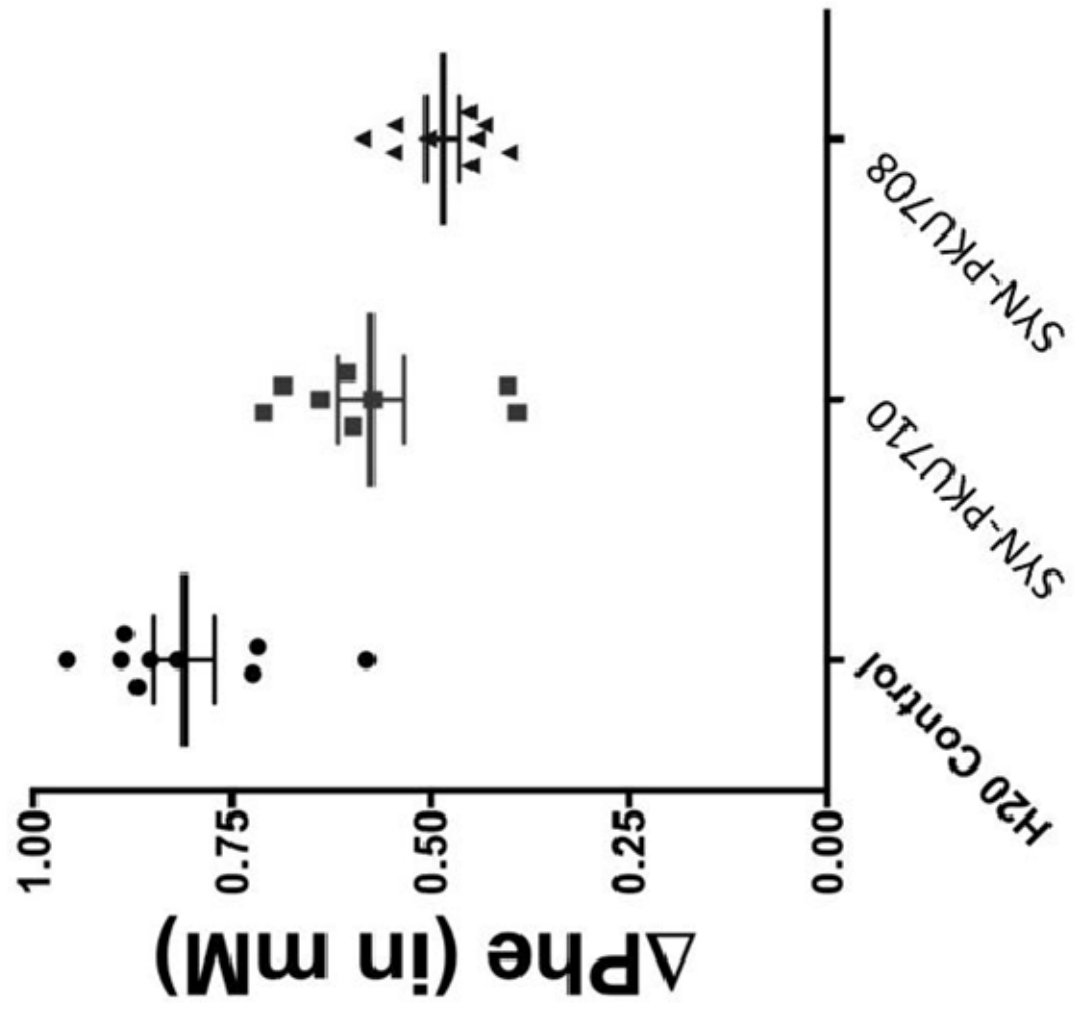


Fig. 59B

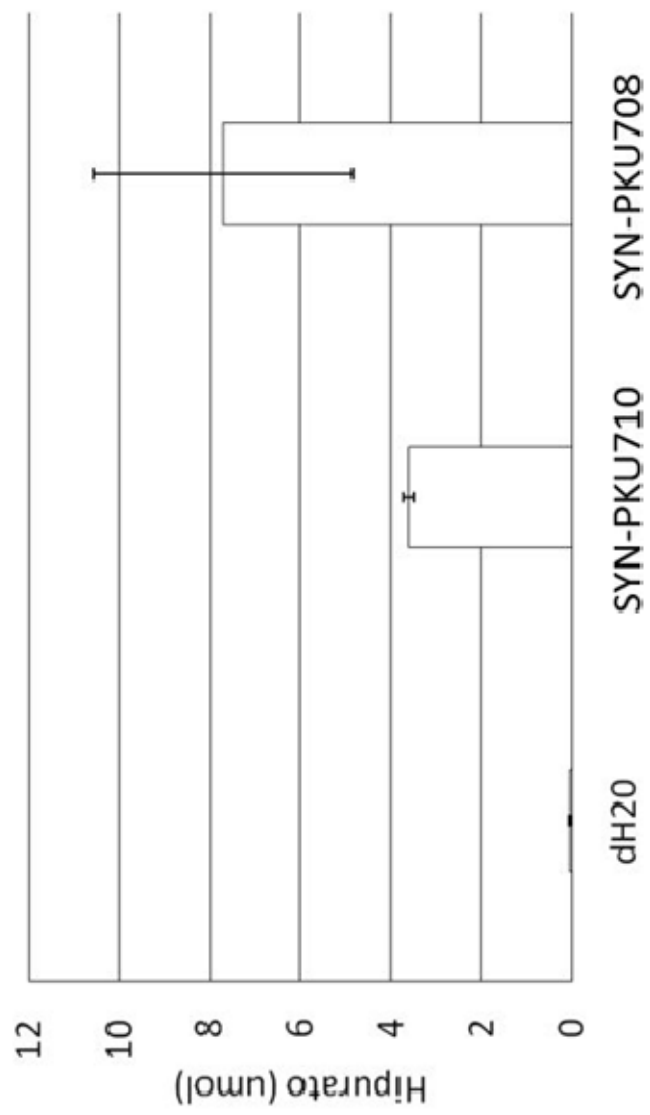


Fig. 60

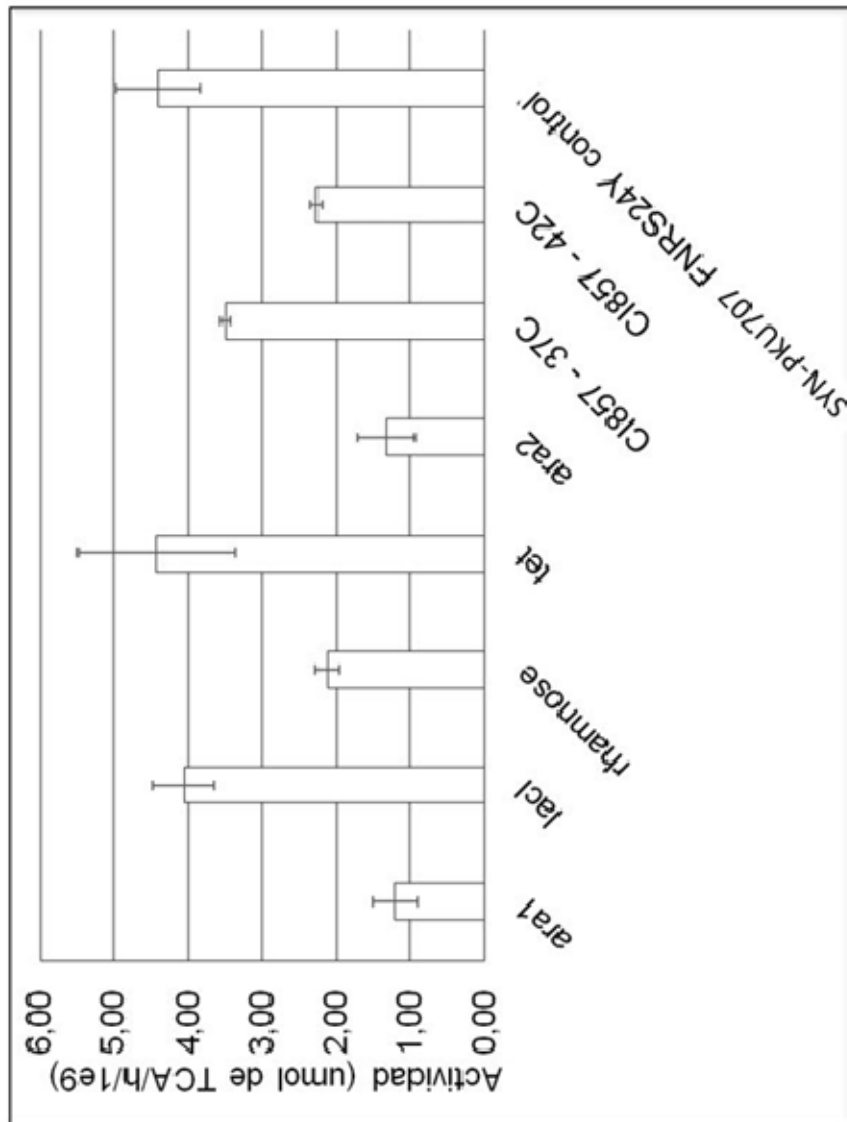


Fig. 61A

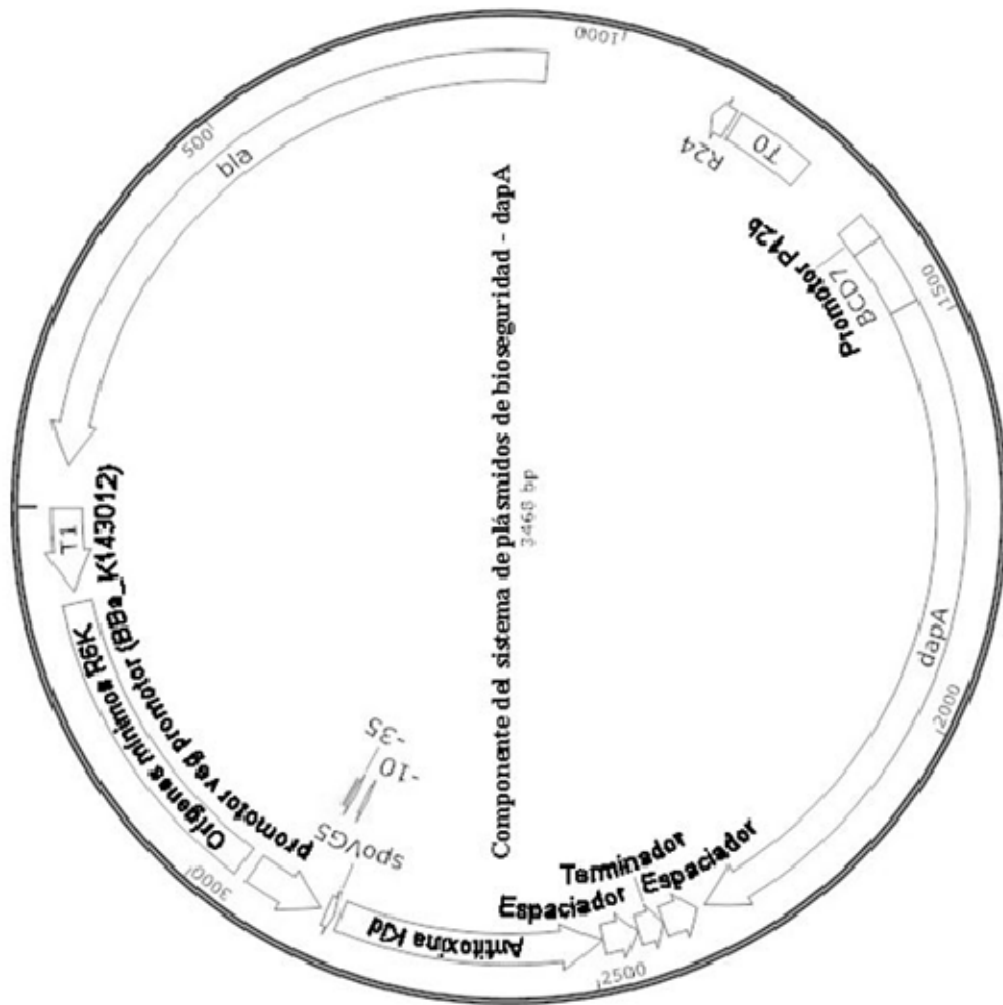


Fig. 61B

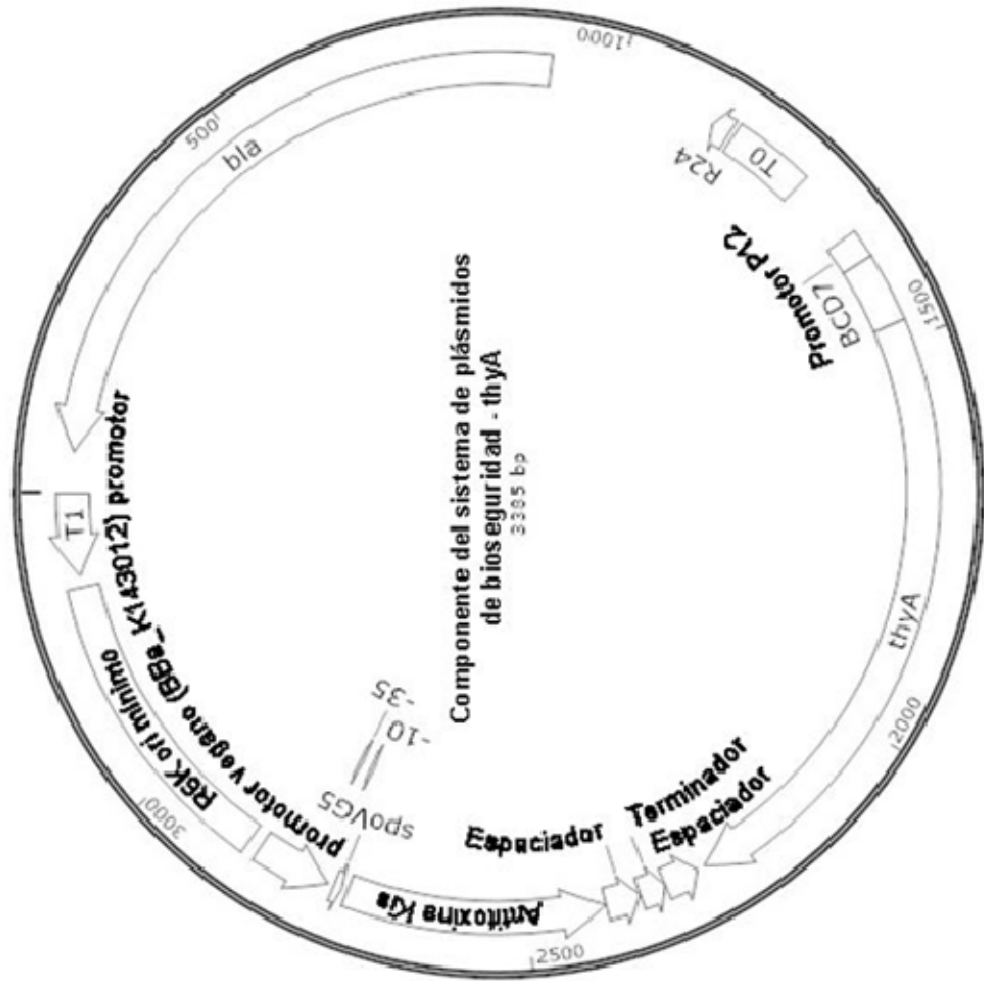


Fig. 61C

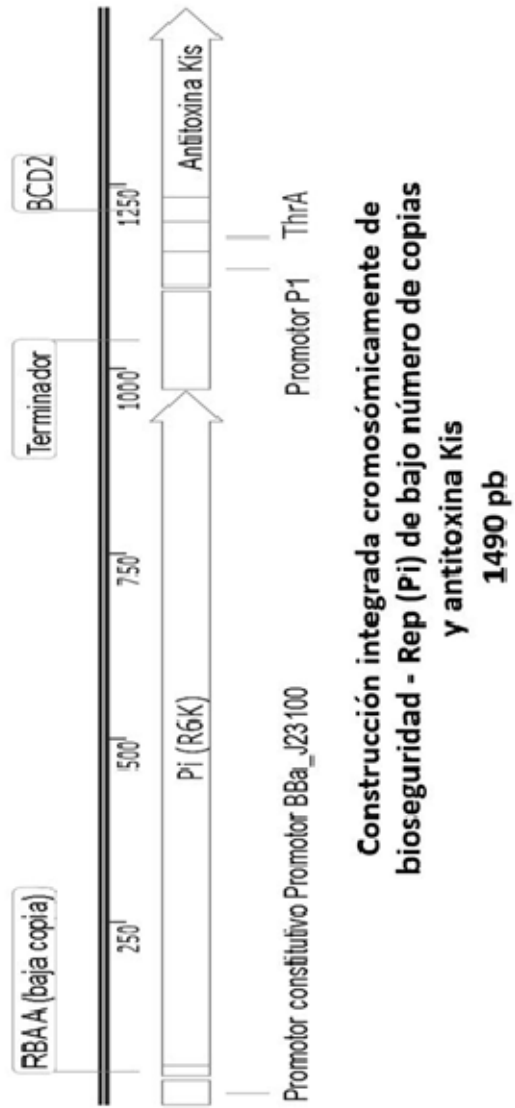


Fig. 61D

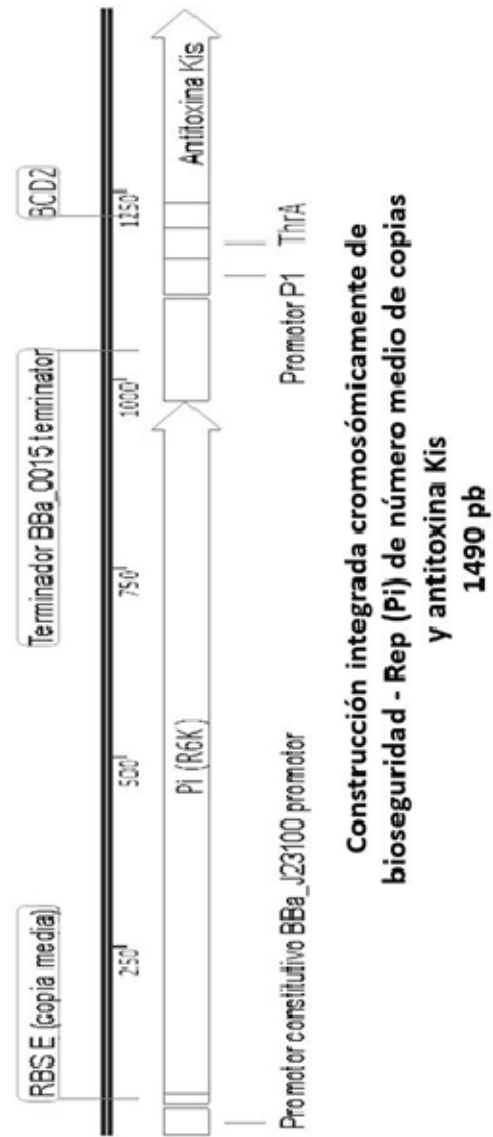
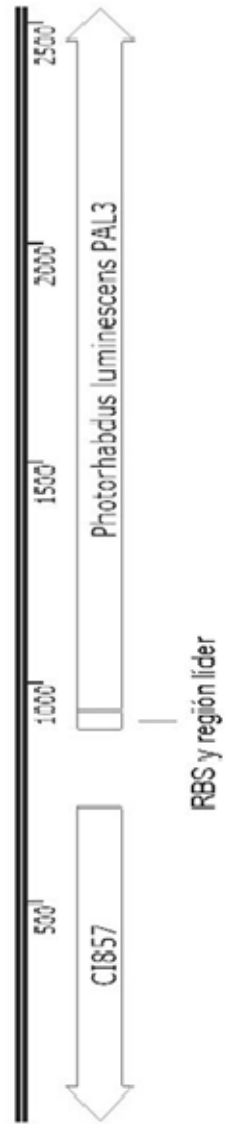


Fig. 62A



Construcción de promotor CI857 sensible a la temperatura - PAL3

Fig. 62B

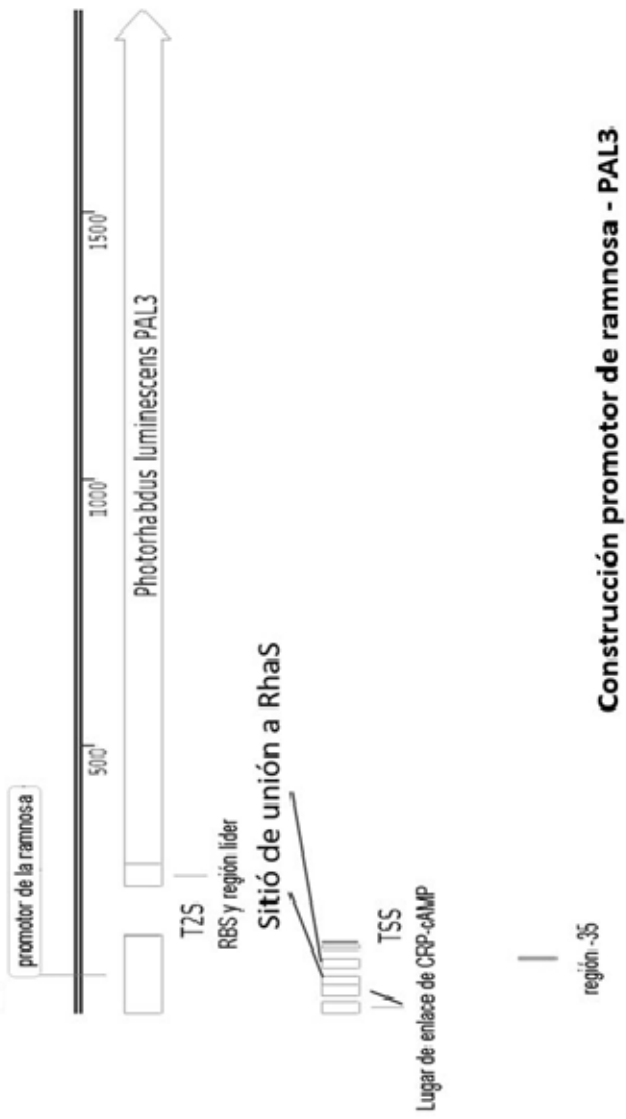


Fig. 62C

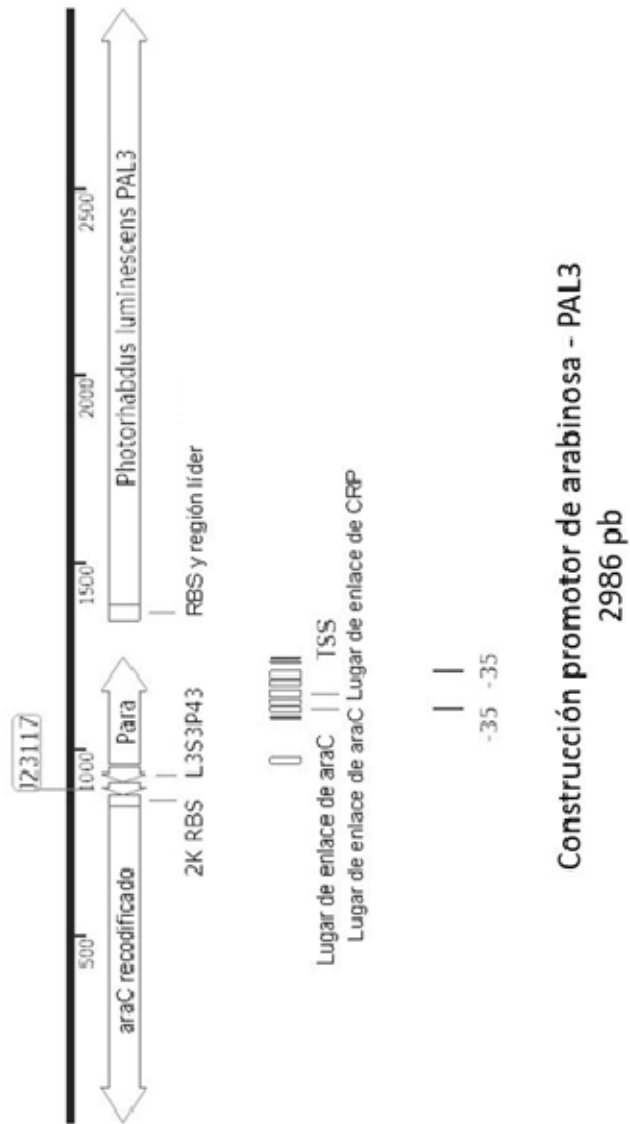


Fig. 63A

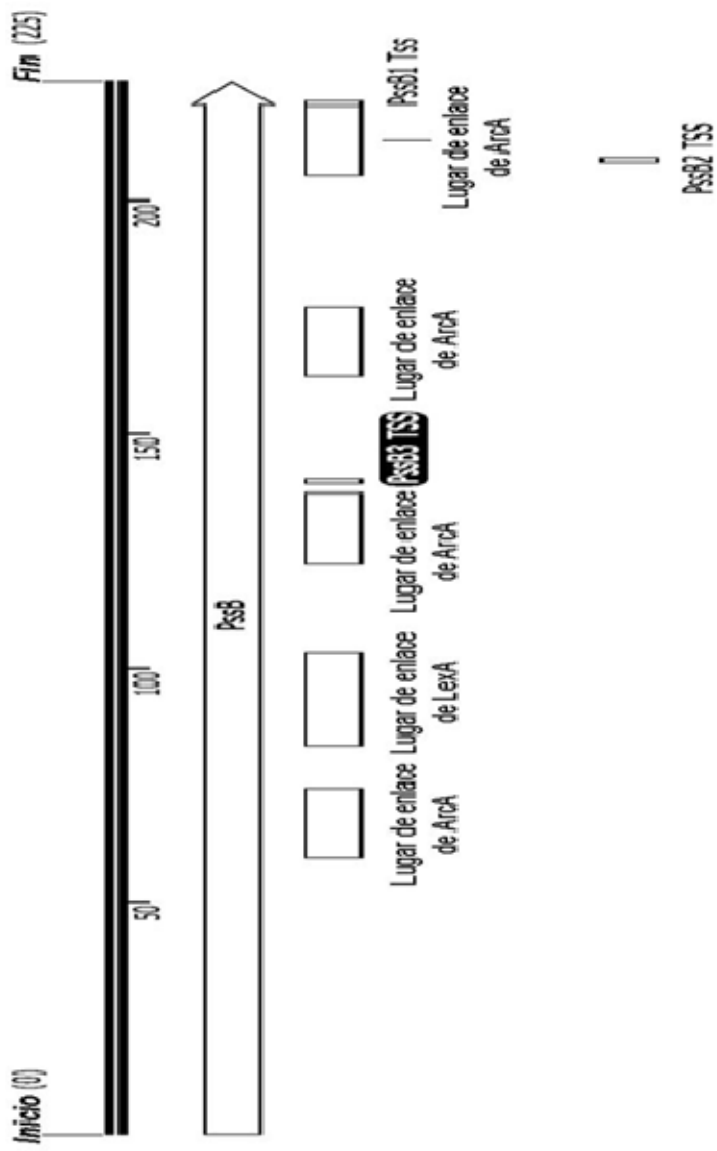


Fig. 63B

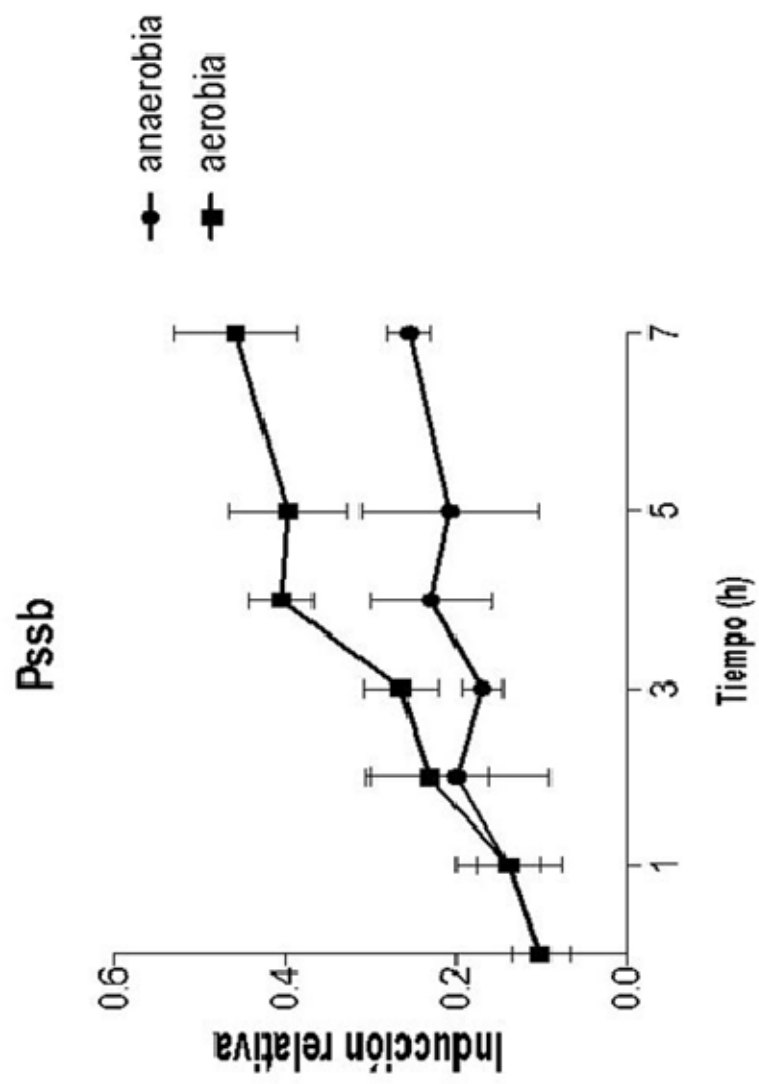


Fig. 64A

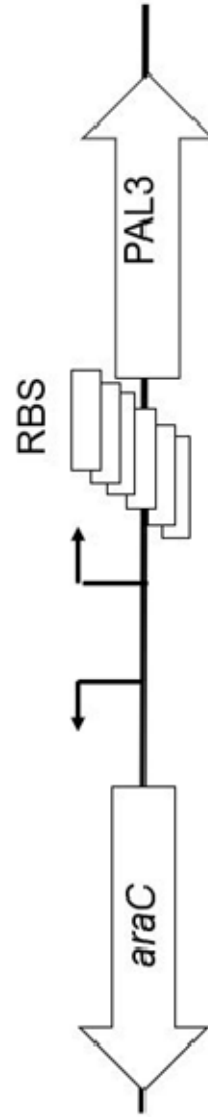


Fig. 64B

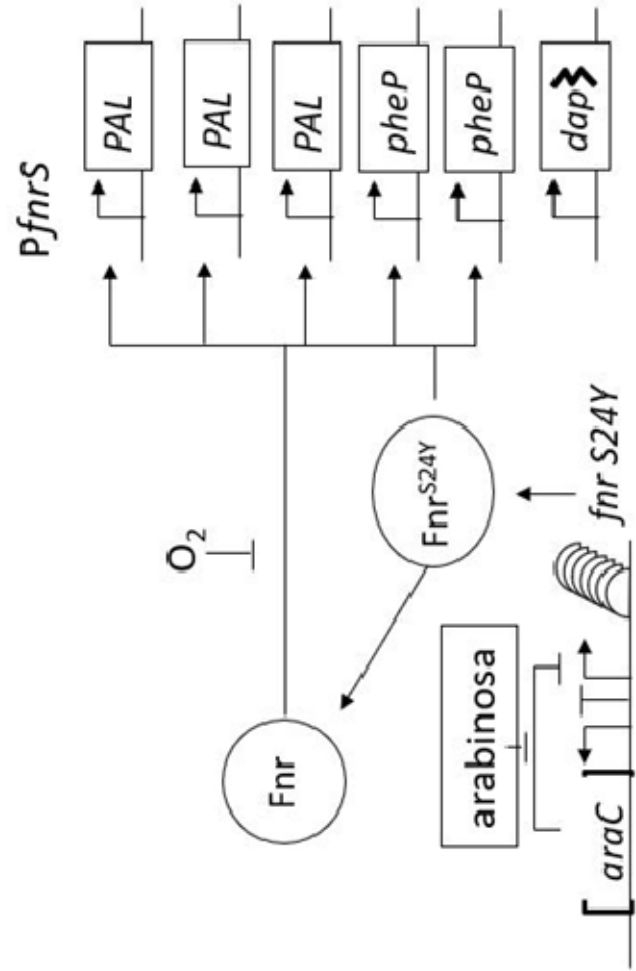


Fig. 65A

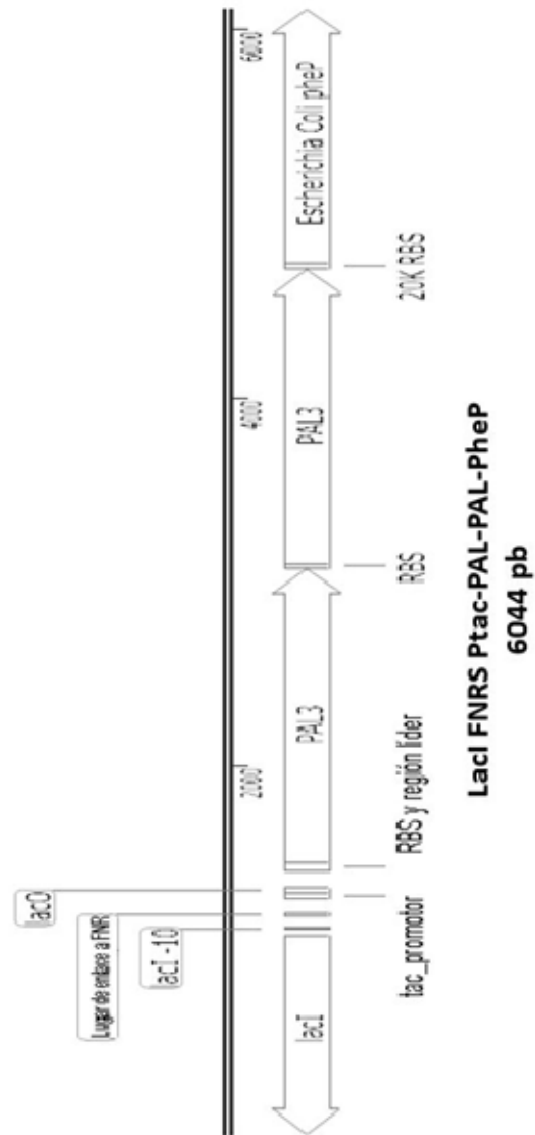


Fig. 65B

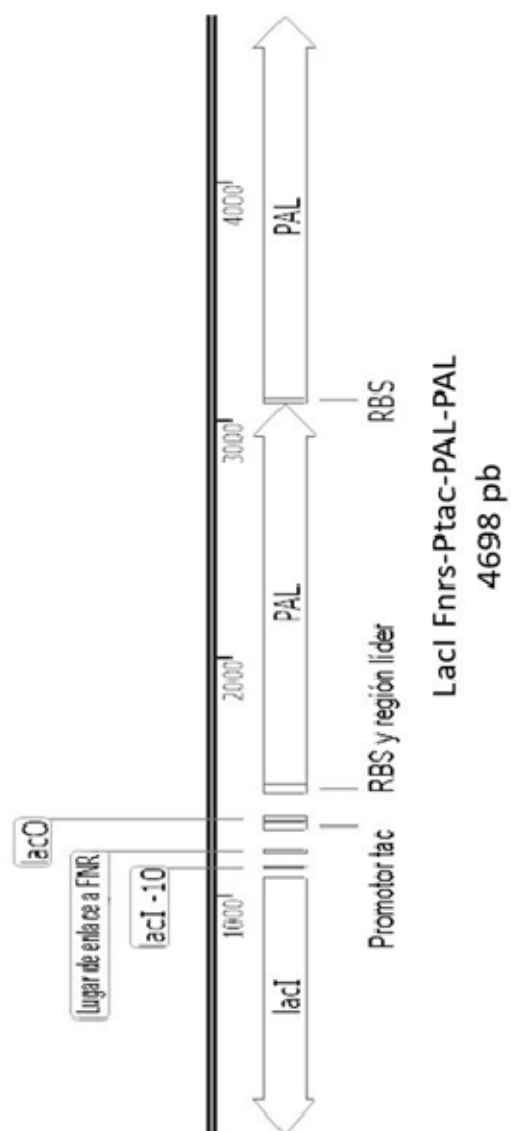


Fig. 65C

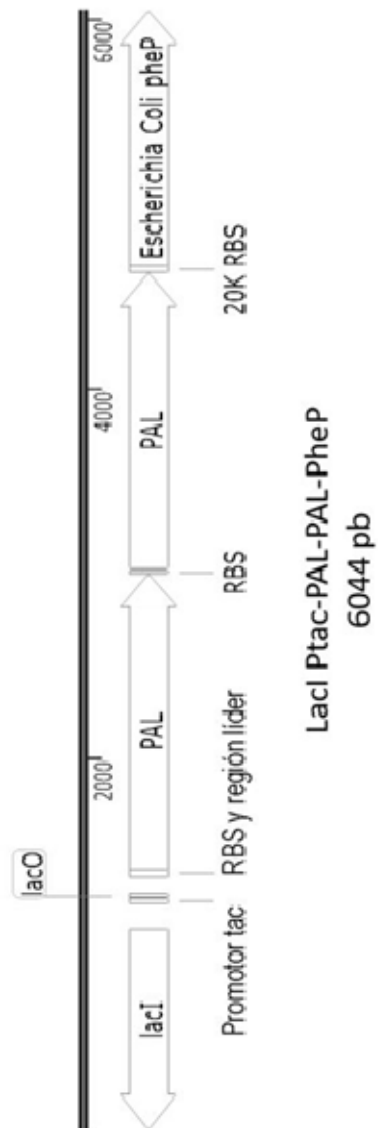


Fig. 65D

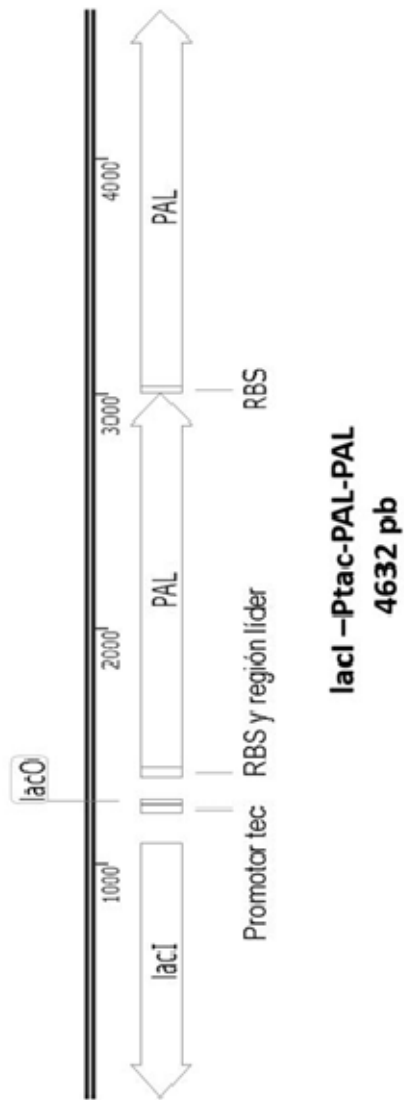


Fig. 66

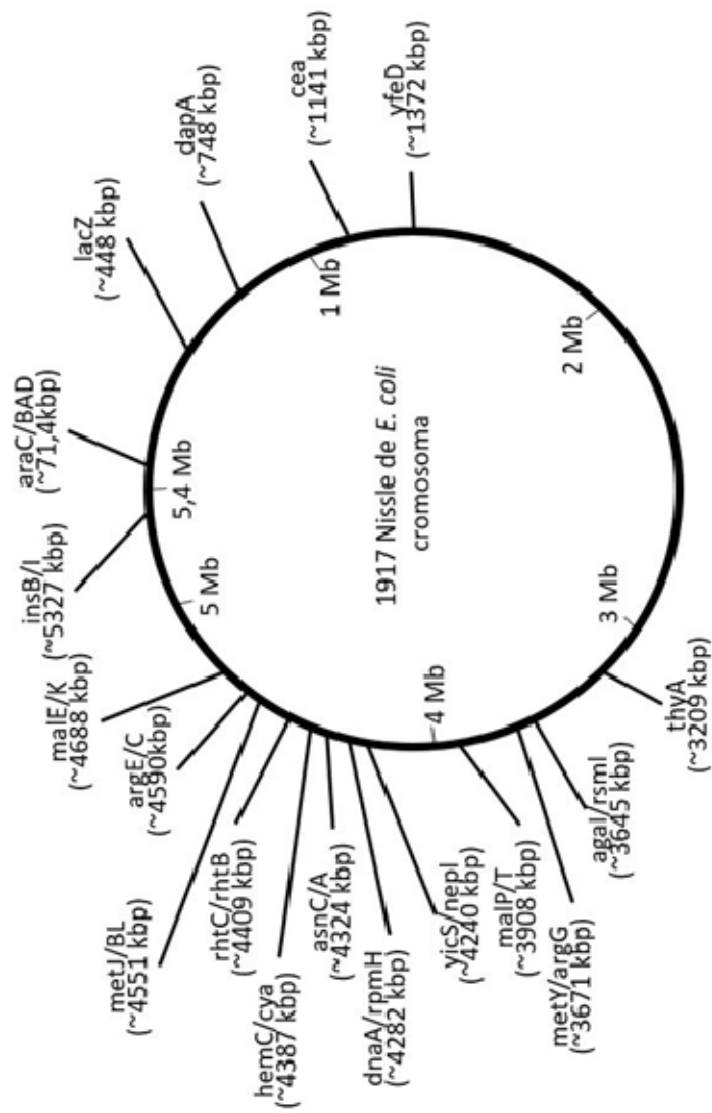


Fig. 67

Brillo de RFP constitutivo integrado en tres ubicaciones:

1. AraB/C
2. MalE/K
3. MetY/ArgG
4. Nissle (no fluorescente)

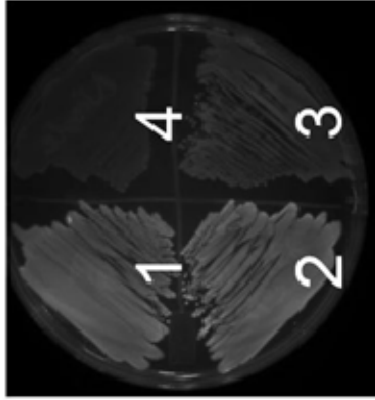


Fig. 68

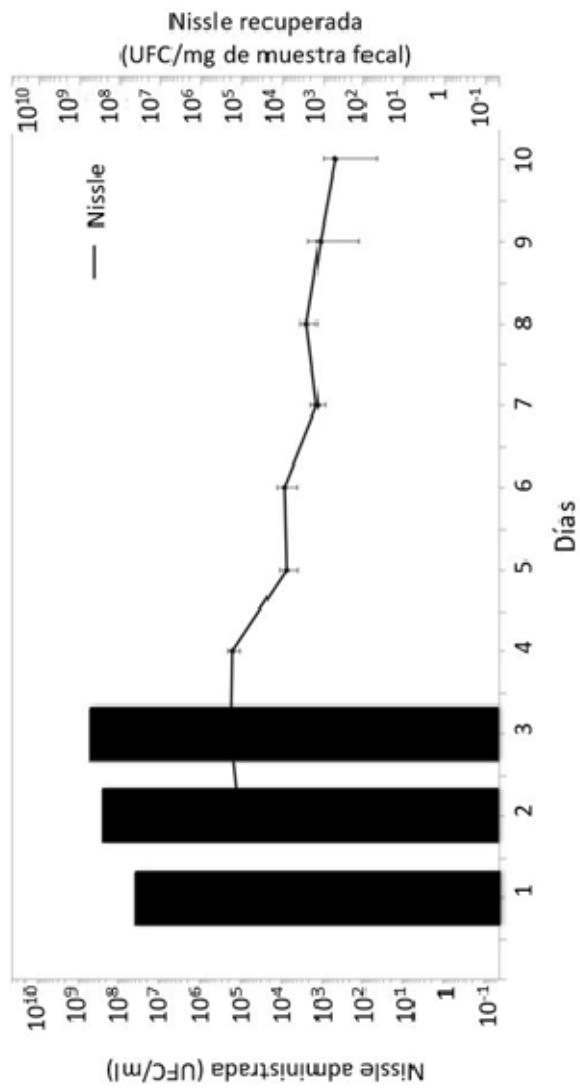
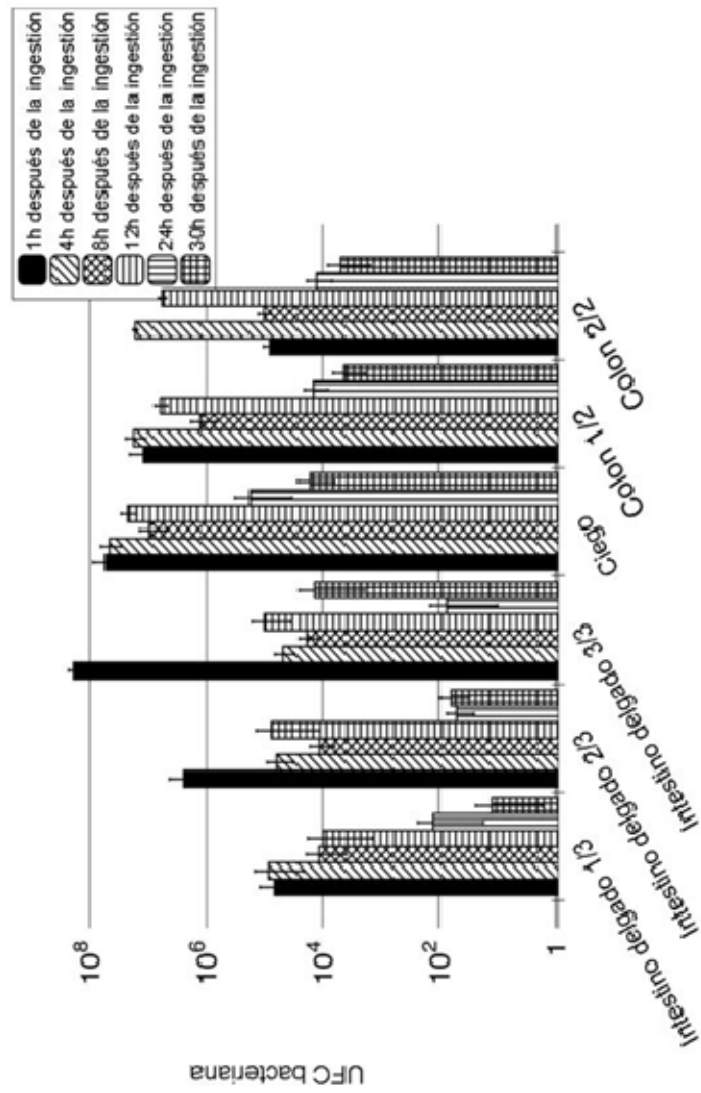
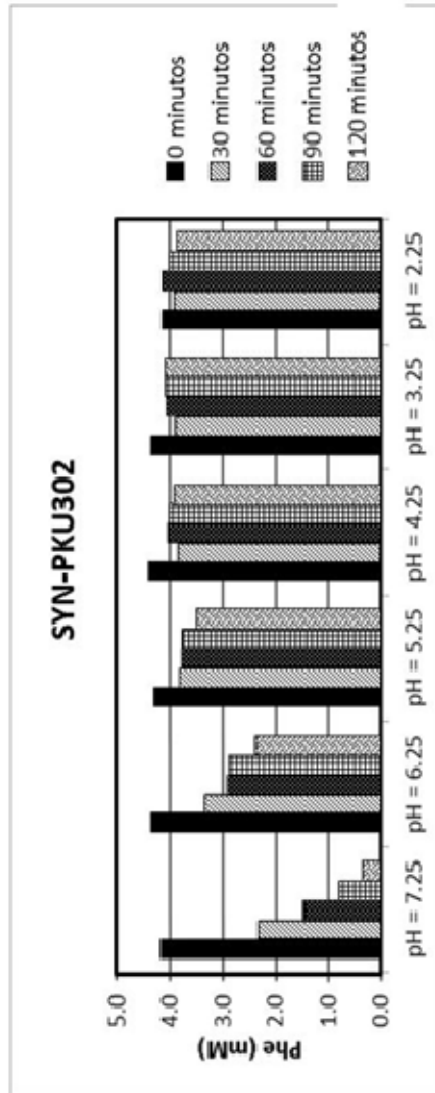


Fig. 69



Figs. 70A



Figs. 70B

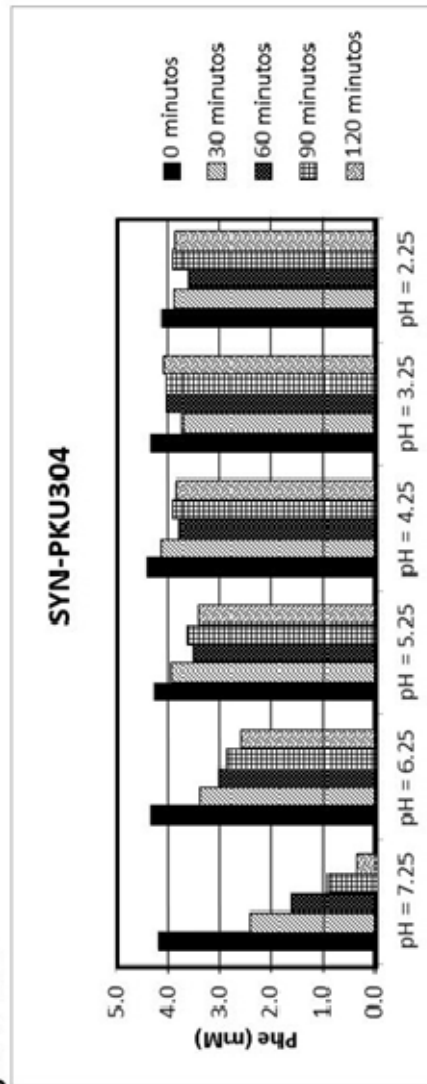


Fig. 71

Biótico sintético: Producto individual; Múltiples MoA

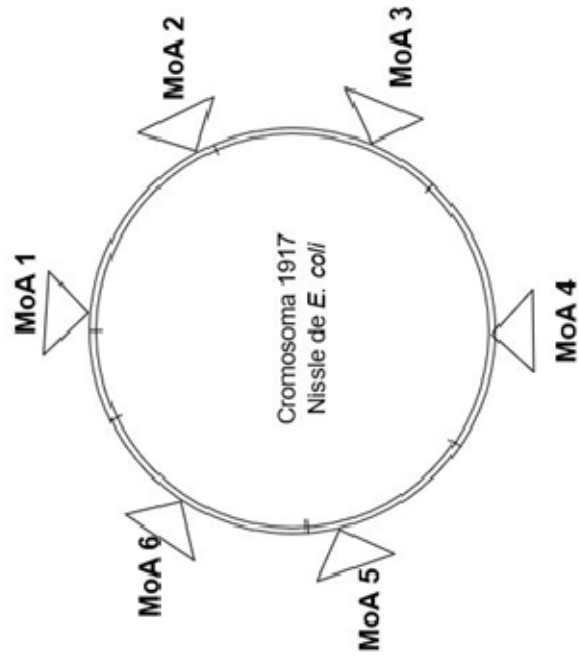


Fig. 72

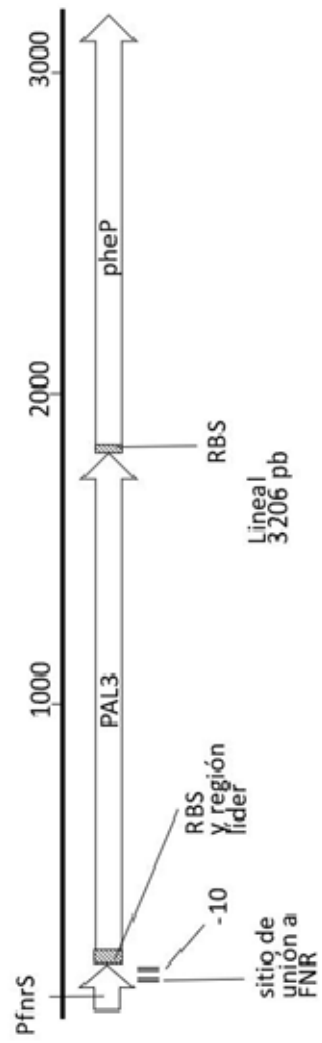


Fig. 73A

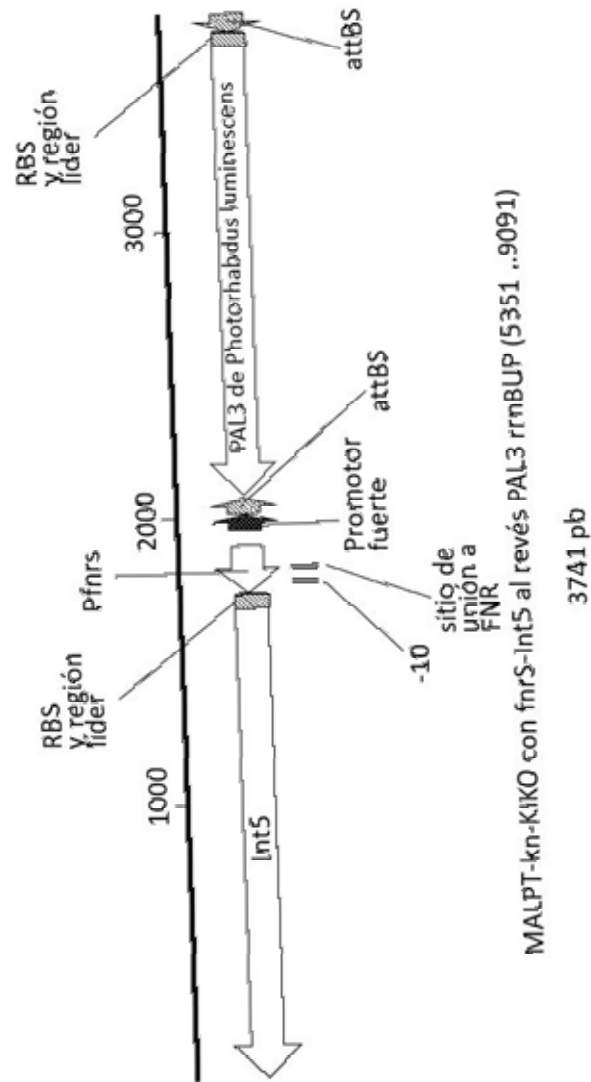


Fig. 73B

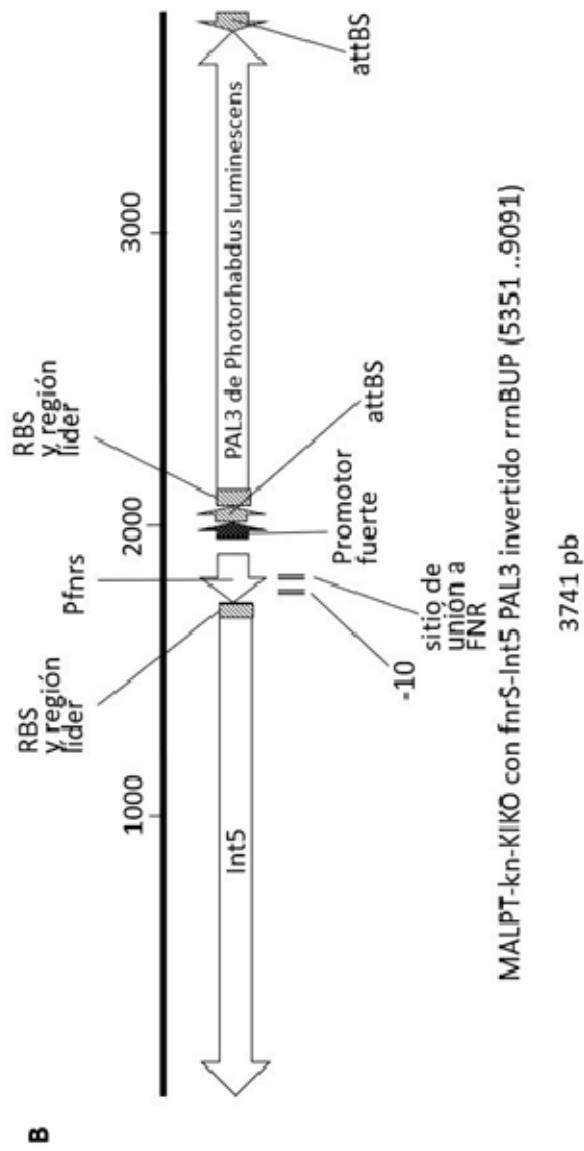
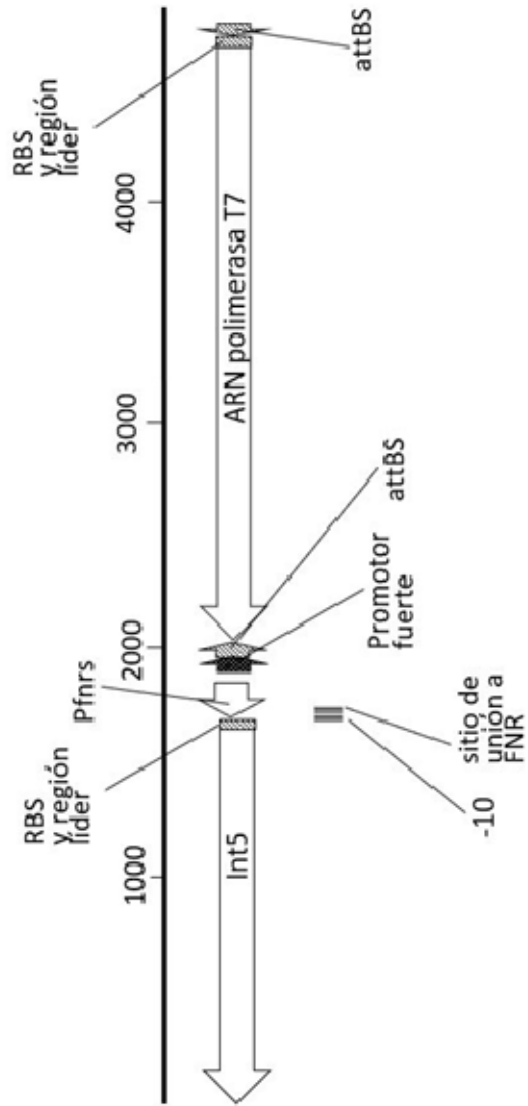


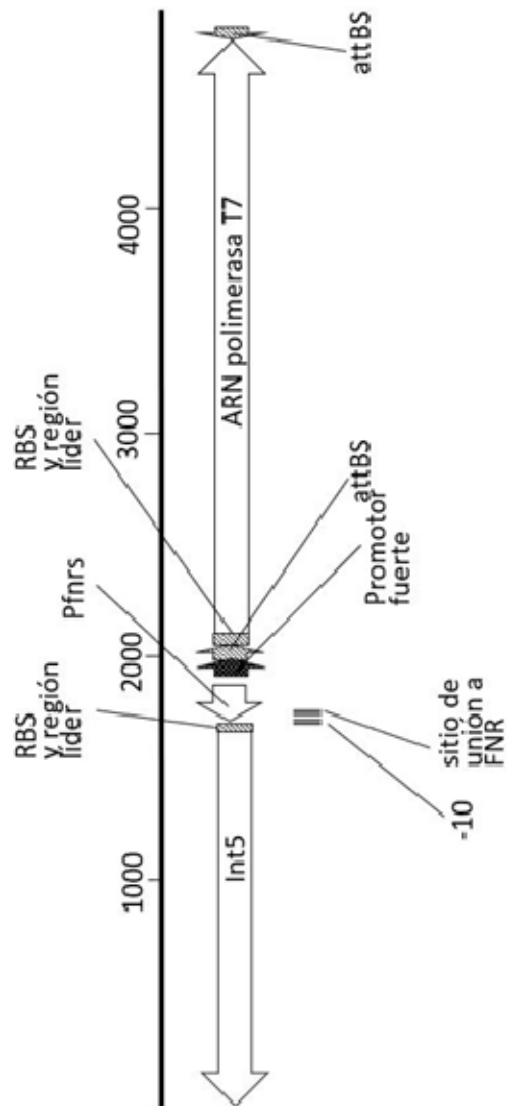
Fig. 74A



MALPT-kn-KIKO con polimerasa T7 fnrS-Int5 al revés rrnBUP (5351 ..9091)

4794 pb

Figs. 74B



MALPT-kn-KIKO con polimerasa T7 fnrS-Int5 invertida rrnBUP (5351 ..9091)

4794 pb

Fig. 74C

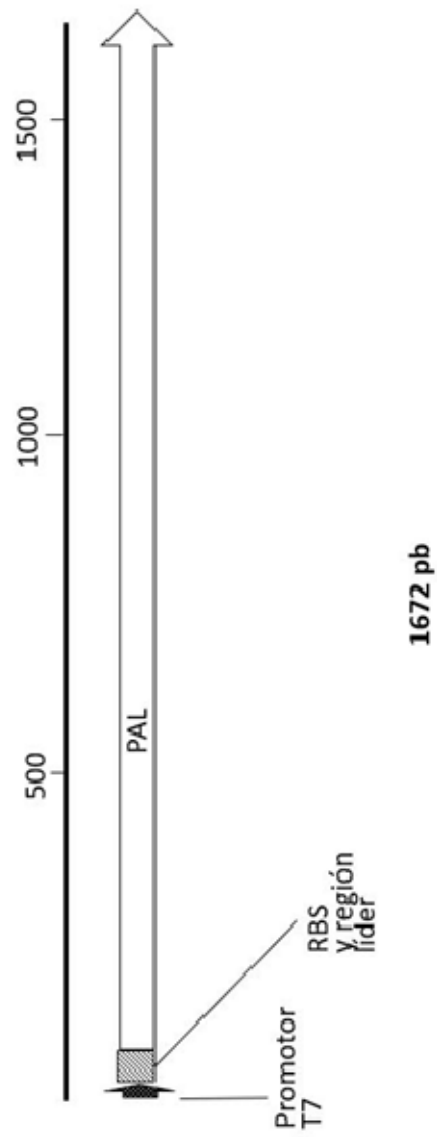


Fig. 75A

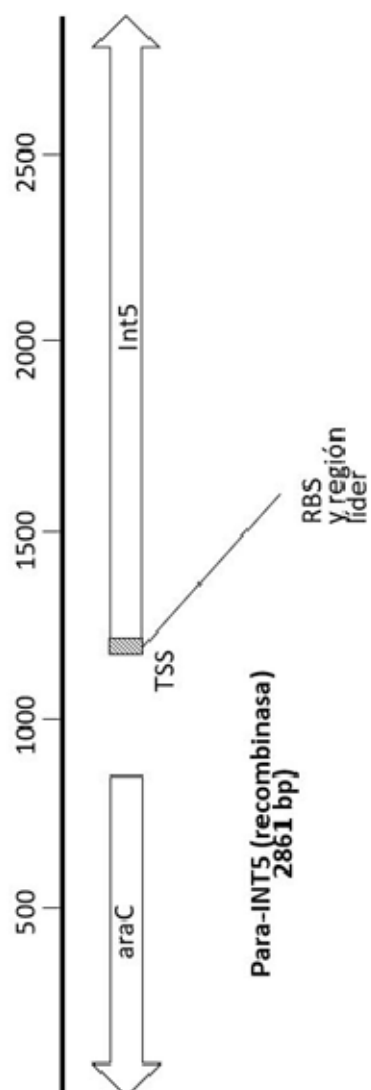
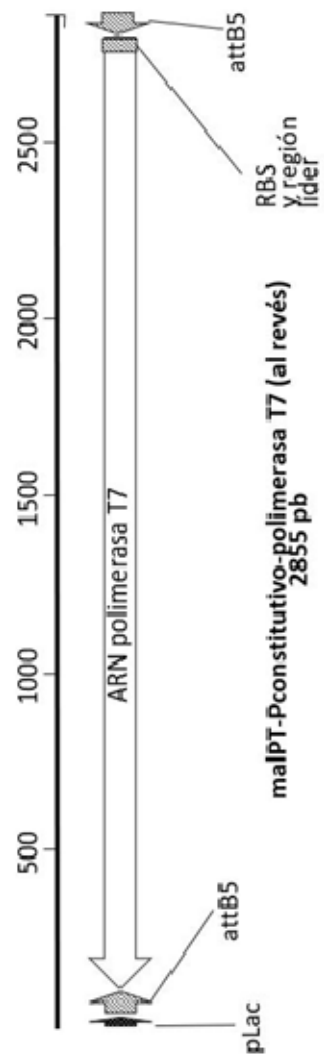
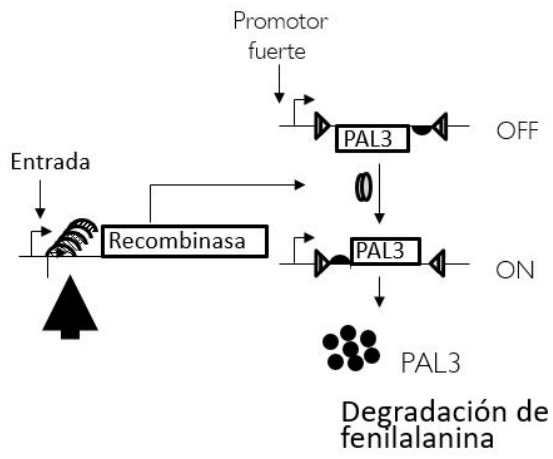


Fig. 75B



Figs. 76A



Figs. 76B

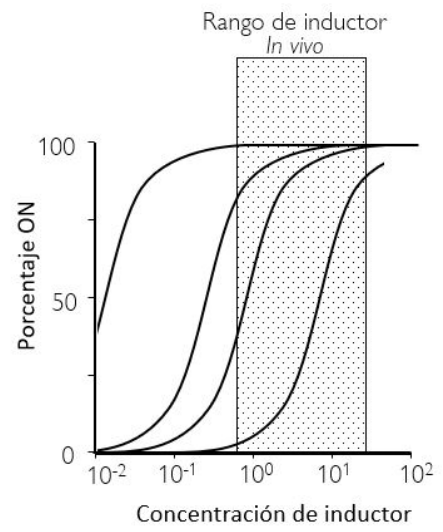


Fig. 77A

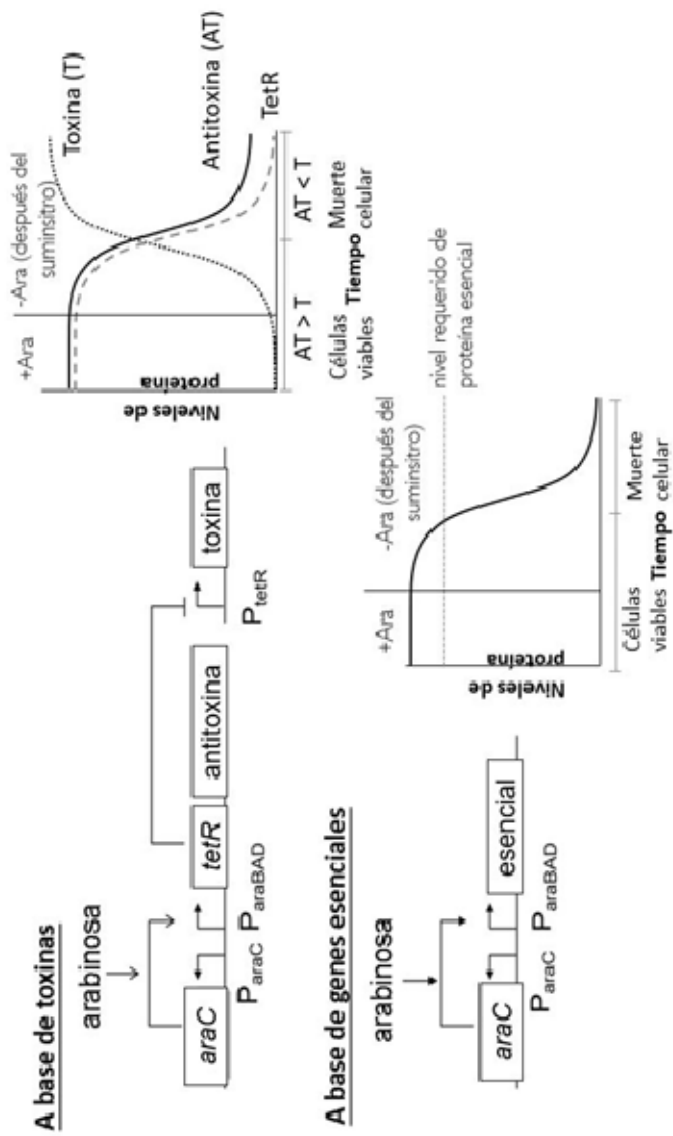


Fig. 77B

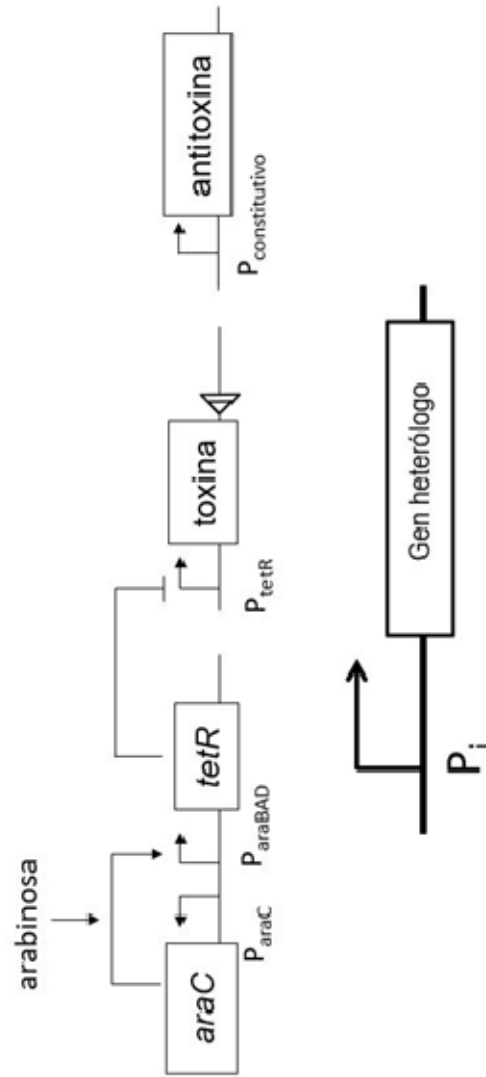


Fig. 77C

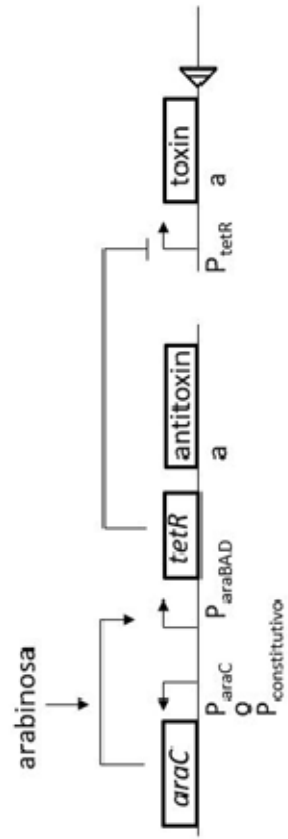


Fig. 78

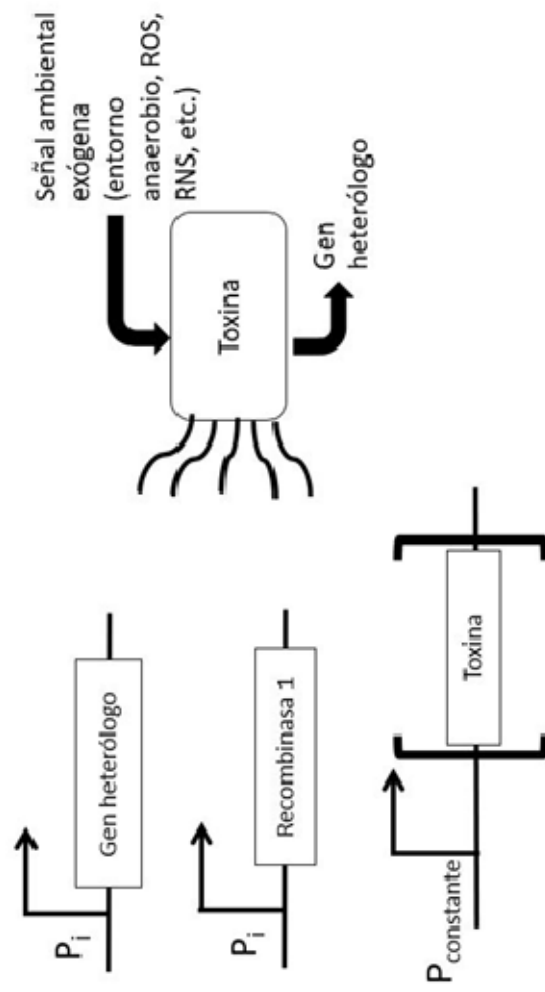


Fig. 79

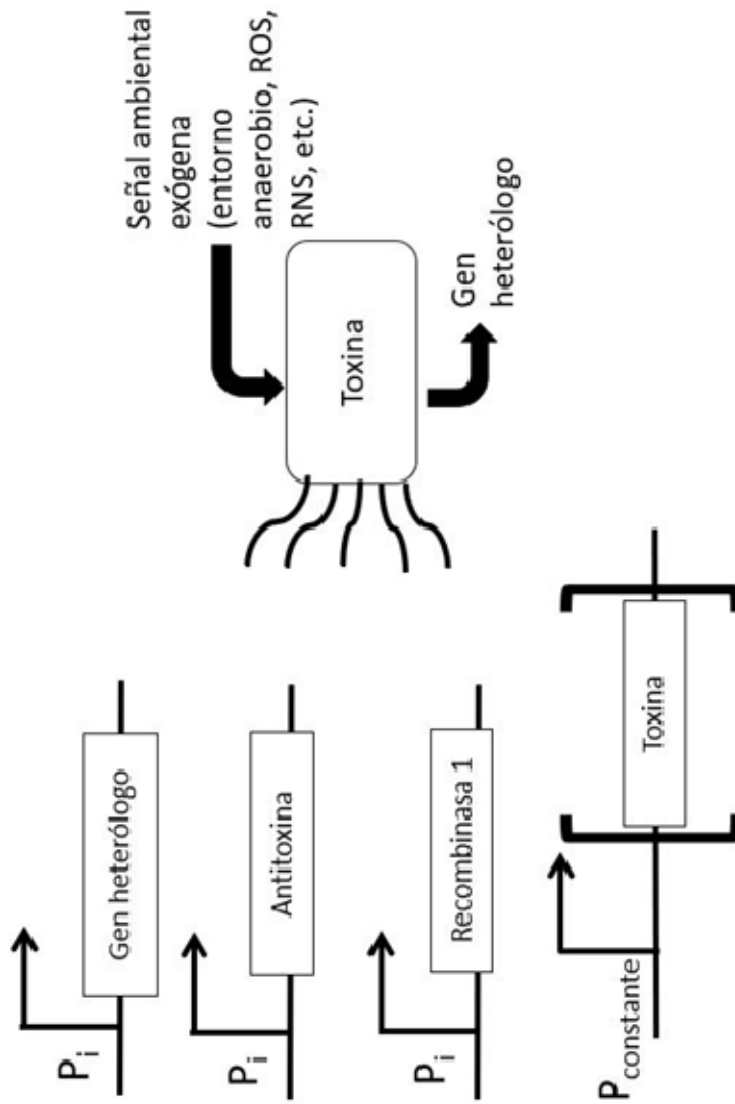


Fig. 80

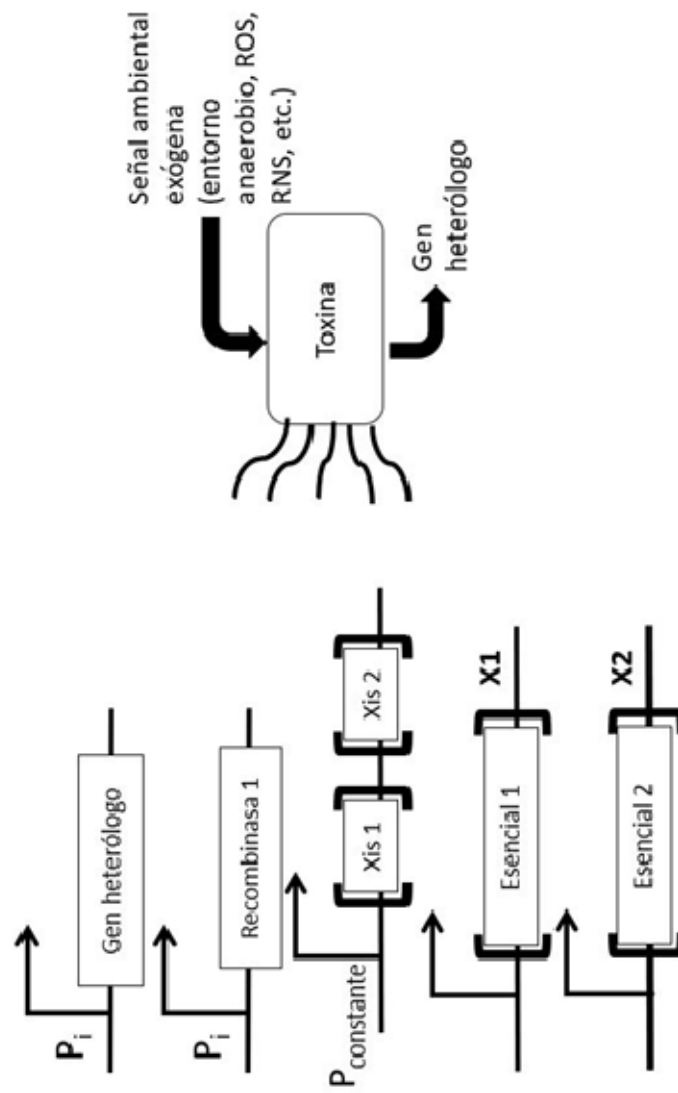


Fig. 81

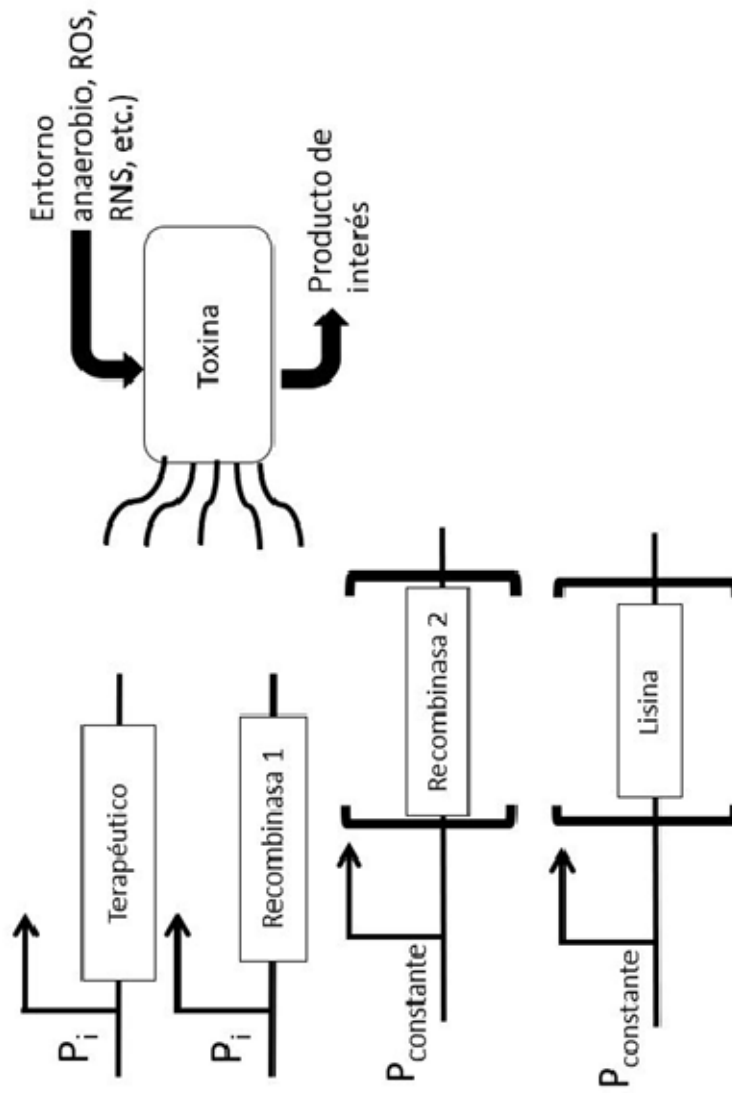


Fig. 82

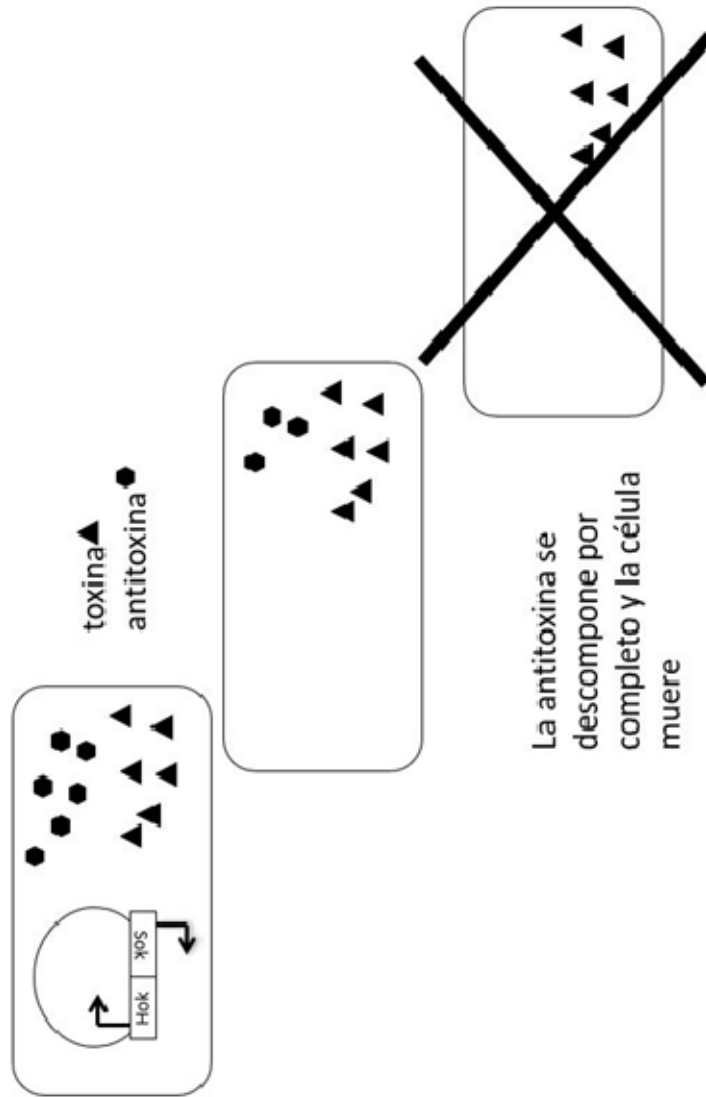


Fig. 83

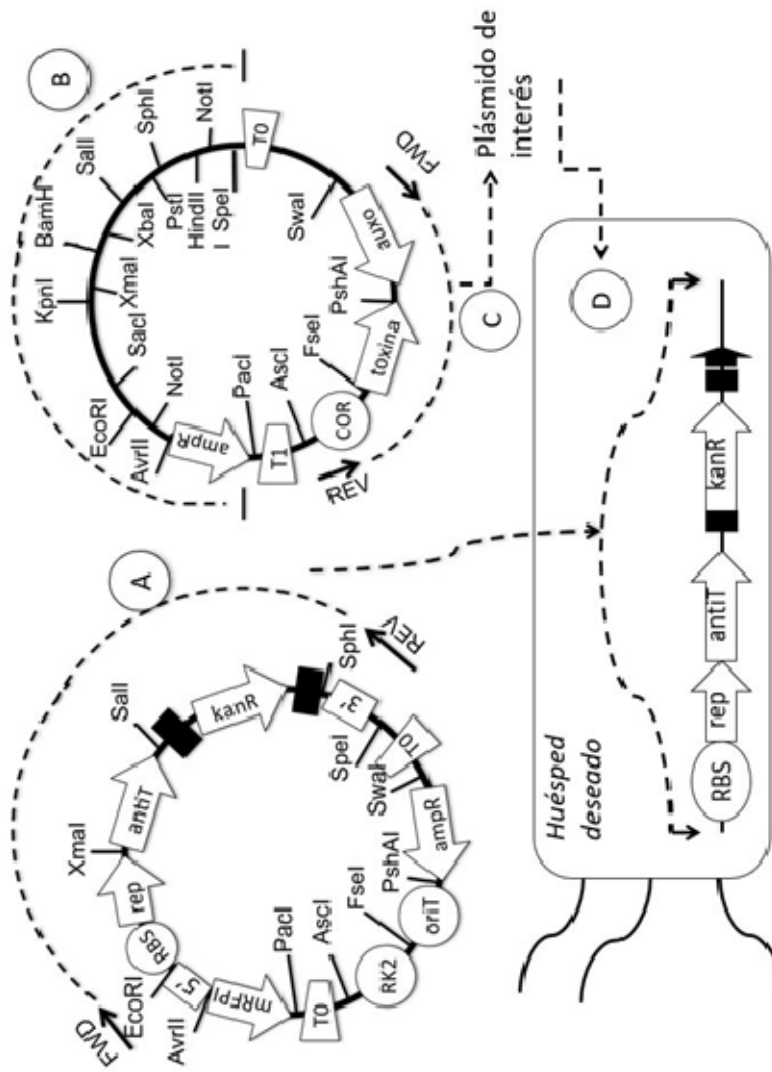


Fig. 84A

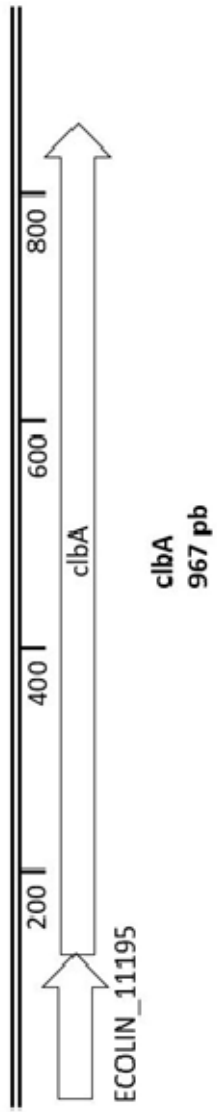


Fig. 84B



Fig. 85

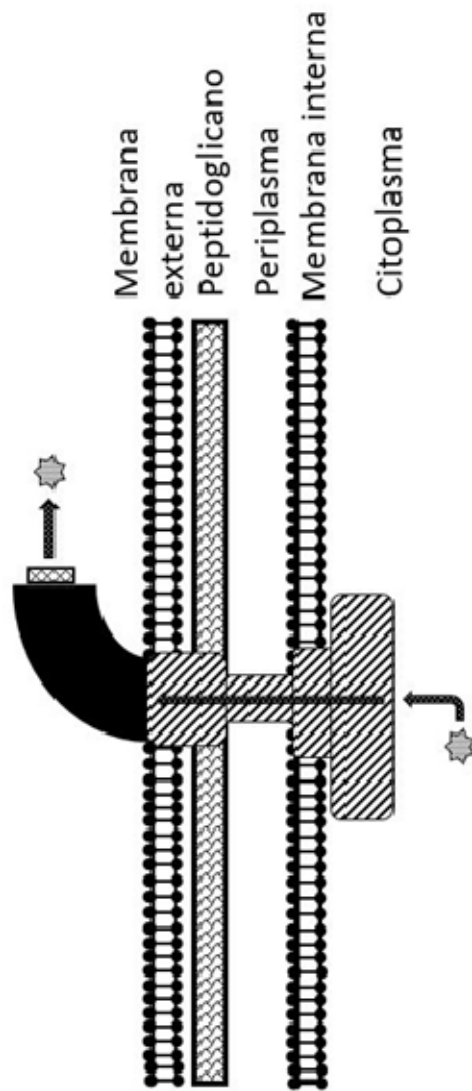


Fig. 86

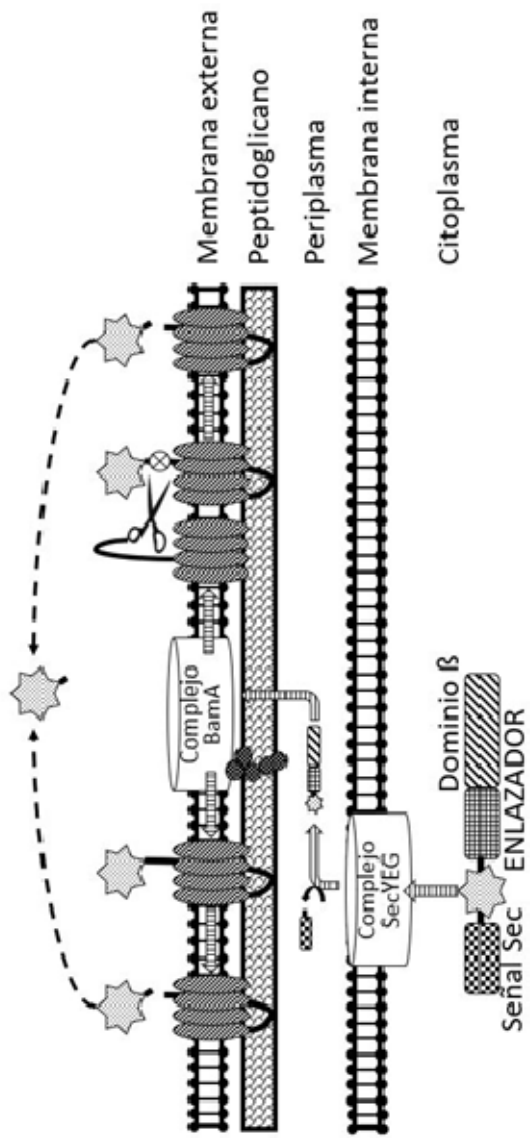


Fig. 87

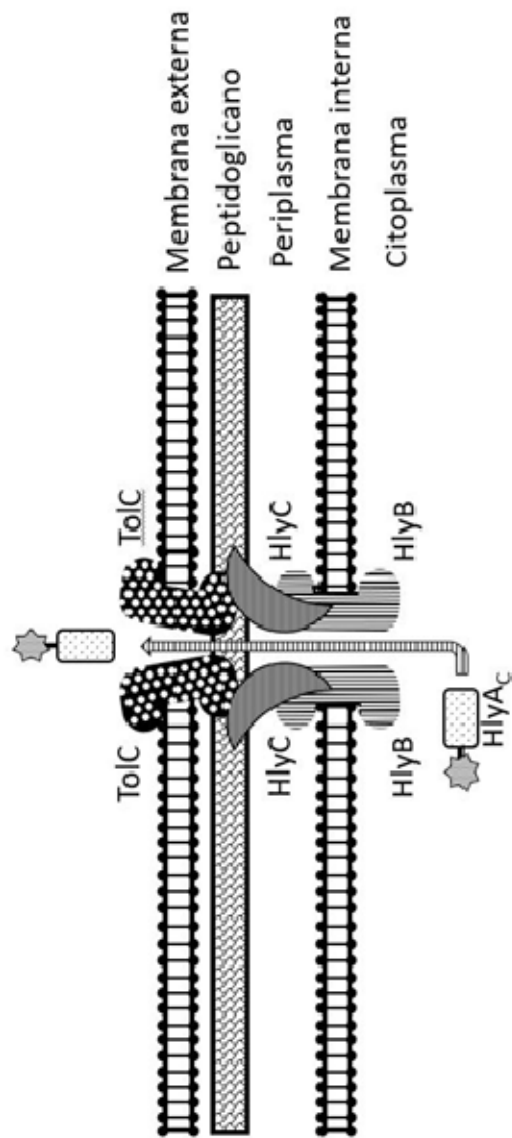


Fig. 88

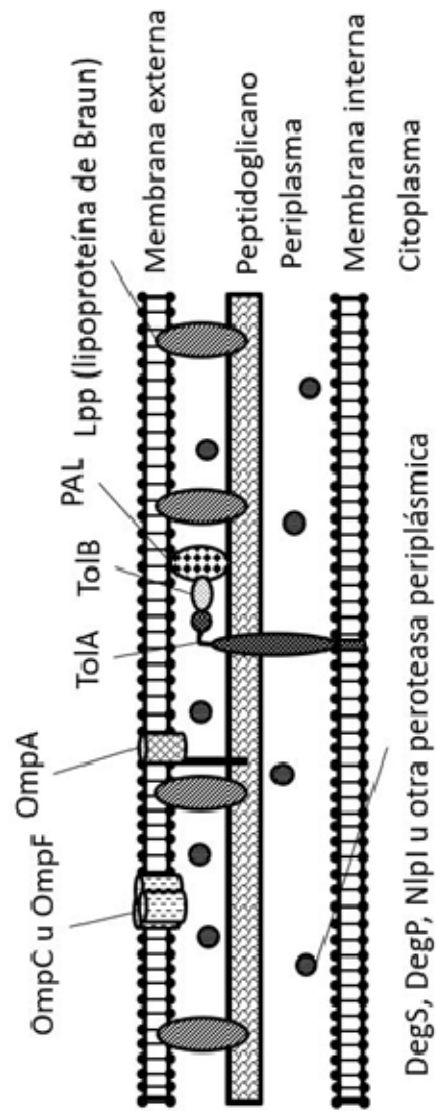


Fig. 89

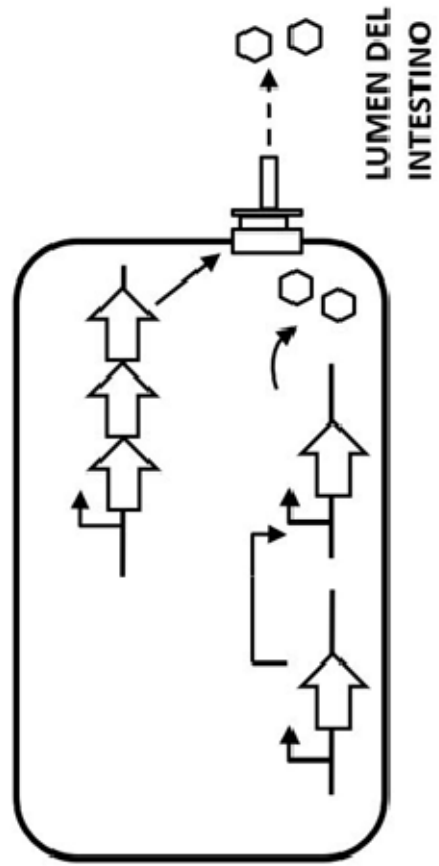


Fig. 90A

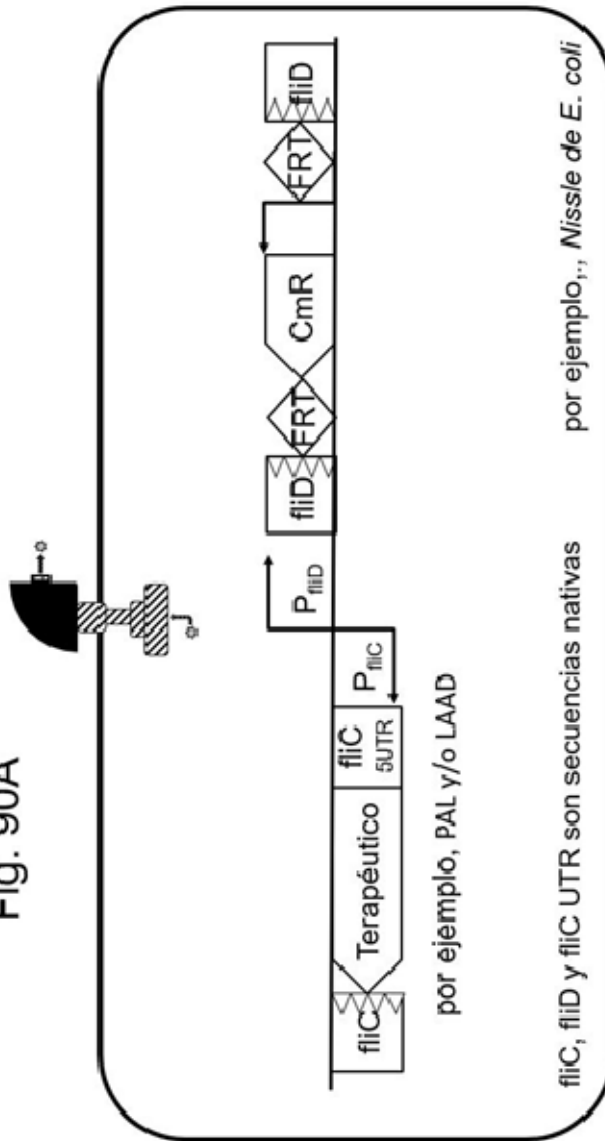


Fig. 90B

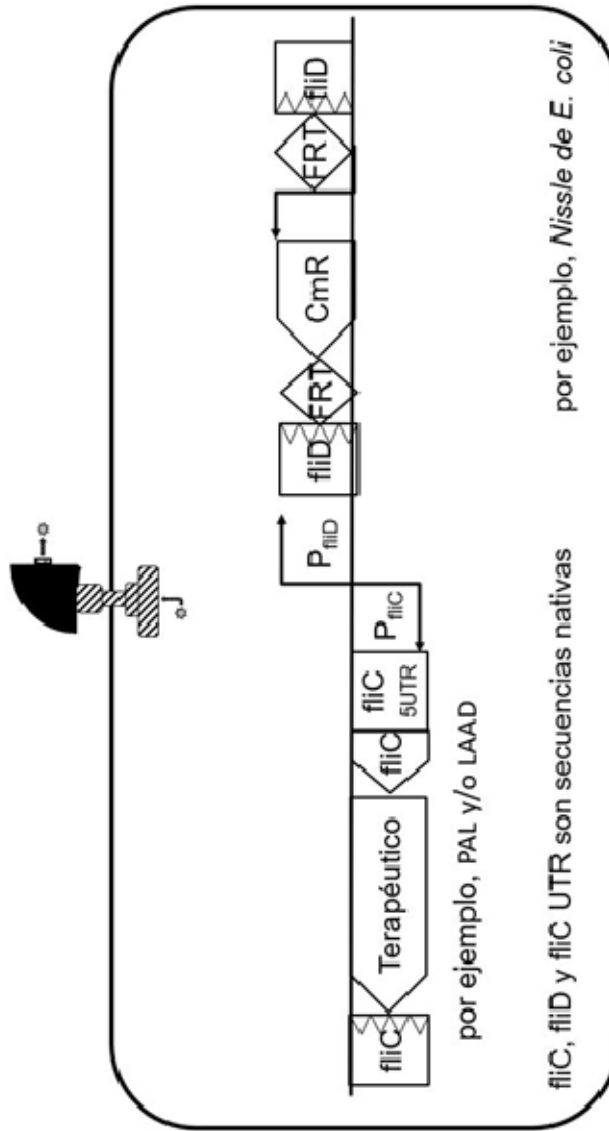
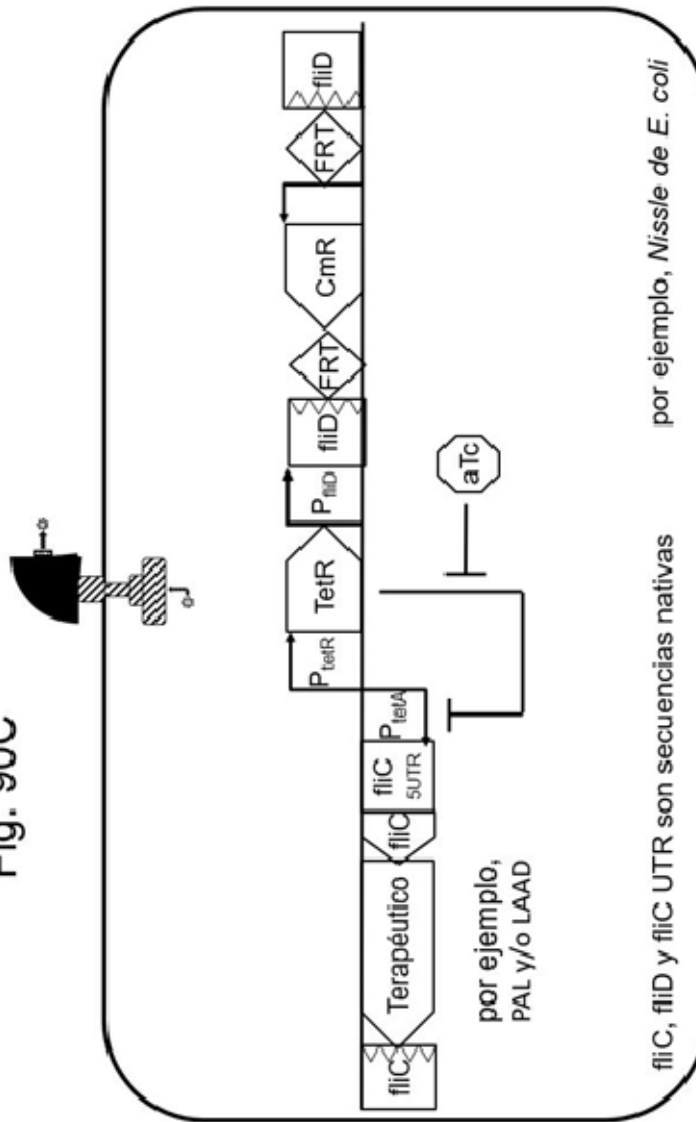


Fig. 90C



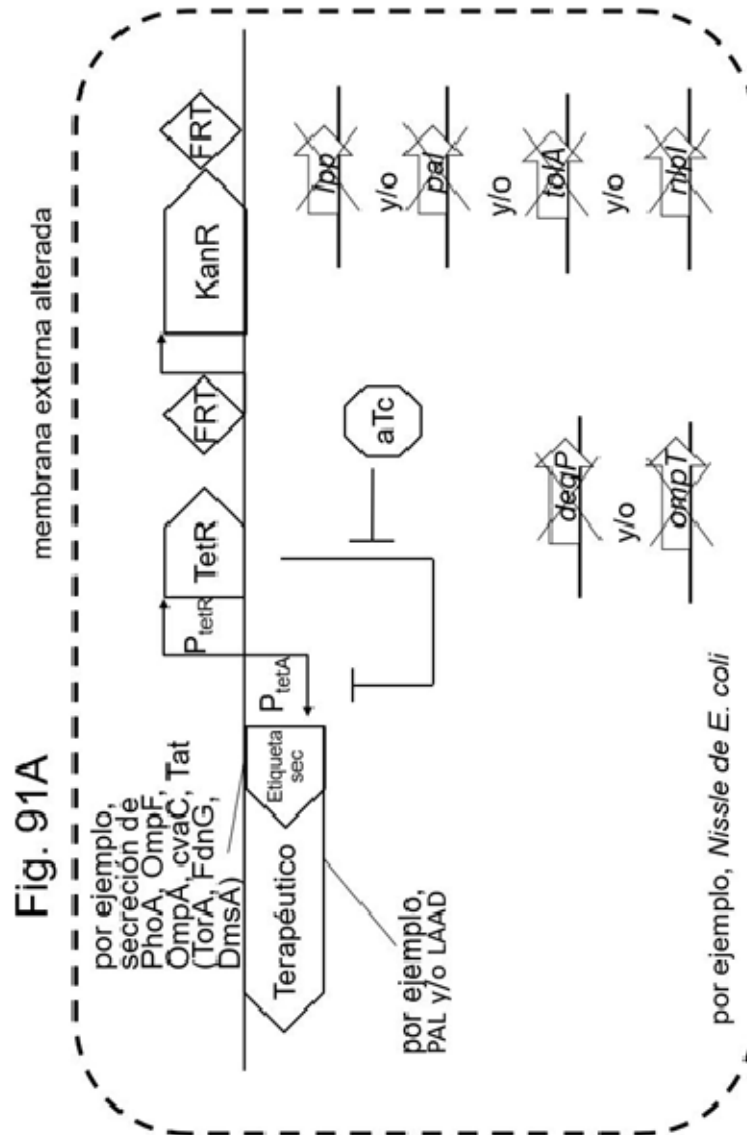


Fig. 91B

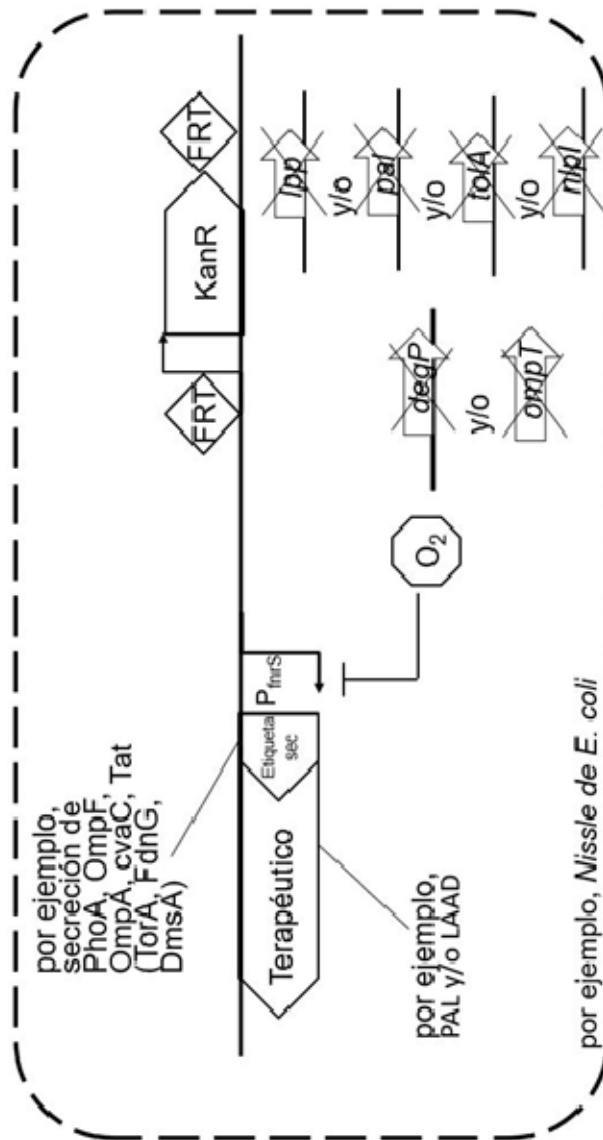


Fig. 92

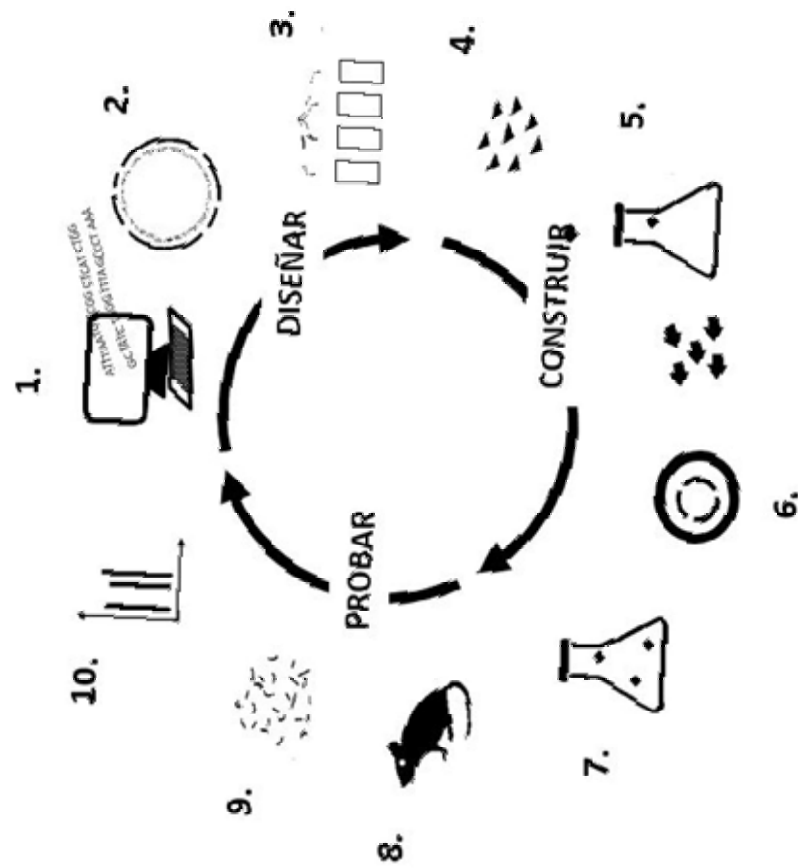


Fig. 93

